

**Instituto de Biociências**

## **A Taturana *Lonomia obliqua* e a Hemostasia**



Ricardo Dobrovolski

Porto Alegre, 2003

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Instituto de Biociências

## **A Taturana *Lonomia obliqua* e a Hemostasia**

Ricardo Dobrovolski

Trabalho apresentado como um dos requisitos para obtenção do grau de Bacharel no Curso de Ciências Biológicas, Ênfase Molecular, Celular e Funcional.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Almeida Guimarães

Porto Alegre  
Março de 2003

NEW JES

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dr. Carlos Termignoni  
Centro de Biotecnologia/UFRGS

---

Dra. Fabiana Horn  
Departamento de Biofísica/UFRGS

*Se não esperamos o inesperado  
Não o encontraremos  
Porque ele é inescrutável e inacessível*

**Heráclito**

## AGRADECIMENTOS

Ao povo brasileiro, cujo trabalho reverte em fundos que financiam nossa pesquisa e cuja esperança de uma vida melhor também está depositada na ciência.

Ao meu orientador, Jorge Almeida Guimarães, pelos ensinamentos, pelo apoio e pelo exemplo.

Ao Prof. Carlos Termignoni, pelas dicas e ajudas.

À Prof. Fabiana Horn, pelas discussões científicas e por examinar o meu trabalho.

À Prof. Célia Carlini, pelas sugestões e pelo apoio.

A todos os professores que contribuíram para minha formação.

Ao Antônio F. M. Pinto e à Ana B. G. Veiga, pela colaboração, paciência e amizade.

Aos colegas do laboratório 106, 109 do Centro de Biotecnologia e 204 do Departamento de Biofísica.

À Sílvia Centeno, ao Luciano Saucedo e aos demais funcionários do Centro de Biotecnologia e da Universidade por seu trabalho indispensável.

Aos meus colegas do Curso de Biologia pela amizade e companheirismo e ótimas conversas.

Aos amigos e familiares pelo amor e pela dedicação.

## ÍNDICE

<b>Abreviaturas.....</b>	<b>7</b>
<b>Resumo.....</b>	<b>8</b>
<b>Introdução.....</b>	<b>9</b>
Hemostasia.....	9
Lepidópteros Urticantes.....	13
<i>Lonomia achelous</i> .....	16
<i>Lonomia obliqua</i> .....	17
<b>Objetivos.....</b>	<b>24</b>
<b>Materiais e Métodos.....</b>	<b>25</b>
Lagartas <i>Lonomia obliqua</i> .....	25
Reagentes.....	26
Dosagem de Proteínas.....	27
Ensaio de Coagulação do Plasma Humano.....	27
Fibrinocoagulação Catalisada por Trombina.....	28
Ensaio de Atividade Amidolítica.....	28
Ativação de Fator X.....	29
Eletroforese em Gel de Poliacrilamida.....	29
Degradação do Fibrinogênio.....	29
Degradação da Fibrina.....	29
Atividade Fosfolipásica.....	30
<b>Resultados e Discussão.....</b>	<b>31</b>
Atividade Pró-coagulante.....	31
Atividade Fibrinogenolítica.....	34
Atividade Fibrinolítica.....	36
Atividade Fosfolipásica.....	36
Atividade Amidolítica.....	39
Ativação de Fator X.....	42
<b>Conclusão.....</b>	<b>44</b>
<b>Perspectivas.....</b>	<b>48</b>
<b>Referências Bibliográficas.....</b>	<b>49</b>
<b>Anexo.....</b>	<b>54</b>

## ABREVIATURAS

- CaCl<sub>2</sub>: cloreto de cálcio
- DL-BAPNA: DL-benzoil-arginil-*p*-nitroanilida
- E: extrato de espículas
- FIXa: fator IX ativado
- FVIIIa: fator VIII ativado
- FXa: fator X ativado
- H: hemolinfa
- kDa: quilodalton
- NaCl: cloreto de sódio
- P: Plasmina
- PA: ativador de plasminogênio
- PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida
- PLA<sub>2</sub>: fosfolipase A<sub>2</sub>
- PMSF: phenylmethanesulphonyl fluoride
- S: secreção de estresse térmico
- S-2160 (D-Phe-Val-Arg-pNA): D-fenilalanilvalilarginina-*p*-nitroanilida
- S-2222 (Ile-Glu-Gly-Arg-pNA): isoleucilglutamilglicilarginina-*p*-nitroanilida
- S-2227 (NH<sub>2</sub>-D-Glu-Gly-Arg-pNA): NH<sub>2</sub>-D-glutamilglicilarginina-*p*-nitroanilida
- S-2238 (H-D-Phe-Pip-Arg-pNA): H-D-fenilalanilpipecolilarginina-*p*-nitroanilida
- S-2251 (D-Val-Leu-Lys-Arg-pNA): D-valilleucillisilarginina-*p*-nitroanilida
- S-2266 (D-Val-Leu-Arg-pNA): D-valilleucilarginina-*p*-nitroanilida
- S-2302 (H-D-Pro-Phe-Arg-pNA): H-D-prolilfenilalanilarginina-*p*-nitroanilida
- S-2322 (D-Val-Gly-Arg-pNA): D-valilglicilarginina-*p*-nitroanilida
- S-2366 (piro-Glu-Prp-Arg-pNA): piroglutamilprolilarginina-*p*-nitroanilida
- S-2388 (D-Phe-Aze-Arg-pNA): D-fenilalanilazelailarginina-*p*-nitroanilida
- S-2390 (H-D-Val-Phe-Lys-pNA): H-D-valilfenilalanilarginina-*p*-nitroalanida
- S-2444 (piro-Glu-Gly-Arg-pNA): piroglutamilglicilarginina-*p*-nitroanilida
- SDS: dodecilsulfato de sódio
- T: extrato de tegumento
- t-PA: ativador de plasminogênio tecidual
- u-PA: ativador de plasminogênio tipo-uroquinase

## RESUMO

A taturana *Lonomia obliqua* é um lepidóptero que reúne uma série de mecanismos de defesa: mimetismo, hábito gregário, espículas sobre o tegumento, bem como defesas químicas. Devido a modificações ambientais, esses vêm migrando para regiões mais povoadas, ocasionando uma série de acidentes decorrentes do contato com seres humanos. Os sintomas causados por esse acidente (hemorragia, hematúria, coagulação intravascular disseminada e insuficiência renal aguda) indicam uma riqueza de princípios ativos anti-hemostáticos presentes no veneno desse animal. O presente trabalho propõe um modelo de atuação desse veneno sobre a hemostasia.

Para analisar as atividades presentes na *L. obliqua* foram produzidos quatro materiais: extrato de tegumento, extrato de espículas, hemolinfa e secreção de estresse térmico.

Tais amostras foram submetidas a diversos testes: a)ensaio de fibrinocoagulação: ação da trombina sobre o fibrinogênio; b)ensaios de coagulação: medidos pelo tempo de recalcificação de plasma humano normal, deficiente em fator-X e depletado de protrombina; c)atividade fosfolipásica: medida pela hemólise indireta de eritrócitos de coelho utilizando gema de ovo como substrato; d)atividade amidolítica: hidrólise de substratos cromogênicos e e)a ativação de fator X. Essas atividades foram monitoradas no SpectraMax em um sistema do tipo ELISA e a atividade fibrino(geno)lítica foi analisada em SDS-PAGE. A atividade pró-coagulante sobre plasma humano normal, plasma deficiente em fator X e plasma sem protrombina, assim como a ativação de fator X, são característicos do quadro de coagulopatia de consumo. Além do aumento da produção de trombina, que tais atividades ocasionam, esse quadro é caracterizado pela presença de proteases assim como a ativação de proteases plasmáticas. Tais atividades foram identificadas pela ação fibrino(geno)lítica do veneno, assim como pela atividade amidolítica sobre diversos substratos.

Os resultados obtidos estão coerentes com um quadro de coagulopatia de consumo indo ao encontro também dos resultados obtidos com a lagarta *Lonomia achelous*.



## INTRODUÇÃO

### Hemostasia

A evolução dos organismos pluricelulares de grande dimensão esteve atrelada ao desenvolvimento de sistemas de comunicação entre as células, promovendo a integração entre as mesmas. O sangue é o tecido fundamental no desempenho dessa função nos animais.

A circulação de sangue no sistema cardiovascular é essencial para o transporte de gases, nutrientes, minerais, produtos metabólicos, hormônios e diferentes células dentro do organismo, comunicando diferentes tecidos. Para cumprir essas funções, é necessário que o sangue mantenha-se líquido dentro do sistema circulatório, sendo capaz de evitar a perda descontrolada de sangue no caso de rompimento dos vasos sangüíneos, a hemorragia. Esse mecanismo, caracteristicamente complexo e redundante, é composto por processos hemodinâmicos, celulares e bioquímicos: a coagulação sanguínea, a agregação plaquetária e a vasoconstrição (Davie *et alli*, 1991; Bandinelli e Simon, 1999; Jenny e Mann, 1998).

Por outro lado, esses processos devem ser regulados a fim de que não ocorra a oclusão dos vasos sangüíneos, ou seja, a trombose.

O sangue é, portanto, um tecido que, cumpre sua função mantendo-se líquido, num fino equilíbrio entre a sua perda descontrolada e a sua solidificação intravascular, visto que ambos processos podem ser fatais para o organismo.

A lesão do tecido é acompanhada do rompimento de pequenos vasos e do extravasamento de sangue. A hemostasia é o processo responsável por cessar a perda de sangue, sendo constituído de três componentes: os vasos sangüíneos, as plaquetas e os fatores de coagulação (Bandinelli e Simon, 1999).

Imediatamente após a lesão vascular, ocorre a vasoconstrição, ou seja, a diminuição do diâmetro do vaso e, por conseqüência, do fluxo de sangue no local. Essa vasoconstrição se dá graças à capacidade das células da parede do vaso (células endoteliais) de se contraírem (Bandinelli e Simon, 1999).

Por sua vez, as plaquetas, fragmentos subcelulares derivados de megacariócitos, aderem-se ao subendotélio, agregando-se umas às outras e culminando na formação de um “tampão celular” que é acompanhado pela deposição da fibrina (Marcus e Safier, 1993). A

ativação plaquetária torna ainda disponíveis fosfolípidos importantes para as reações da cascata de coagulação (Davie, 1991).

Além das plaquetas, contribuem para a ativação da cascata de coagulação (figura 1) as demais células do tecido lesado, expondo fosfolípidos de membrana e liberando o fator tissular, uma proteína de membrana presente nas células que circundam a luz do vaso sanguíneo (Davie, 1991; Dahlbäck, 2000). O fator tissular liga-se ao fator VII, tanto na forma zimogênica quanto na forma ativada (fator VIIa). A interação do fator VIIa com o fator tissular converte os fatores IX e X nas suas formas ativas (IXa e Xa). Ocorre aí uma retroalimentação positiva da cascata de eventos, quando os fatores VIIa, IXa, e Xa ativam o fator VII. O fator Xa e o seu cofator Va interagem em uma superfície fosfolípídica formando o complexo protrombinase, responsável pela ativação de protrombina em trombina (Dahlbäck, 2000; Simmons e Lane, 1998; Davie, 1991).

A trombina é uma enzima efetora. Ela é chave no sistema de coagulação, tendo muitas funções biológicas tais como a ativação de plaquetas, conversão de fibrinogênio a fibrina e retroalimentação positiva da cascata de coagulação. A trombina ativa fator V, tanto em solução quanto sobre superfícies fosfolípídicas, o fator V é ativado ainda por fator X em superfícies catalíticas (Dahlbäck, 2000; Simmons e Lane, 1998; Davie, 1991).

A amplificação promovida pela trombina ocorre não apenas via ativação de fator V, mas também através da ativação de de fator VIII e fator XI. O fator VIII circula ligado ao fator de von Willebrand o qual é uma proteína adesiva importante na agregação plaquetária.

Uma etapa importante da cascata envolve a formação de um complexo multi-molecular constituído dos fatores VIII, IXa e X que interagem sobre uma superfície de fosfolípidos. A etapa requer ainda a presença de  $Ca^{++}$ . Dessa interação resulta a ativação do fator VIIIa e do fator X a Xa, sendo conhecido como complexo “tenase”. Quando ativado, o fator VIIIa dissocia-se do fator de von Willebrand, participando da formação do complexo “tenase”. O fator IX é ativado por fator XI que por sua vez é ativado também por trombina (Dahlbäck, 2000; Simmons e Lane, 1998; Davie, 1991).

A trombina é responsável ainda pela ativação do fator XIII cuja forma ativada (fator XIIIa) é responsável pela estabilização da rede de fibrina através da transglutaminação entre resíduos de glutamina e lisina presentes na fibrina.

Além da via extrínseca, descrita acima, iniciada pela presença de fator tissular, ocorre ainda a via intrínseca formada por precalicreína, cininogênio de alto peso molecular e fator XII que, quando ativados, culminam na ativação de fator XI.

Vale ainda ressaltar que os complexos “tenase” e protrombinase, responsáveis pela ativação de fator X e de protrombina, respectivamente, necessitam do fosfolípido fosfatidilserina para a formação do complexo multi-molecular, o qual é exposto na ativação das plaquetas. As proteínas e os substratos que participam desses complexos são vitamina-K dependentes, apresentando uma modificação pós-traducional dos seus resíduos de ácido glutâmico no domínio amino terminal responsável pela ligação com cálcio e pela interação dessas proteínas com os fosfolípidos (Dahlbäck, 2000; Simmons e Lane, 1998; Davie, 1991).

A regulação da coagulação se dá de diversas maneiras, inibindo enzimas ou modulando a atividade dos cofatores. Há, pelo menos, uma proteína inibitória para cada proteinase da cascata de coagulação (Simmonds e Lane, 1998).

O inibidor do fator tissular, por exemplo, inibe as reações que envolvem o fator tissular e o fator VIIa. A maioria das outras enzimas da cascata de coagulação são inibidas pelo inibidor de serino-proteases, a antitrombina. A atividade da antitrombina é estimulada pela presença de heparina (Dahlbäck, 2000).

A via anticoagulante da proteína C regula a coagulação pela modulação da atividade dos fatores VIIIa e Va. A proteína C é ativada na superfície de células endoteliais pela trombina quando esta está ligada à proteína de membrana trombomodulina. A proteína C ativada (APC) impede a ligação dos fatores VIIIa e Va à fosfolípidos de membrana. Além da proteína C, a proteína S também tem atividade anticoagulante, clivando, junto com a APC, os fatores Va e VIIIa. O produto da degradação do fator Va também atua em sinergismo com a proteína S, clivando o fator VIIIa (Dahlbäck, 2000).

A coagulação é regulada ainda pela degradação de fibrinogênio e fibrina, atividades estas desempenhadas pela plasmina. A plasmina é o produto da ativação do plasminogênio pelo fator tissular de ativação de plasminogênio (t-PA) ou pelos ativador tipo-uroquinase(u-PA) (Vaughan e Declerck, 1998).

Paralelamente à evolução do sistema hemostático que possibilitou o controle da perda de sangue pelos animais, diversos grupos de organismos desenvolveram princípios ativos que interferem nesse sistema. Esses mecanismos anti-hemostáticos permitiram aos animais desenvolverem um hábito de vida parasitário cuja dieta é baseada em sangue, como é

o caso de carrapatos, mosquitos e certos morcegos. Para animais predadores esses mecanismo se tornaram importantes ferramentas de caça e digestão do alimento, como é o caso de serpentes e aranhas. No caso de presas, o desenvolvimento de princípios anti-hemostáticos tornou-se uma importante forma de defesa.

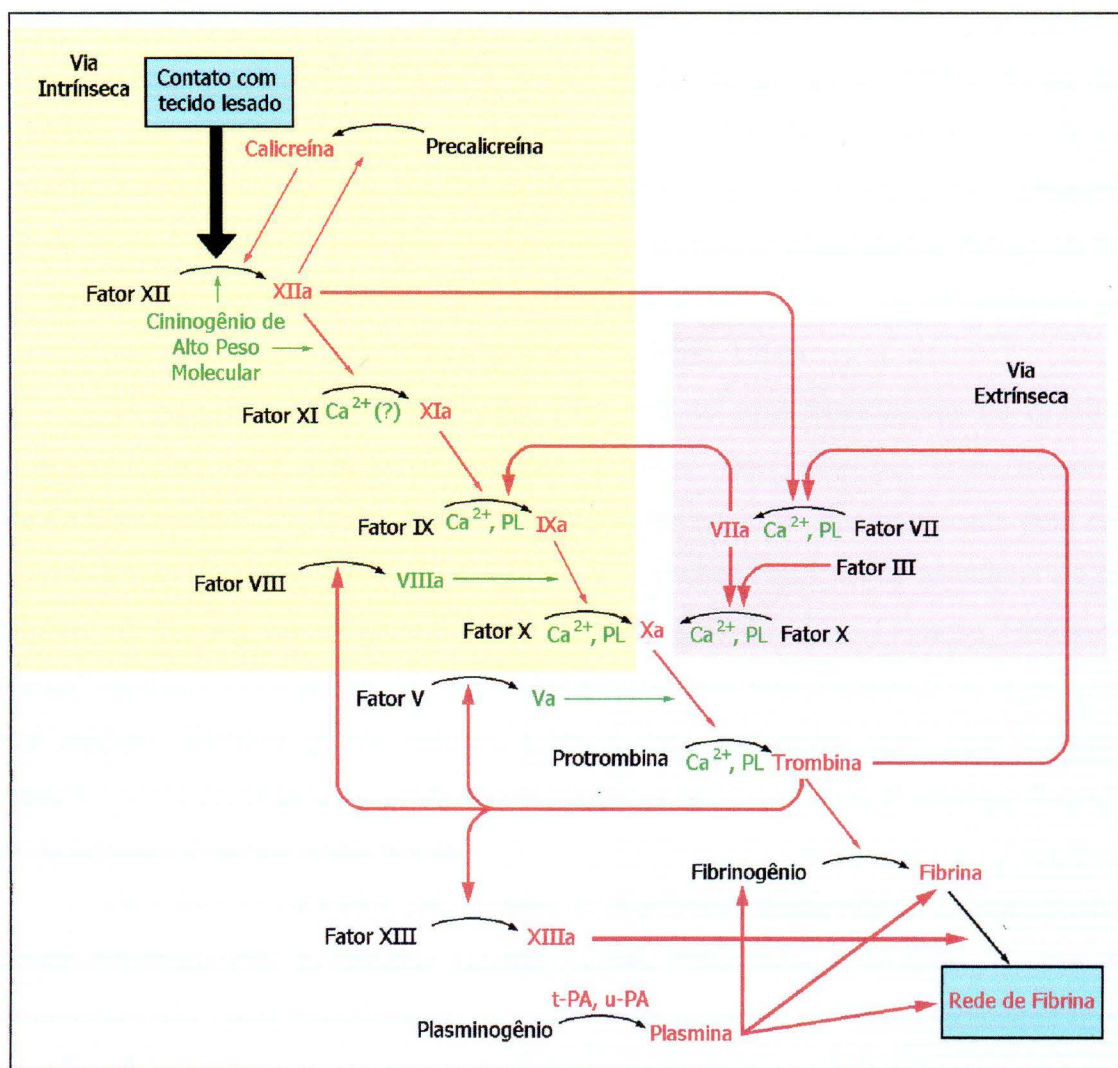


Figura 1: Cascata de Coagulação

## Lepidópteros Urticantes

A Ordem Lepidoptera conta com mais de 150.000 espécies. Os Lepidópteros são animais que possuem uma ampla gama de mecanismos de defesa, o que lhes confere a habilidade de evitar predadores. Esses mecanismos podem ser divididos em defesa primária, aquela que evita a detecção da presa e defesa secundária, que age após o predador ter notado a presença da presa (Lederhouse, 1990). No primeiro caso podemos citar as barreiras físicas, tais como galha, a coloração críptica e o mimetismo (Lederhouse, 1990). Já as defesas secundárias são representadas por aposematismo (coloração de alerta), a aparência repugnante, estruturas corporais de defesa (espículas, espinhos e expansões dérmicas), o “fingir de morto” e defesas químicas que envolvem secreções glandulares, descargas orais e anais e toxinas internas (Lederhouse, 1990; Whitman *et alli*, 1990). Tais mecanismos podem ter sua eficiência aumentada pelo hábito gregário (Vulinec, 1990).

As reações cutâneas provocadas pelo contato com lepidópteros no Brasil estão entre as descrições mais antigas de doenças humanas observadas no “novo mundo”. Na “Carta de São Vicente”, o Padre Anchieta refere-se ao medo da dor provocada pelo contato com certas larvas (Rotberg, 1994). Já em 1914, nos Annaes Paulistas de Medicina e Cirurgia Rodolpho von Ihering no artigo intitulado “Estudo Biologico das Lagartas Urticantes ou Tatoranas” aponta a importância do estudo dos lepidópteros tanto do ponto de vista biológico quanto médico. Embora outros estudos tenham sido realizados após esse trabalho, as informações sobre esses animais ainda são precárias, sendo que pouco é sabido sobre a forma como os venenos desses animais atuam.

Os acidentes causados pelo contato com insetos pertencentes à ordem Lepidoptera envolvem principalmente as famílias Megalopygidae, Saturniidae e Arctiidae. Tais acidentes dividem-se em três tipos, considerando os animais que ocorrem no Brasil: dermatite urticante provocada pelo contato com lagartas urticantes de vários gêneros de lepidópteros ou causada por contato com cerdas da mariposa *Hylesia sp.*; periartrite falangeana por pararama; e síndrome hemorrágica devido ao contato lagartas de *Lonomia sp.* (Ministério da Saúde, 2001).

Acidentes com animais na forma adulta, chamados lepidopterismo, ocorrem com as chamadas mariposas-de-coceira pertencentes ao gênero *Hylesia sp.* (Saturniidae) cujas fêmeas apresentam cerdas no abdome que, em contato com a pele, causam dermatite pápulo-pruriginosa (Ministério da Saúde, 2001). No entanto, os acidentes causados com lepidópteros são em sua quase totalidade decorrente do contato com animais no estágio larval os quais são

denominados erucismo (*erucæ* = larva), tais larvas são conhecidas também por taturana ou tatarana, denominação tupi que significa semelhante a fogo (tata = fogo, rana = semelhante) (Ministério da Saúde, 2001).

As lagartas *Premolis semirufa*, pertencentes à família Arctiidae, são responsáveis pela pararamose ou reumatismo de seringueiro. Os acidentes com a pararama, como é vulgarmente conhecida, estão restritos à Amazônia, sendo as vítimas, em sua quase totalidade, homens que se acidentam durante o trabalho de coleta da seiva das seringueiras. O contato com os animais acontece na maioria das vezes nas mãos, causando lesões crônicas que comprometem as articulações falangeanas, levando a deformidades com incapacidade funcional (Ministério da Saúde, 2001).

As lagartas da família Saturniidae possuem “espinhos” ramificados e pontiagudos de aspecto arbóreo. Apresentam tonalidades esverdeadas, exibindo no dorso e nas laterais, manchas e listras, características de gêneros e espécies, mimetizando as plantas que habitam. Nessa família se incluem as lagartas do gênero *Lonomia sp.* causadoras da síndrome hemorrágica. São popularmente conhecidas por orugas ou rugas (sul do Brasil), beijus-de-tapuru-de-seringueira (norte do Brasil).

Os acidentes causados pelo contato com lagartas do gênero *Lonomia sp.* com manifestações hemorrágicas foram inicialmente descritos na década de 1960 nas florestas tropicais da Venezuela. A partir de 1983, alguns casos provocados por contato com lagarta do gênero *Lonomia* foram observados nos Estados do Amapá e Pará, com alta letalidade. Mais recentemente, a partir de 1989, no Rio Grande do Sul e Santa Catarina, acidentes hemorrágicos vêm sendo descritos com incidência crescente, atingindo principalmente trabalhadores rurais. Além desses estados, foram registrados acidentes no Paraná, São Paulo, Goiás e Pará.

O contato com *Lonomia sp.* constitui a forma mais grave de erucismo. Além do quadro local de dermatite urticante, presente imediatamente após o contato, manifestações gerais e inespecíficas podem surgir mais tardiamente, tais como: cefaléia holocraniana, mal-estar geral, náuseas e vômitos, ansiedade, mialgias e, em menor frequência, dores abdominais, hipotermia, hipotensão. Após um período que pode variar de 1 a 48 horas, instala-se um quadro de discrasia sangüínea, acompanhado ou não de manifestações hemorrágicas que costumam aparecer 8 a 72 horas após o contato. Equimatoses podem ser encontradas podendo chegar a sufusões hemorrágicas extensas, hematomas de aparecimento espontâneo ou

provocados por trauma ou em lesões cicatrizadas, hemorragias de cavidades mucosas (gingivorragia, epistaxe, hematêmese, enterorragia), hematúria macroscópica, sangramentos em feridas recentes, hemorragias intra-articulares, abdominais (intra e extraperitoniais), pulmonares, glandulares (tireóide, glândulas salivares) e hemorragia intraparenquimatosa cerebral (figura 2) (Ministério da Saúde, 2001; Arocha-Piñango e Guerreiro, 2001; Zannin, 2002).

De acordo com a intensidade dos distúrbios hemostáticos, o acidente pode ser classificado em: leve (sem alteração da coagulação ou sangramentos até 48 horas após o acidente); moderado (alteração da coagulação somente ou manifestações hemorrágicas na pele e mucosas, hematúria e sem alteração hemodinâmica); grave (paciente com alteração da coagulação, manifestações hemorrágicas em vísceras e alterações hemodinâmicas e/ou falência de múltiplos órgãos ou sistemas). A principal complicação é a insuficiência renal aguda (Ministério da Saúde, 2001), pode ocorrer ainda a hemorragia intracerebral e coagulação intravascular disseminada (Duarte *et alli*, 1996; Duarte *et alli*, 1990). O contato de uma gestante com uma lagarta levou ao parto prematuro (Fan *et alli*, 1998).

Estudos hematológicos indicam ainda que a o contato com lagartas de *Lonomia* apresentam contagem normal de plaquetas, prolongamento do tempo de protrombina, do tempo de tromboplastina parcial ativado, tempo de coagulação e do tempo de trombina. Diminuição de fibrinogênio, fator V, fator XIII, plasminogênio e  $\alpha$ 2-antiplasmina com aumento de FVIII:C, do fator de von Willebrand e dos produtos da degradação de fibrinogênio (Guerrero *et alli*, 2000; Arocha-Piñango & Guerrero, 2001; Zannin, 2002).

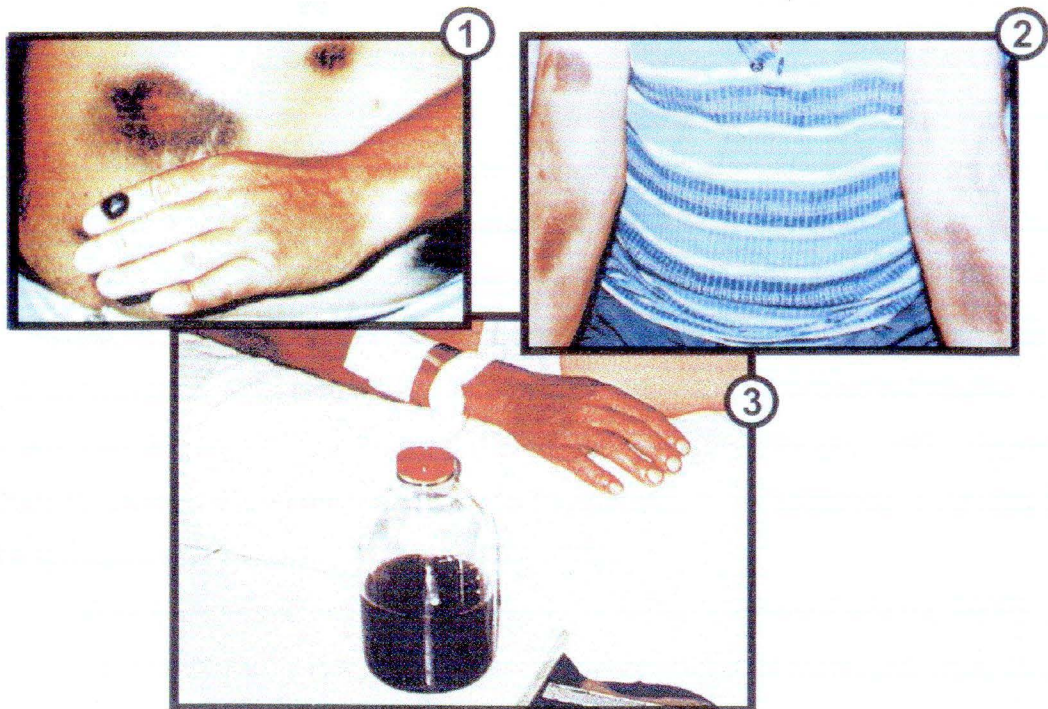


Figura 2: Quadro hemorrágico e sinais clínicos resultantes do envenenamento por acidentes com *Lonomia obliqua*. Em 1, hematomas espalhados pelo corpo e bolha de sangue no dedo do paciente; em 2, hematomas nas partes que entraram em contato com os animais; em 3, urina de paciente com evidente quadro de hematúria (Abella *et al.*, 1998).



*Lonomia achelous*

Em 1967, Arocha-Piñango relatou cinco casos de síndrome hemorrágica ocorrida em humanos que tiveram contato com lagartas na Venezuela (Arocha-Piñango, 1967). Trabalhos posteriores foram conduzidos descrevendo as propriedades dos extratos produzidos a partir de lagartas inteiras e das espículas (Arocha-Piñango e Lyresse, 1969). Os extratos de espícula apresentaram um ativador de plasminogênio. Em 1971 as lagartas foram identificadas como pertencentes à espécie *Lonomia achelous* (Marsh e Arocha Piñango, 1971). Em 1973 foi utilizada a hemolinfa desse animal na qual estava presente um componente com atividade fibrinogenolítica.

Estudos subseqüentes utilizaram extratos com a lagarta inteira, hemolinfa e saliva, vindo a descrever: a atividade sobre substratos cromogênicos (Arocha-Piñango e Pepper, 1981), ativação de protrombina humana (Guerrero e Arocha-Piñango, 1992), degradação de fator XIII (Guerrero *et alli*, 1997), atividade fibrinolítica (Coll-Sangrona e Arocha-Piñango, 1998) e atividade sobre Fator V (López *et alli*, 2000).

Princípios ativos isolados de *Lonomia achelous* (Arocha-Piñango, 2000):

- 1) Lomomina I: proteína tipo-uroquinase com massa molecular entre 16 e 18 kDa (suspeita-se ser a Lonomina V).
- 2) Achelase I e II (Lonomina II): duas serino-proteases com atividade tipo-plasmina e peso molecular entre 22,4 e 22,7 kDa.
- 3) Lonomina III: ativador de protrombina com atividade direta, independente de cálcio e fosfolípidos.
- 4) Lonomina IV: ativador de protrombina tipo-fator X, ou seja, é aumentada na presença de cálcio, fator V e fosfolípidos.
- 5) Lonomina V: proteína que degrada fibrina, fibrinogênio, e fator XIII humano.
- 6) Lonomina VI: ativador de fator V, uma proteína termoestável com atividade máxima em 15 minutos e inibição em 120 minutos, comportamento esse semelhante ao apresentado por plasmina ou trombina.

### *Lonomia obliqua*

A espécie *Lonomia obliqua* Walker, 1855, era considerada sinônimo de *L. achelous* até 1972, quando foram publicados os trabalhos de Lemaire sobre o gênero, nos quais constam as espécies atualmente válidas, sinônimos e distribuição geográfica (Lorini, 1999). Essa espécie pertence à ordem Lepidoptera, subordem Ditrysia, superfamília Bobycoidea, família Saturniidae, subfamília Hemileucinae.

As lagartas são encontradas alimentando-se das folhas das seguintes plantas, *Rollinia emarginata* (araticum), *Erythrina crista-galli* (eritrina), *Cedrella fissilis* (cedro), *Ficus subtriplinervia* (figueira-do-mato), *Ficus carica* (figueira), *Ficus elastica* (seringueira), *Tabebuia pulcherrima* (ipê), *Psidium guayava* (goiabeira), *Persea gratissima* (abacateiro), *Prunus domestica* (ameixeira), *Prunus persica* (pessegueiro), *Platanus acerifolia* (plátano) (Duarte *et alli*, 1990; Lorini, 1999).

O ciclo de vida da *L. obliqua* é composto de uma fase de ovo, uma fase de larva, uma fase de pré-pupa, uma fase de pupa e a fase adulta (figura 3) (Lorini, 1999). Os ovos de *L. obliqua* são colocados isolados ou em grupo sobre o caule ou as folhas das árvores, possuem cor verde-clara e forma elipsóide, o diâmetro médio é de cerca de 1,5 mm e duram por volta de 17 dias (Lorini, 1999) podendo chegar a 30 dias (Ministério da Saúde, 2001).

A fase larval tem duração de 50 a 80 dias e compreende seis instares ao longo dos quais os animais aumentam de 5 para 60 mm aproximadamente, tem duração de 50 a 80 dias (Lorini, 1999). As larvas de *L. obliqua* apresentam hábito gregário desde a eclosão até a fase de pré-pupa. Quando perturbadas, ficam bastante ativas e começam a se deslocar em fileiras, demonstrando o hábito gregário da espécie (figura 4). As lagartas de *L. obliqua* apresentam o corpo marrom com faixas longitudinais de cor marrom-claro contornadas de preto e manchas dorsais transversais brancas e avermelhadas. Possuem cerdas verdes em forma de espinhos ramificados e pontiagudos de aspecto arbóreo dispostos de forma simétrica ao longo do dorso do animal. Essas cerdas se dispõem em faixas longitudinais, sendo que as cerdas mais laterais, assim como as cerdas presentes nas extremidades posterior e anterior, são de um comprimento maior, o que parece estar relacionado a um mecanismo de defesa do animal capaz de disfarçar o contorno do seu corpo, assim com a extremidade cefálica (figura 5).

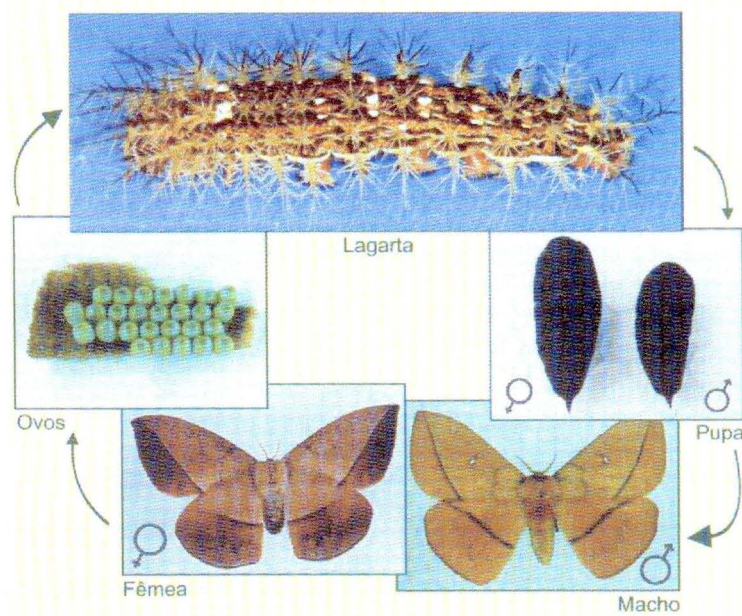


Figura 3: Ciclo de vida da *Lonomia obliqua*.



Figura 4: Colônia de lagartas *Lonomia obliqua* sobre o tronco de uma árvore. No detalhe, uma lagarta isolada (Lorini, 1999).



Figura 5: Larva de sexto instar de *Lonomia obliqua*.

As larvas geralmente permanecem em repouso durante o dia, agrupadas nos troncos das árvores; à noite sobem aos galhos para se alimentarem das folhas da planta hospedeira. No último instar, posicionam-se mais na base do tronco, próximas ao local onde se transformarão em pupas, sob os restos vegetais da superfície do solo (Lorini, 1999). Tal comportamento pode estar relacionado com um maior número de acidentes nessa fase, pois as lagartas estão mais próximas das pessoas. As larvas são mais comuns nos meses mais quentes do ano, de dezembro a março, é exatamente nesse período do ano que ocorre o maior número de acidentes com esse animal (figura 6).

Na fase de pré-pupa as larvas param de se alimentar, adquirem uma coloração mais escura e um aspecto contraído, reduzem seus movimentos e isolam-se, procurando um substrato onde possam eliminar suas exúvias (Lorini, 1999).

As pupas de *L. obliqua* apresentam dimorfismo sexual, sendo o macho menor do que a fêmea. As pupas apresentam um tamanho médio de 30 mm e a duração do período pupal é de 45 dias, ao longo dos quais os animais permanecem em dormência no solo (Lorini, 1999; Ministério da Saúde, 2001).

Os adultos de *L. obliqua* apresentam peças bucais atrofiadas o que os impossibilita de se alimentar, sendo essa fase bastante curta, com uma média de cerca de sete dias (Lorini, 1999) o que leva a crer que a importância biológica dessa fase está restrita à cópula e à ovoposição. Ocorre nos adultos um acentuado dimorfismo sexual: o macho em geral é menor e possui cor amarela; a fêmea é mais robusta e possui cor marrom-acizentada. A envergadura média dos machos é de cerca de 60 mm, enquanto a das fêmeas é de cerca de 80 mm (Lorini, 1999).

A estimativa do ciclo de vida médio de *L. obliqua* é de seis meses apresentando provavelmente mais de uma geração por ano.

A lagarta de *L. obliqua* parece reunir uma série de mecanismos de defesa, aliando mecanismos primários e secundários. Sua cor marrom e suas espículas verdes fazem com que as larvas, geralmente localizadas sobre vegetais, não sejam visíveis à distâncias maiores. No entanto quando perto, a coloração característica da *L. obliqua* pode servir como um sinal de reconhecimento e alerta para o predador. Além disso, quando importunadas, as lagartas soltam secreções orais. Por último, a presença do veneno e de estruturas especializadas na defesa mecânica e na injeção do veneno na pele do predador torna a *L. obliqua* uma espécie muito eficaz em evitar predadores.

O controle populacional de *L. obliqua* promovido por outros seres vivos parece ser de caráter parasitário. Foram encontrados até agora os seguintes parasitas: *Belvosia viedemanni* Aldrich, 1928 (Diptera, Tachinidae), *Leschenaultia sp.* (Diptera, Tachinidae), *Enicospilus sp.* (Hymenoptera, Ichneumonidae) (Lorini, 1999). Tais animais depositam seus ovos no corpo da taturana e suas larvas alimentam-se da mesma, matando o animal parasitado. Além desses insetos, foi descrito também um vírus da família Baculoviridae denominado *L. obliqua* multicapsid nucleopolyhedrovirus (LooMNPV). As lagartas parasitadas por esse vírus morrem apresentando geotropismo negativo, diarreia e regurgitação (Wolff *et alli*, 2002).

*L. obliqua* é uma espécie que tem despertado grande interesse desde o final da década de 1980, principalmente na região Norte do Rio Grande do Sul, em Santa Catarina e posteriormente no Paraná, devido à maior frequência com que esses animais começaram a ter sua presença notada, causando centenas de acidentes hemorrágicos nas pessoas que entraram em contato com as suas lagartas, inclusive levando alguns pacientes à morte.

Em 1986, a lagarta já apresentava as suas vítimas no Rio Grande do Sul e em Santa Catarina (Rubio, 2001). Em 1989, foram registrados os primeiros acidentes no Rio Grande do Sul e em Santa Catarina, com a ocorrência de quatro óbitos (Lorini, 1999).

Esse aumento dos acidentes pelo contato com a lagarta está relacionado com uma maior ocorrência desse animal em áreas habitadas, decorrente, provavelmente, da redução de áreas de matas naturais, fazendo com que a espécie procure vegetação mais próxima de áreas residenciais, incrementando, dessa forma, os riscos de acidentes com pessoas pela maior facilidade de contato (Lorini, 1999).

No período de janeiro de 1990 a dezembro de 2001 (figura 7), foram registrados 1851 acidentes provocados pelo contato com *L. obliqua*; deste total, 35 (2%) desenvolveram insuficiência renal aguda. Seis óbitos foram oficialmente registrados no período de 1990 a 1995. As complicações responsáveis por estes óbitos foram insuficiência renal aguda e hemorragia intracraniana (Zannin, 2002).

Em 1996 foi desenvolvido um soro antilonômico pelo Instituto Butantan, a partir da imunização de cavalos utilizando um extrato de espículas (Da Silva *et alli*, 1996). O soro antilonômico (SALon) foi introduzido no Estado de Santa Catarina e a partir da data da introdução do soro no tratamento de pacientes que haviam sofrido acidente com *L. obliqua*, verificou-se que os óbitos, nos pacientes tratados, caíram para zero, apesar do aumento do

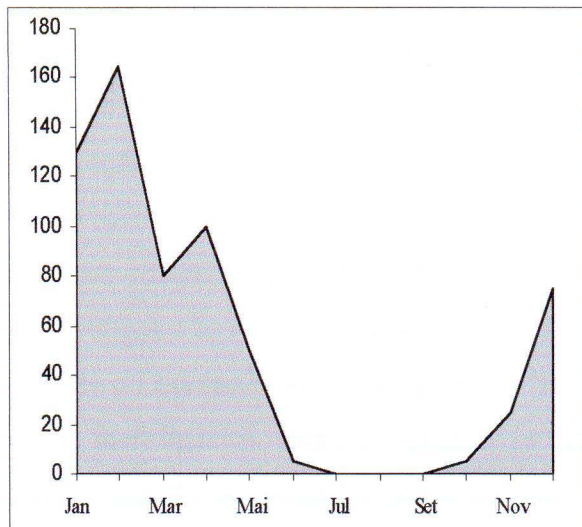


Figura 6: Variação do número de acidentes com *Lonomia obliqua* ao longo do ano (média de 93 a 98) (dados do CIT/RS).

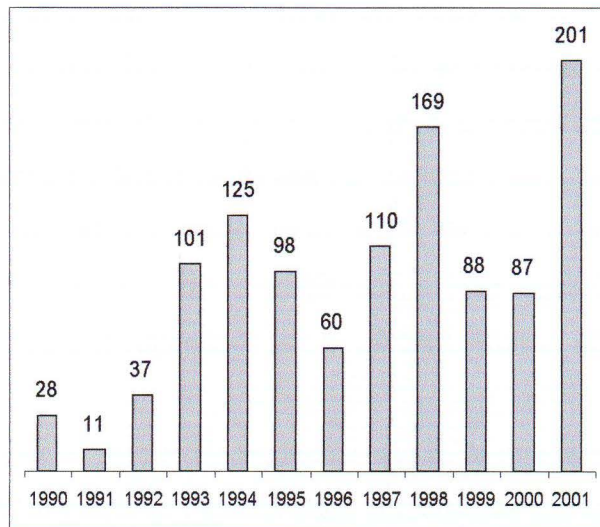


Figura 7: Número de acidentes decorrentes do contato com *Lonomia obliqua* no Rio Grande do Sul (dados do CIT/RS).

número de acidentes. No entanto, as complicações do tipo insuficiência renal aguda (IRA) continuaram manifestando-se (Zannin, 2002).

No Rio Grande do Sul, a incidência dos acidentes notificados ao CIT/RS entre 1991 a 2000 foi de 994 casos com oito óbitos (três em 1999), sendo que quatro deles ocorreram após a administração de soro antilonômico (Zannin, 2002).

A produção do soro antilonômico a partir do extrato de espículas reflete o fato de que os estudos com *Lonomia obliqua* concentram-se nesse extrato (Donato *et alli*, 1998; Reis *et alli*, 1999; Reis *et alli*, 2001 a e b; Arocha-Piñango, 2001; Rebelato, 2001; Gouveia *et alli*, 2002). Em 1997, foi descrita a Lonomiatoxina, uma proteína de 20 kDa presente no extrato de espículas com atividade fosfolipásica (Rocha-Campos *et alli*, 1997). Em 1998 foram analisadas as atividades do extrato de espículas sobre a hemostasia *in vitro*, nesse trabalho verificou-se a atividade pró-coagulante sobre plasma humano o que foi relacionado à ativação de fator X e de protrombina (Donato *et alli*, 1998).

Posteriormente, foi descrita um serino-protease de 69 KDa purificada a partir do extrato de espículas, a Lopap (*Lonomia obliqua* prothrombin activator protein). Essa proteína é capaz de ativar protrombina de maneira dose-dependente e tem sua ação aumentada com a presença de cálcio (Reis *et alli*, 1999; Reis *et alli*, 2001 a e b). Quando injetada na corrente sangüínea de ratos, essa proteína causou a formação de trombos, tornando, ao mesmo tempo, o sangue incoagulável. Outros efeitos observados foi a ativação de protrombina, a diminuição do número de plaquetas e a hemorragia nos glomérulos renais, além de necrose nos túbulos renais distais. Tais resultados levaram à conclusão de que a Lopap seria um componente muito importante do veneno, sendo considerada a responsável pelos principais sintomas encontrados nos pacientes envenenados por *L. obliqua* (Reis *et alli*, 1999; Reis *et alli*, 2001 a e b).

A utilização do extrato de espículas está relacionada também ao fato de que estas são as estruturas com as quais as pessoas mais comumente entram em contato nos acidentes com *L. obliqua*. Associado a esse fato, existe também a idéia de que haveriam glândulas de veneno nos ápices dessas estruturas (Ministério da Saúde, 2001; Zannin, 2002).

No entanto, mostrou-se, posteriormente, que não existia uma glândula individual em cada espícula responsável pela produção do veneno. Ocorre, na verdade, um epitélio secretor sob o tegumento do animal e sob as espículas responsável pela produção do veneno (figura 8). A secreção venenosa fica armazenada em uma cavidade subcuticular no interior da

espícula (figura 9). A espícula possui a extremidade fechada e o veneno só é liberado mediante o contato físico quando a extremidade da espícula (tip), de natureza quitinosa, é quebrada mediante o contato com a pele da própria vítima (figura 10) (Veiga *et alli*, 2001).

Todavia, a gravidade do acidente parece depender não somente da extensão da área de contato com as lagartas, do número e do ínstar no qual elas encontram-se mas também da intensidade do contato (esmagando-as ou não) (Zannin, 2002).

<b>Enzima</b>	<b>Atividade</b>	<b>Referência</b>
Lopap	Ativação de Protrombina	Reis <i>et alli</i> , 2001 a e b.
Lonomiatoxina	Tipo-fosfolipase A <sub>2</sub>	Rocha-Campos, 1997.
?	Ativação de fator X	Donato <i>et alli</i> , 1998.

Tabela 1: Atividades descritas para *L. obliqua*.



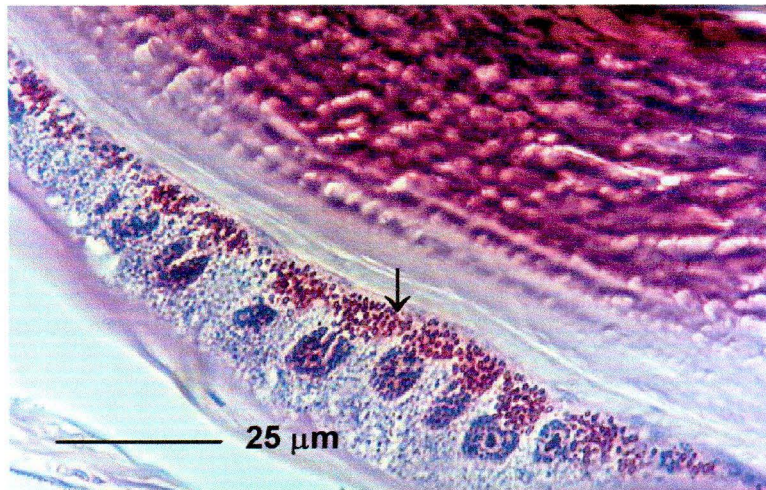


Figura 9: Epitélio tegumentar. A seta mostra o gradiente de vesículas nas células e os núcleos bastante evidentes (Veiga, 2001)

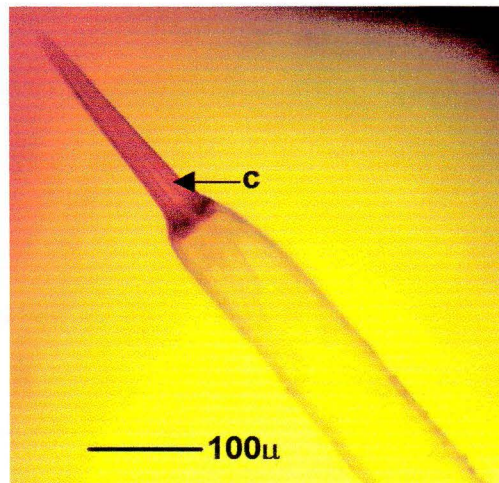


Figura 8: Cerda. O canal interno (ci) é bastante visível (Veiga *et alli*, 2001).

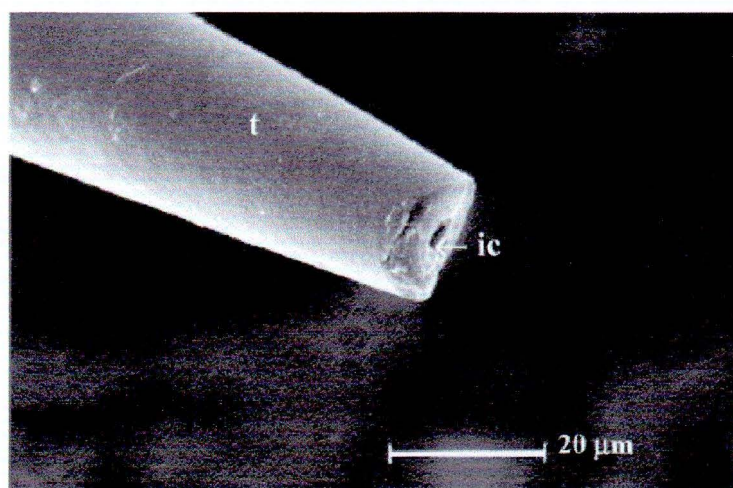


Figura 10: Extremidade (t) quebrada da cerda mostrando o canal interno (ic) (Veiga *et alli*, 2001).

## OBJETIVOS

Os acidentes provocados pelo contato com as lagartas de *L. obliqua* são bastante freqüentes e graves, constituindo um problema de saúde pública no sul do Brasil. Os sintomas provocados por esse acidente evidenciam uma riqueza de princípios ativos anti-hemostáticos.

Nosso objetivo, portanto, é buscar uma melhor compreensão dos mecanismos que levam ao quadro clínico característico desse acidente, bem como caracterizar os princípios ativos. Esperamos, dessa forma, contribuir para a busca de tratamentos mais adequados para as vítimas do envenenamento.

O estudo de princípios anti-hemostáticos contribui ainda para o desenvolvimento de drogas anti-trombóticas e para uma melhor compreensão do próprio sistema hemostático.

Formulamos como objetivos específicos desse trabalho, proceder uma comparação das seguintes atividades dos diferentes materiais obtidos a partir das lagartas *L. obliqua*, a saber:

- a) extrato de espículas;
- b) extrato de tegumento;
- c) hemolinfa;
- d) secreção de estresse térmico.

Foram procedidos os seguintes estudos:

1. alteração da cinética de coagulação do plasma humano normal, plasma humano deficiente em fator X e plasma humano depletado de protrombina;
2. atividade sobre a fibrinocoagulação induzida por trombina;
3. degradação de fibrinogênio e de fibrina;
4. atividade sobre substratos cromogênicos;
5. ativação de fator X; e
6. atividade fosfolipásica.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Lagartas *Lonomia obliqua*

As lagartas utilizadas na produção das amostras analisadas foram coletadas no seu ambiente, em diversas localidades no Rio Grande do Sul e Santa Catarina, sendo cedidas ao nosso grupo de pesquisa pelo Centro de Informações Toxicológicas (CIT) de Porto Alegre, pela Secretaria Municipal de Saúde de Santa Cruz do Sul, pela EMBRAPA de Passo Fundo, pelo Corpo de Bombeiros de Erechim (todos no Rio Grande do Sul) e pela Secretaria Municipal de Saúde de Chapecó e pela Secretaria Municipal de Videira, ambos em Santa Catarina. As taturanas foram mantidas em laboratório em condições de controle térmico e de umidade adequadas e em condições de segurança apropriadas.

Baseado nos estudos bioquímicos realizados com *L. achelous* realizado com o extrato de espículas e com hemolinfa (Arocha-Piñango et alli, 1973; Arocha-Piñango et alli, 2000; Arocha-Piñango e Guerrero, 2001), além dos trabalhos realizados com *L. obliqua* com extrato de espículas (Donato et alli, 1998; Reis et alli, 2001 a e b), e, principalmente, nos trabalho histológico realizado pelo nosso grupo que verificaram a ausência de uma glândula individual de veneno nas espículas (Veiga et alli, 2001), foram produzidos os seguintes materiais de estudo:

- a) extrato de espículas;
- b) extrato de tegumento;
- c) hemolinfa.

Essa abordagem, utilizando diversos materiais ou extratos de *L. obliqua* parece também coerente com os acidentes que envolvem esse animal, visto que muitas vezes ocorre o esmagamento do mesmo, expondo a vítima a diversas secreções presentes no corpo da taturana.

As amostras foram produzidas utilizando-se lagartas vivas, imobilizadas em placas de Petry a  $-20^{\circ}\text{C}$  por cinco minutos, mantendo as placas no gelo durante todo o procedimento.

As espículas foram coletadas cortando-as junto à base, o tegumento foi coletado após a remoção da cabeça, do trato digestivo e do tecido nervoso e muscular e a hemolinfa foi coletada ao ser removida a cabeça, as espículas ou os pseudópodes das lagartas. No caso do

tegumento ou das espículas, o material coletado foi macerado em *potter* (Potter Elvehjem-Style Tissue Homogenizer) com água milli-Q.

Além desses materiais foi utilizado ainda o extrato de estresse térmico, obtido quando as lagartas são submetidas a  $-20^{\circ}\text{C}$  por um período superior a 24 horas. Nessas condições, as lagartas secretam um fluido rico em proteínas e princípios ativos. Após esse período, cada lagarta é lavada com 1 ml de água milli-Q.

Todas as amostras obtidas são centrifugadas a 9600 g por 20 minutos e o sobrenadante é coletado e estocado a  $-20^{\circ}\text{C}$ . As amostras utilizadas nos ensaios foram padronizadas para uma concentração de 1 mg de proteína/ml.

### **Reagentes**

As soluções utilizadas foram preparadas com reagentes de grau analítico.

Plasma humano citratado foi cedido pelos Bancos de Sangue do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e do Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS).

Protrombina e trombina foram purificadas em nosso laboratório a partir de plasma humano citratado, usando o método de Ngai e Chang (1991) e de Ding e Xu (1995), respectivamente, ambos devidamente adaptado às nossas condições.

Os substratos cromogênicos S-2222, S-2238, S-2366, S-2302, 2444, S-2390 foram adquiridos da Chromogenix (Suécia). O DL-BAPNA foi adquirido da Sigma (EUA).

HEPES, plasmina, fibrinogênio bovino, albumina, ovalbumina, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, anidrase carbônica, tripsinogênio,  $\alpha$ -lactalbumina e Comassie Brilliant Blue-G foram adquiridos da Sigma (EUA). Os demais reagentes têm as seguintes origens: SBTI (Soybean Trypsin Inhibitor) (Ilka, EUA), cloreto de cálcio (MERCK, EUA), cloreto de sódio (Reagen, Brasil).

O sistema para eletroforese (SDS-PAGE) foi adquirido da BIO-RAD (EUA).

## Dosagem de Proteína

Para a dosagem de proteína das amostras utilizou-se o sistema BCA Protein Assay (Pierce), o qual é baseado no ácido bicinconínico (BCA) para a detecção colorimétrica e para a quantificação de proteína total. O método combina a redução de  $\text{Cu}^{+2}$  a  $\text{Cu}^{+1}$  na presença de proteínas em meio alcalino com detecção colorimétrica altamente sensível e seletiva do cátion  $\text{Cu}^{+1}$ , utilizando um único reagente contendo ácido bicinconínico. O produto da reação, de tonalidade púrpura, é formado pela quelação de duas moléculas de BCA com um íon  $\text{Cu}^{+1}$ . O complexo apresenta alta absorvância a 562 nm, a qual é linear com o aumento da concentração de proteína. Utilizou-se o protocolo do manual de instruções do *BCA Protein Assay Kit* (Catálogo Pierce, EUA).

## Ensaio de Coagulação do Plasma Humano

Para analisar o efeito das amostras de *L. obliqua* sobre a coagulação do plasma humano, utilizou-se o ensaio funcional do tempo de recalcificação (Hougie, 1963), adaptado para o sistema de ensaio tipo ELISA (Ribeiro *et alli*, 1995).

Em volume final de 160  $\mu\text{l}$ , diferentes quantidades das amostras, num máximo de 20  $\mu\text{l}$  ou a mesma quantidade de água milli-Q, foram misturadas com 10  $\mu\text{l}$  de  $\text{CaCl}_2$  150 mM e 80  $\mu\text{l}$  de tampão Hepes 20 mM, pH 7,4. A reação foi disparada pela adição de 50  $\mu\text{l}$  de plasma humano citratado.

Essa modificação do ensaio que normalmente é disparado com a adição de cálcio e que contém uma pré-incubação das amostras com o plasma, deve-se ao fato de que o extrato de espículas é capaz de coagular o plasma mesmo na ausência de cálcio, tornando impossível uma comparação entre as atividades dos quatro materiais, objetivo do nosso trabalho.

A reação foi analisada em espectrofotômetro SpectraMax (Molecular Devices, EUA) durante 20 minutos, com leituras a cada 15 segundos a 650 nm. Nesse ensaio é possível acompanhar a cinética de reação e o tempo de coagulação que foi definido como o tempo necessário para atingir uma absorvância de 0,05 unidades de densidade óptica a 65 nm em cada poço da placa de ELISA.

O ensaio de recalcificação do plasma humano também foi realizado com plasma humano deficiente em fator X e plasma humano depletado de protrombina.

## Fibrinocoagulação Catalisada por Trombina

As amostras de *L. obliqua* em diferentes quantidades (2,5, 5 e 10 µg) foram pré-incubadas a 37° C com tampão Hepes 20mM, pH 7,4, totalizando 50 µl mais 40 µl de fibrinogênio bovino a 5 mg/ml. Após 5 minutos, 10 µl de uma solução de trombina humana purificada a 0,02 mg/ml foram adicionados e a cinética da reação de fibrinocoagulação (formação de fibrina) foi monitorada a 650 nm, durante 20 minutos com leituras em intervalos de 15 segundos no equipamento SpectraMax.

## Ensaio de Atividade Amidolítica

A fim de caracterizar as atividades amidolíticas dos extratos de *L. obliqua* foi utilizado o substrato cromogênico DL-BAPNA bem como diversos tripeptil-*p*-nitroanilidas mais específicos para enzimas que atuam na cascata de coagulação: trombina (S-2238), fator Xa (S-2222), fator Xia (S-2366), calicreína plasmática (S-2302), uroquinase (S-2444) e plasmina (S-2390). A cinética de reação é acompanhada pelo aumento da absorbância a 405 nm, absorbância máxima da *p*-nitroanilina, substância liberada quando os substratos cromogênicos são hidrolisados. A reação é acompanhada no SpectraMax durante 20 minutos com leituras a cada 15 segundos. O parâmetro analisado é a velocidade máxima de reação, dada pela tangente da curva de absorbância do produto formado pelo tempo.

Cada reação cujo volume final é de 100 µl contém 20 µl das amostras, 40 µl de tampão Hepes 20 mM (pH 7,4), na presença e na ausência de 10 mM de CaCl<sub>2</sub>. As reações foram iniciadas com a adição de 10 µl de substrato cromogênico específico (0,2mM).

A atividade enzimática foi expressa em U/mg de proteína, sendo uma unidade (U) a quantidade de enzima necessária para produzir 1 pmol de *p*-nitroanilina em 1 minuto de reação a 37° C nas condições especificadas.

## **Ativação de Fator X**

Para medir a ativação de fator X foi verificado o aumento da hidrólise do substrato cromogênico específico para fator Xa (S-2222). O ensaio foi realizado utilizando-se os reagentes do kit de determinação da atividade de fator VIII:C no plasma (Chromogenix, Suécia), o qual é composto por uma solução de fosfolípídeos, uma solução de cálcio e uma mistura de fator Xa e fator X que na presença do fator VIII presente no plasma a ser testado formarão o complexo “tenase”, ativado o fator X que irá hidrolisar o substrato cromogênico S-2222, específico para fator Xa tampão. Ocorreu a adaptação do protocolo para o volume de reação compatível com o SpectraMax ao qual se adicionou 5 µl das diferentes amostras em cada poço. Além disso a solução de fator IX e fator X foi substituída por uma solução contendo apenas fator X.

## **Eletroforese em Gel de Poliacrilamida**

Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE) foi executada utilizando-se o método de Laemmli (1970), usando-se gel de empacotamento a 5% e gel de corrida a 10%.

Albumina bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (36 kDa), anidrase carbônica (29 kDa), tripsinogênio (24 kDa), SBTI (20,1 kDa),  $\alpha$ -lactalbumina (14,2 kDa) e aprotinina (6,5 kDa) foram utilizadas como proteínas padrão de massa molecular conhecida. Os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue-G.

## **Degradação do Fibrinogênio**

A degradação de fibrinogênio pelos quatro extratos de *L. obliqua* foi analisada em SDS-PAGE. Fibrinogênio bovino (20 µg) foi incubado com os quatro diferentes extratos (10 µg) por 10 minutos 37° C. Tampão de amostra contendo o agente redutor ( $\beta$ -mercaptoetanol, 5% v/v) foi adicionado, as amostras foram fervidas e aplicadas no gel.

### Degradação de Fibrina

A análise da degradação de fibrina foi realizada pelo método modificado de Datta et. alli (1995). Brevemente, 150  $\mu\text{g}$  de fibrinogênio bovino foram misturados com 0,2  $\mu\text{g}$  de trombina humana purificada. O coágulo foi formado a 37° C por uma hora. As amostras (20  $\mu\text{g}$ ) foram adicionadas a cada coágulo formado e incubadas a 37° C por 10 minutos e por 24 horas. As reações foram paradas com a adição de 50  $\mu\text{l}$  de solução desnaturante (uréia 8M, SDS 4%, b-mercaptoetanol 4%). As proteínas desnaturadas foram então analisadas em SDS-PAGE.

A fim de comparar a atividade fibrinolítica das amostras com a atividade presente em uma enzima conhecida, utilizou-se 20  $\mu\text{l}$  de plasmina (0,1 U/ml), uma enzima fisiológica com atividade fibino(geno)lítica, ensaiando-a nas mesmas condições das amostras de *L. obliqua*.

### Atividade Fosfolipásica

Esse ensaio é baseado no fato de que enzimas com atividade fosfolipásica, ao agir sobre fosfatidilcolina, produzem lisofosfatidilcolina. Essa molécula insere-se em membranas plasmáticas produzindo lise celular.

Assim sendo, extrato de gema de ovo (50 $\mu\text{l}$ ) foi pré-incubado durante 1 hora a 37° C hora com quantidades crescentes dos extratos de *L. obliqua* (3, 10 e 30  $\mu\text{g}$ ). A reação, dependete da presença de íon cálcio, foi cessada utilizando-se o quelante EDTA. Adicionou-se, então, 1,2 ml de solução 2% de eritrócitos de coelho. Após duas horas, a hemólise foi medida no SpectraMax a 578 nm. O controle positivo (100% de hemólise) foi obtido adicionando-se 3,5 ml de água destilada à solução de eritrócitos.



## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Atividade Pró-Coagulante

Para verificar a atividade dos extratos de *L. obliqua* sobre a dinâmica de coagulação foi monitorada a cinética de recalcificação do plasma humano na presença dos mesmos (figura 11).

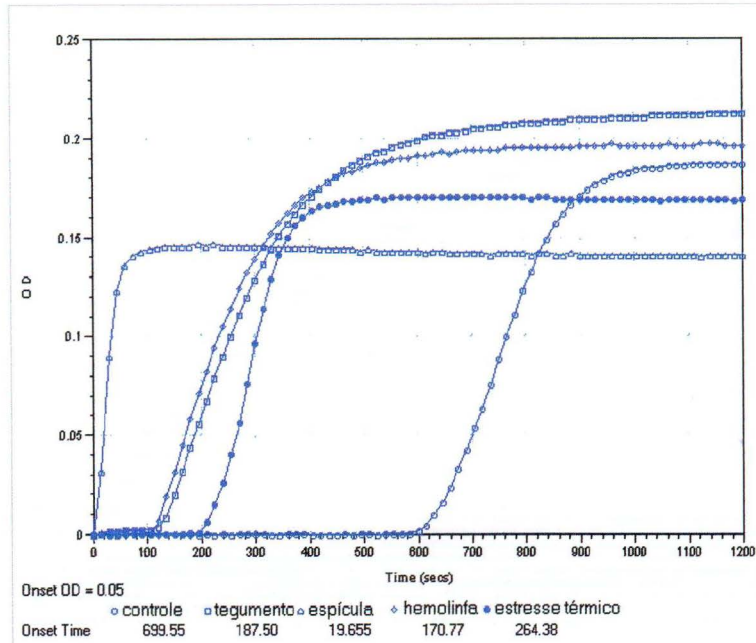
Todas amostras de *L. obliqua* apresentaram atividade pró-coagulante, diminuindo o tempo de recalcificação do plasma humano de forma dose-dependente. O extrato de espículas apresentou a maior atividade pró-coagulante sendo seguida pelo extrato de tegumento e pela hemolinfa. O extrato de estresse térmico apresentou a menor atividade pró-coagulante.

Foi verificado também que o extrato de espículas é capaz de coagular o plasma mesmo na ausência de cálcio (dado não mostrado). É interessante notar ainda que a dinâmica de coagulação do plasma humano fica alterada, apresentando uma densidade óptica menor que o controle. Tal atividade deve ser devido à inibição da atividade do fator XIII, transglutaminase responsável pela ligação cruzada entre as moléculas de fibrina na formação do coágulo, visto que essa atividade já foi descrita em *L. achelous* (Guerrero et alli, 1997 a e b; Guerrero et alli, 1999), sendo verificada também um nível reduzido de fator XIII em pacientes que tiveram contato com *L. obliqua* e *L. achelous* (Zannin, 2002; Piñango et alli, 2000; Piñango e Guerrero, 2001).

A potente atividade pró-coagulante dos extratos está de acordo com a coagulação intravascular que ocorre nos pacientes que tiveram contato com *L. obliqua* (Zannin, 2002; Piñango et alli, 2000; Piñango e Guerrero, 2001). Para verificar de que forma se dá essa atividade, realizou-se uma série de ensaios subseqüentes.

A fim de verificarmos se a atividade pró-coagulante não era conseqüência de uma ação direta sobre fibrinogênio, de forma semelhante à trombina, produzindo fibrina, foi realizado o ensaio de recalcificação do plasma humano com plasma depletado de protrombina (figura 12 B). As amostras não foram capazes de coagular o plasma sem protrombina, mesmo na presença de cálcio. Com o intuito de verificarmos se o plasma ainda mantinha as suas propriedades, ou seja, se ele ainda era capaz de coagular, foi adicionada trombina (0,8 µg) no controle. Conforme o esperado, na presença de trombina o plasma coagulou (figura 12 A).

A



B

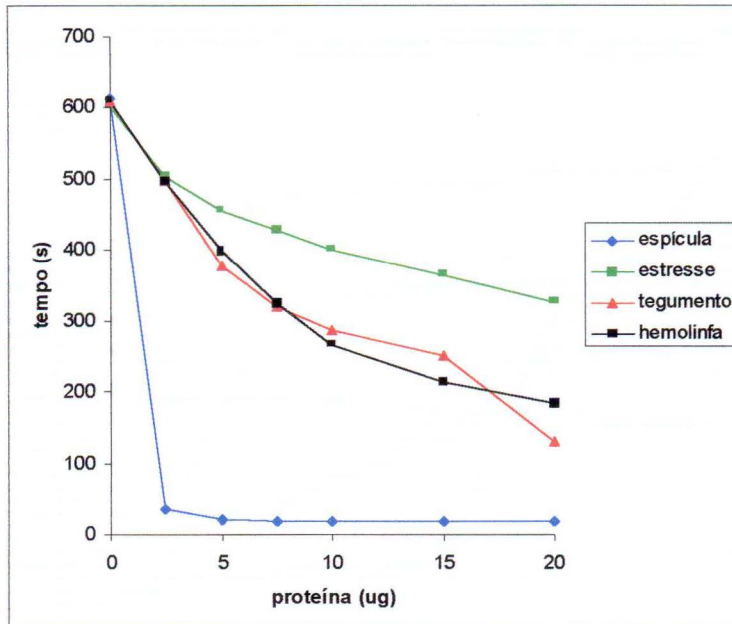


Figura 11: Atividade pró-coagulante das quatro amostras de *L. obliqua* determinada pelo tempo de recalcificação do plasma humano normal. A. 20 mg de cada amostra foram adicionadas à reação. Absorbância mediada a 650 nm. B. Tempo de recalcificação do plasma humano normal em função do tempo. Nota-se a relação dose-dependente e a grande atividade apresentada pelo extrato de espículas.

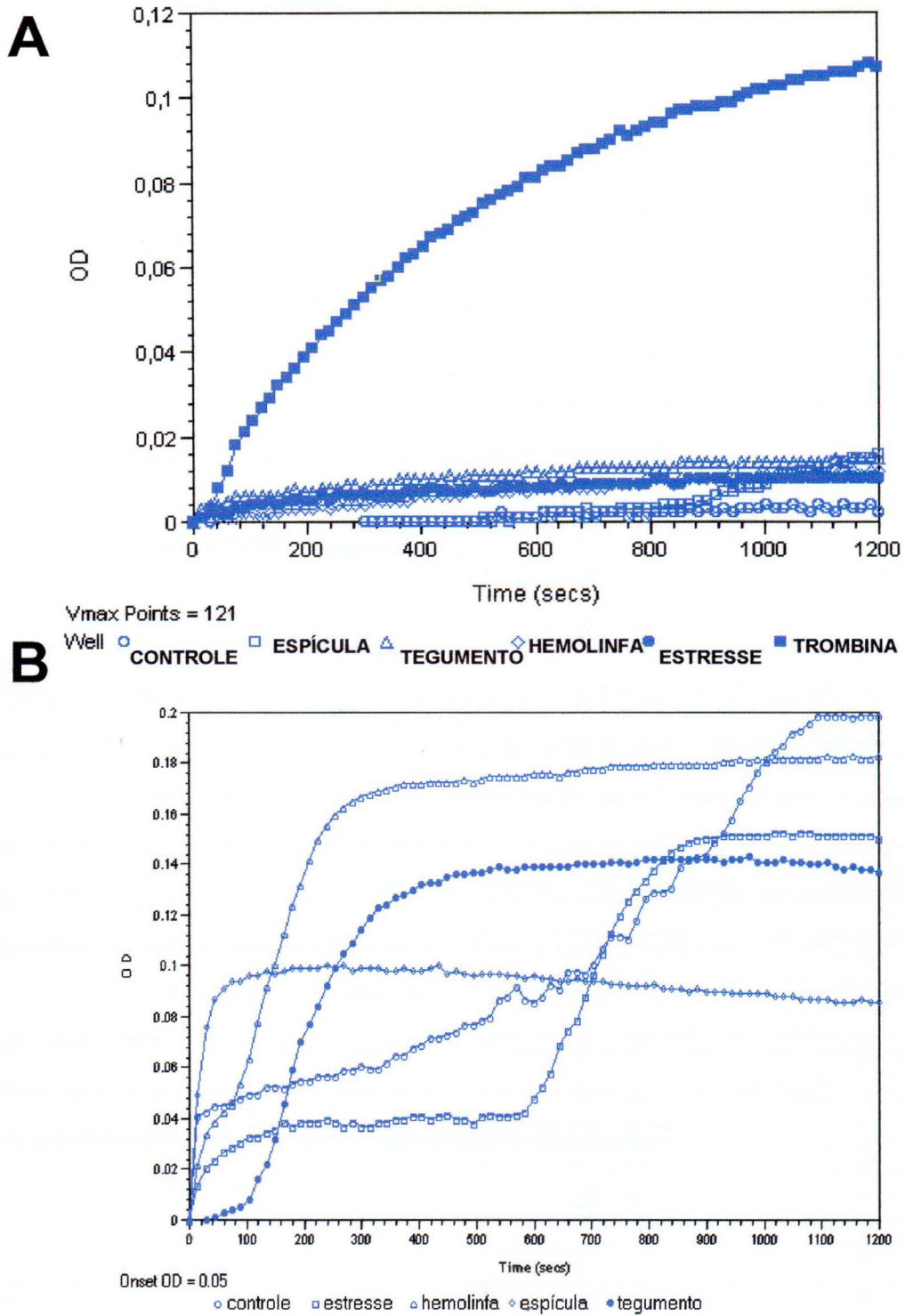


Figura 12: **A.** Atividade das amostras (20 mg) de *L. obliqua* sobre plasma sem protrombina. Nenhuma mostra foi capaz de coagulá-lo. Trombina foi utilizada como controle positivo. **B.** Atividade dos quatro extratos (20 mg) sobre a dinâmica de coagulação do plasma deficiente em fator X.

Buscando tornar mais clara a compreensão sobre a ação pró-coagulante dos extratos, foi utilizado ainda o ensaio de recalcificação de plasma humano deficiente em fator X (figura 12 B). A deficiência de fator X alterou a dinâmica de coagulação do plasma, o que pode ser verificado pelo controle. Os extratos de espículas e de tegumento e a hemolinfa mantiveram sua atividade pró-coagulante, encurtando o tempo da reação. O extrato de estresse térmico não apresentou essa atividade. Esses resultados indicam que as atividade pró-coagulante dos extratos de espícula e tegumento e da hemolinfa devem-se principalmente à uma atividade ativadora de protrombina. O extrato de estresse térmico deve estar atuando preferencialmente em outro ponto da cascata de coagulação.

### **Atividade Fibrinogenolítica**

O efeito dos extratos de *L. obliqua* também foram testados no ensaio de fibrinocoagulação catalisada por trombina, um refinamento do ensaio de coagulação que utiliza os reagentes purificados, sendo portanto uma reação específica (figura 13 A).

Observou-se que numa curta incubação com fibrinogênio (5 minutos), os extratos de tegumento, a hemolinfa e a secreção de estresse térmico apresentaram atividade inibitória da fibrinocoagulação, sendo o efeito dose-dependente. O extrato de espículas não apresentou atividade no tempo testado. A maior atividade foi da secreção de estresse térmico.

Para confirmar se essa ação ocorria devido à uma degradação do fibrinogênio, e não uma consequência da inibição da atividade da trombina, foi analisada a degradação do fibrinogênio em SDS-PAGE (figura 13 B). Em 10 minutos de incubação, apenas a hemolinfa e a secreção de estresse térmico degradaram o fibrinogênio.

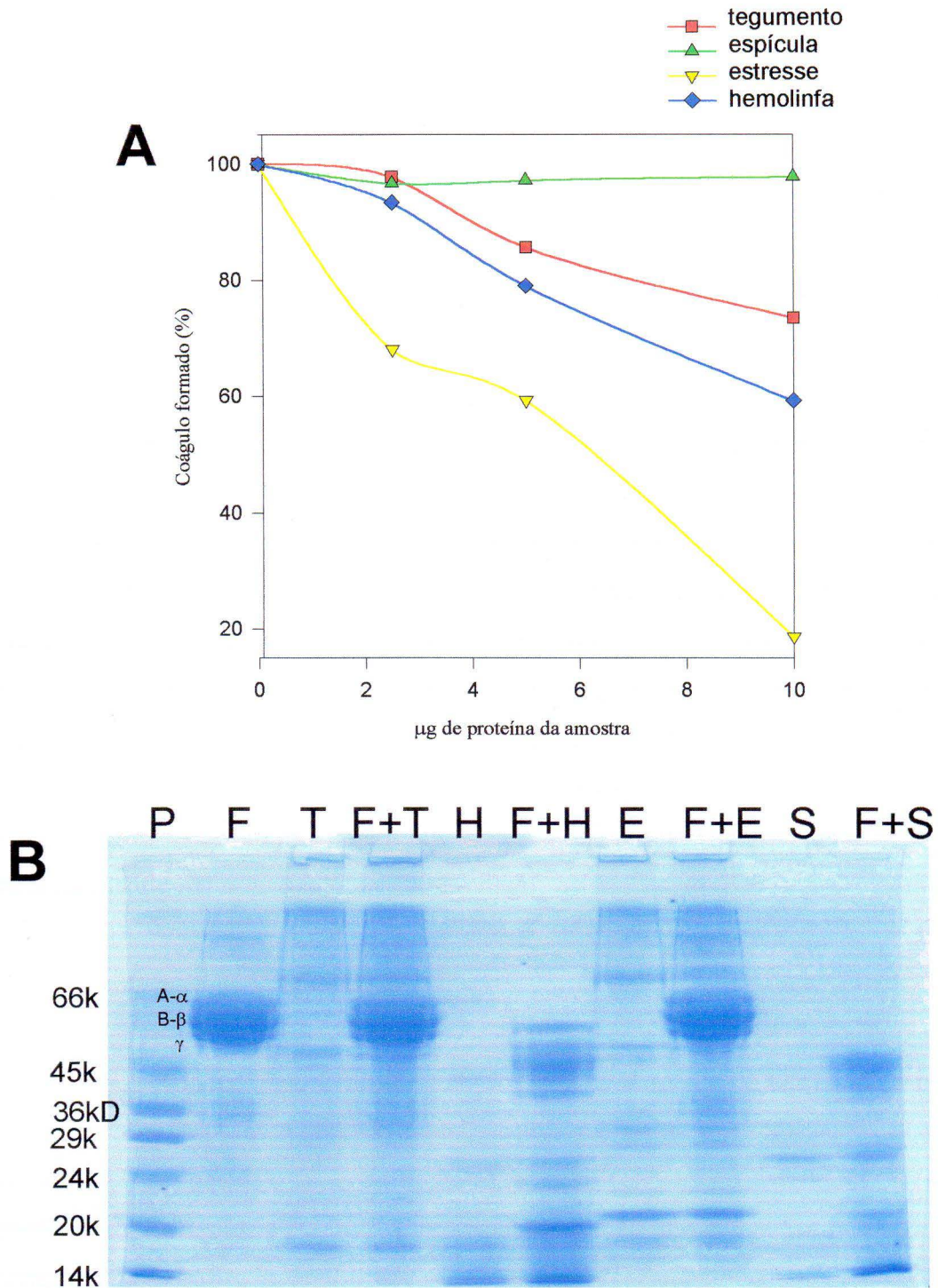


Figura 13: Atividade fibrinogenolítica analisada por: **A)** fibrinocoagulação catalisada por trombina. Diferentes quantidades (2,5, 5 e 10  $\mu\text{g}$  de proteína) das quatro amostras foram pré-incubadas por 5 minutos com fibrinogênio. O gráfico mostra o caráter dose-dependente assim como a alta atividade presente no extrato de estresse térmico. **B)** análise por SDS-PAGE confirmando o dado acima e mostrando o padrão de degradação do fibrinogênio. P: padrão de peso molecular. F: fibrinogênio com suas cadeias A-a, B-b e g. T: extrato de tegumento. E: extrato de espículas. S: secreção de estresse térmico.

### **Atividade Fibrinolítica**

A análise da degradação de fibrina pelas amostras de *L. obliqua* (figura 14) mostram que em 10 minutos de incubação apenas a secreção de estresse térmico apresentou atividade fibrinolítica, degradando principalmente a cadeia  $\alpha$  da fibrina.

Já em 24 horas de incubação, todas as amostras apresentaram algum grau de degradação da fibrina. A maior atividade foi apresentada pela secreção de estresse térmico que degradou quase totalmente tanto a cadeia alfa quanto a cadeia beta da fibrina. À secreção de estresse térmico seguiram-se a hemolinfa e o extrato de tegumento; o extrato de espículas apresentou a mais baixa atividade fibrinolítica. O padrão de degradação da fibrina apresentado pelas amostras é diferente do padrão de degradação apresentado pela enzima plasmina.

As atividades fibrino(geno)líticas encontradas nos extratos de *L. obliqua* estão de acordo com os resultados encontrados nos estudos bioquímicos com *L. achelous* que evidenciaram enzimas fibrinolíticas e enzimas capazes de degradar coágulos (Arocha-Piñango *et alli*, 1973; Sangrona e Piñango, 1998; Marval *et alli*, 1999). Tais resultados também são coerentes com os acidentes com *L. obliqua* e *L. achelous* que levam a uma diminuição dos níveis sangüíneos de fibrinogênio e um aumento dos produtos de degradação do fibrinogênio (Arocha-Piñango *et alli*, 2000; Arocha-Piñango, 2001; Zannin, 2002).

### **Atividade Fosfolipásica**

A atividade tipo fosfolipase  $A_2$  foi detectada apenas no extrato de espículas.

Fosfolipases  $A_2$  podem interferir pelo menos de duas formas na hemostasia, seja nas reações da cascata de coagulação que envolvem os fosfolipídeos como superfície catalítica nos complexos “tenase” e protrombinase, seja nas plaquetas que têm sua ativação mediada pela hidrólise de fosfolipídeos de membrana (Marcus e Safier, 1993).

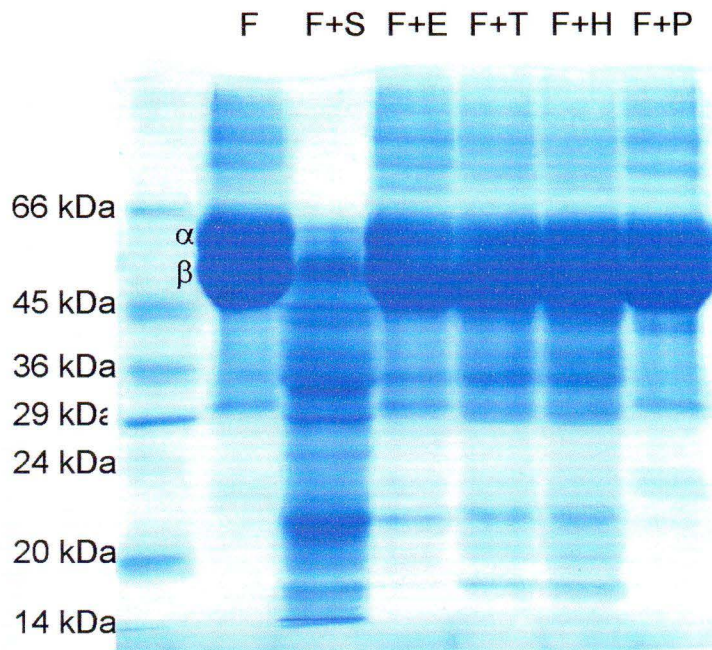
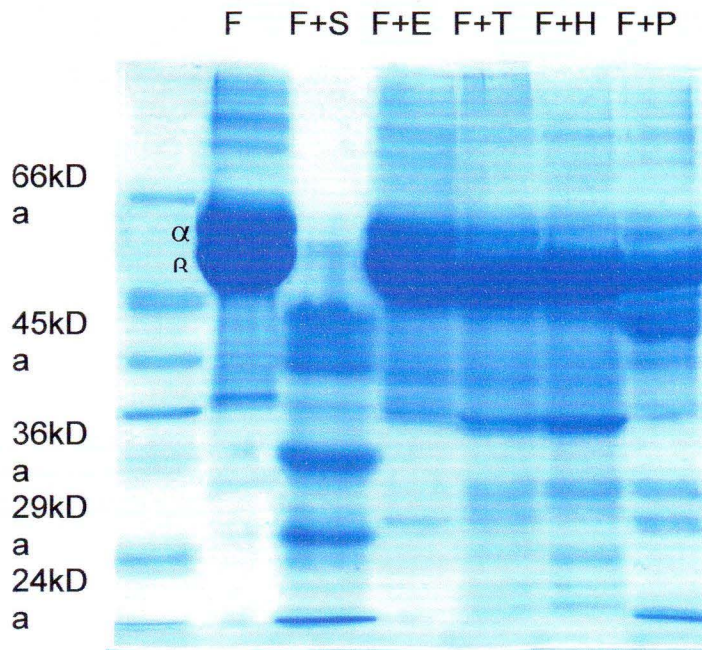
**A****B**

Figura 14: Atividade Fibrinolítica: análise em SDS-PAGE da atividade dos diferentes extratos, (20  $\mu$ g) sobre a fibrina, com incubações de 10 minutos (A) e 24 horas (B). Fica clara a potente ação da secreção de estresse térmico (S) já em 24 horas e da atividade preferencial sobre a cadeia  $\alpha$  da fibrina. Plasmina (P) foi utilizada como controle positivo.

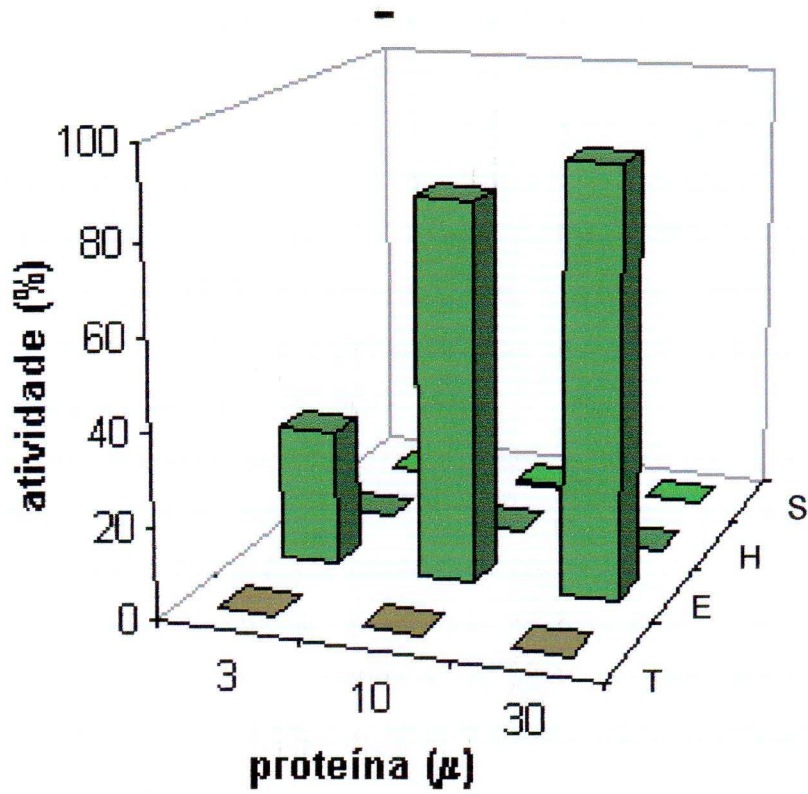


Figura 15: Atividade tipo-fosfolipase A<sub>2</sub> medida pela hemólise indireta de eritrócitos de coelho utilizando gema de ovo como substrato. Apenas o extrato de espícula apresentou atividade a qual mostrou-se dose-dependente.



### Atividade Amidolítica

A fim de verificar a presença de serino-proteases nos extratos de *L. obliqua*, utilizou-se ensaios com substratos cromogênicos (figura 16). Devido ao fato de que diversas reações da cascata de coagulação e outras enzimas são dependentes ou ativadas pela presença de cálcio, os ensaios foram realizados na presença e na ausência de  $\text{CaCl}_2$ .

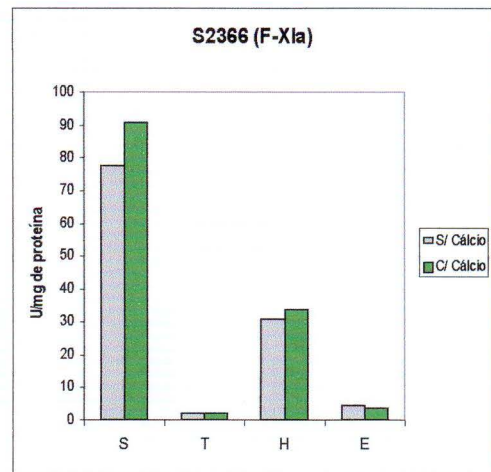
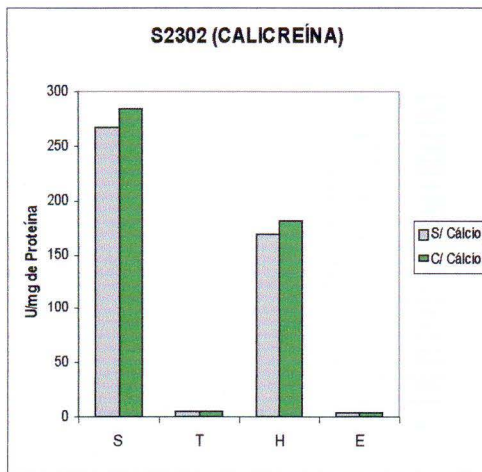
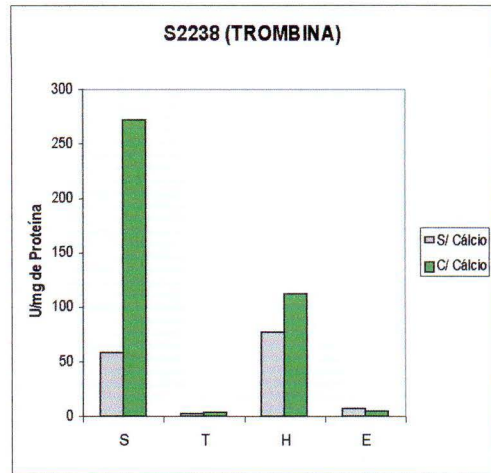
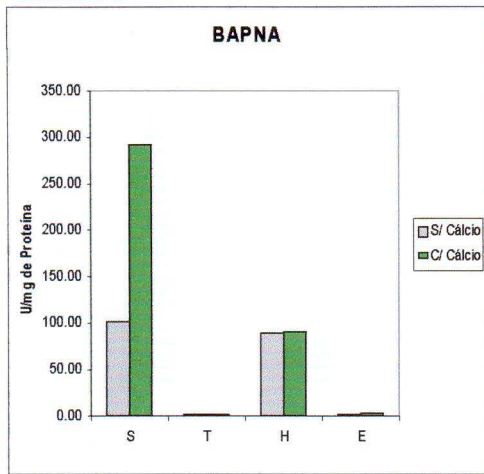
Foram testados os substratos DL-BAPNA, substrato genérico de serino-proteases, de caráter inespecífico, e os substratos cromogênicos mais específicos S-2238 (trombina), S-2390 (plasmina), S-2444 (uroquinase), S-2302 (calicreína) e S-2366 (fator XIa). O extrato de congelamento e a hemolinfa apresentaram, em todos os casos, destacada atividade amidolítica, nitidamente maior na presença do íon cálcio. A ativação por  $\text{Ca}^{++}$  foi mais acentuada na secreção de estresse térmico.

A maior atividade amidolítica foi apresentada pela secreção de estresse térmico que atingiu seu maior nível sobre o substrato de uroquinase S-2444, enquanto a menor atividade foi registrada com o S-2366, substrato de fator XIa.

A intensa ação amidolítica presente na hemolinfa e na secreção de estresse térmico indica que ocorre uma diversidade de enzimas nessas amostras com diferentes atividades, sugerindo ainda uma possível ação sinérgica dessas atividades, potenciando a ação do veneno de *L. obliqua*.

É surpreendente o fato de que os extratos de tegumento e de espículas apresentaram uma atividade amidolítica muito baixa sobre os substratos testados, mesmo na presença do íon cálcio.

O estudo com substratos cromogênicos já havia sido realizado com *L. achelous*. Foi testada uma fração do veneno sobre diversos substratos cromogênicos (S-2444, S-2302, S-2222, S-2322, S-2266, S-2227, S-2251, S-2238, S-2388, S-2160) sendo detectada maior atividade, também sobre o substrato S-2444.



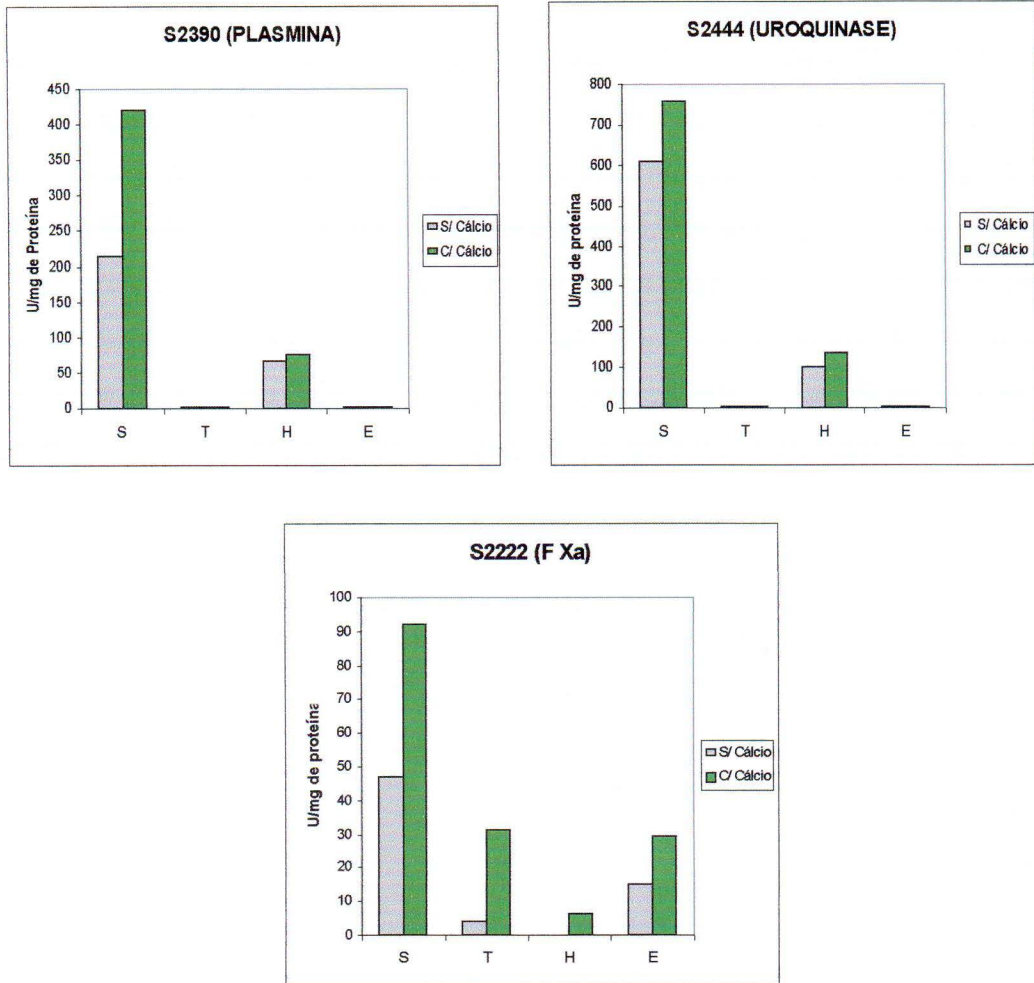


Figura 16: Atividade amidolítica dos diferentes materiais de *L. obliqua* sobre diferentes substratos cromogênicos na presença e na ausência de cálcio. Destacam-se as atividades apresentadas pela secreção de estresse térmico (S) e pela hemolinfa (H). Suas atividades foram aumentadas pela presença de cálcio. Os extratos de tegumento e de espículas tiveram baixa atividade.

### **Ativação de Fator X**

Os extratos demonstraram atividade ativadora de fator X conforme medido pelo aumento da hidrólise do substrato cromogênico específico para fator Xa (S-2222). O efeito ativador foi marcadamente significativo no extrato de tegumento e na secreção de estresse térmico. Essa atividade já havia sido descrita por essa mesma técnica no extrato de espículas (Donato *et alli*, 1998). Nossos resultados mostram, no entanto, que a maior atividade está presente no extrato de tegumento e na secreção de estresse térmico. Esse dado corrobora a hipótese de que a secreção de estresse térmico não estaria, ao contrário dos demais extratos, atuando preferencialmente sobre a ativação de protrombina, como ficou evidenciado nos experimentos de recalcificação de plasma humano, e sim sobre a ativação de fator X.

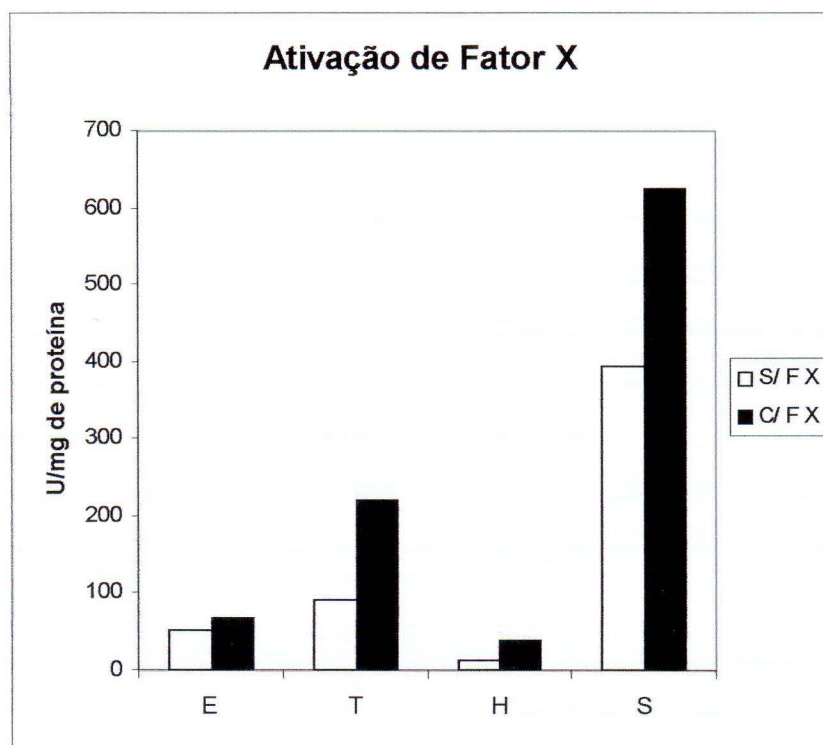


Figura 17: Ativação de fator X medida pelo aumento da hidrólise do substrato cromogênico S-2222 na presença de fator X. Todas as amostras apresentaram um aumento da atividade amidolítica, especialmente o extrato de tegumento e a secreção de estresse térmico.

## CONCLUSÃO

A coagulação intravascular disseminada, também chamada de síndrome da defibrinação ou de coagulopatia de consumo, pode ser definida como a formação de fibrina solúvel associada à degradação de fibrina e fibrinogênio resultante de atividade proteásica não regulável no sangue (Williams, 1998). A coagulopatia de consumo geralmente ocorre como consequência da geração de trombina, plasmina e outras proteases em quantidades suficientes para sobreporem-se aos mecanismos regulatórios. Dependendo dos níveis relativos de formação de fibrina e da ação fibrinolítica, a coagulação intravascular disseminada pode ser assintomática, pode causar hemorragia intensa ou trombos intravasculares, ou ainda simultaneamente hemorragia e trombose (Williams, 1998)

Os sintomas resultantes do envenenamento causado por *L. obliqua* e *L. achelous* estão de acordo com essa definição, sendo todavia, aparentemente favorecido o componente fibrinogenolítico.

Os resultados apresentados nesse trabalho sugerem um modelo coerente de como o veneno de *L. obliqua* age no desenvolvimento dessa síndrome hemorrágica (figura 18) :

- A atividade pró-coagulante sobre o plasma normal apresenta-se bastante intensa no extrato de espículas, mostrando-se dose dependente. Tal atividade, embora em menor nível, também está presente nos demais materiais.
- As amostras não foram capazes de coagular diretamente o plasma depletado de protrombina, mostrando que a atividade pró-coagulante não ocorre pela ação direta sobre fibrinogênio.
- Os ensaios feitos com plasma deficiente em fator-X sugerem que o homogenado de espícula e o de tegumento, além da hemolinfa atuam preferencialmente sobre pró-trombina. A amostra obtida por estresse térmico deve estar atuando em outro ponto da cascata de coagulação.
- O extrato de espículas apresentou potente atividade de fosfolipase A<sub>2</sub>, o que pode estar relacionado com a alteração de certas reações químicas da coagulação sangüínea e da agregação plaquetária dependentes de fosfolípidos.
- A atividade fibrino(geno)lítica apresentou-se mais intensa no extrato de estresse térmico. A hemolinfa também apresentou tal atividade. Os extratos de espícula e de tegumento apresentaram uma atividade muito reduzida.

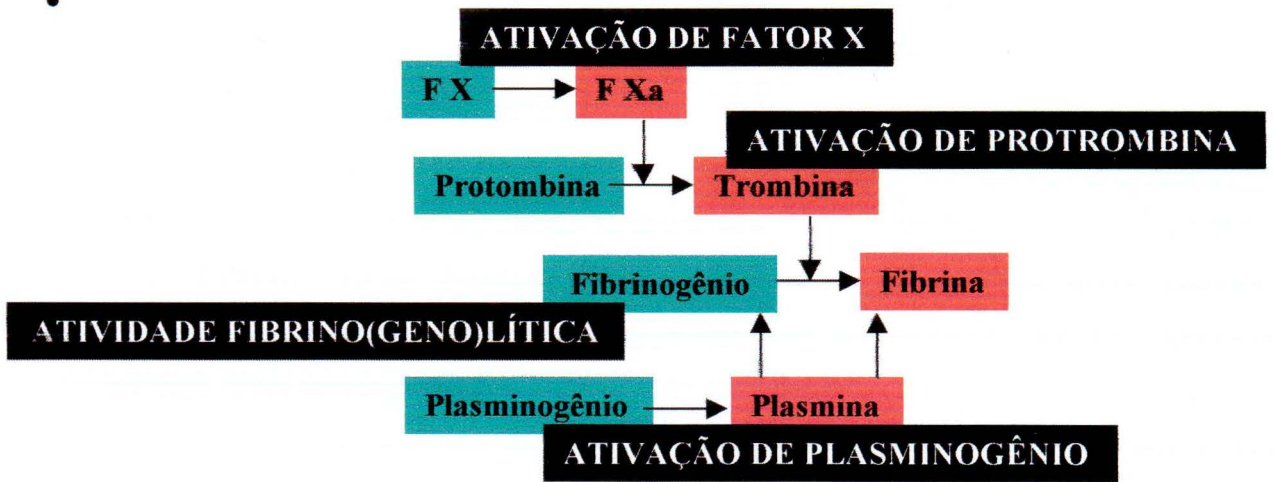


Figura 18: Modelo de atuação principal do veneno de *Lonomia obliqua*.

A ativação de fator X apresentada pelos extratos de tegumento e, principalmente, pela secreção de estresse térmico, indicam que esse é um importante mecanismo anti-hemostático apresentado pelo veneno.

- A atividade amidolítica foi elevada nas secreções de estresse térmico, apresentando-se menor na hemolinfa e sendo muito reduzida nos extratos de espícula e de tegumento. Essas atividades foram ativadas na presença de cálcio. A atividade sobre diferentes substratos sugere que os princípios ativos presentes no veneno da taturana são capazes de interferir sobre diversas reações da cascata de coagulação.
- Os resultados mostram que os diferentes materiais obtidos da taturana apresentam atividades distintas e, às vezes paradoxais, às vezes complementares, indicando que as ações do veneno não estão confinadas em nenhuma secreção específica da taturana.
- Os efeitos anti-hemostáticos do quadro hemorrágico causado pelo contato com a lagarta parecem resultar da interação de diferentes princípios ativos presentes nos diferentes materiais provenientes de *L. obliqua*.

Nosso trabalho demonstra então que o veneno de *L. obliqua* ativa protrombina, dado esse confirmado por experimentos realizados utilizando-se protrombina e o substrato S-2238 mostrando que as amostras, especialmente o extrato de espículas, ativam protrombina, especialmente o extrato de espículas (Veiga, 2001). A ativação de protrombina é reforçada ainda pela ativação de fator X, promovida especialmente pelo extrato de estresse térmico.

A degradação do fibrinogênio e da fibrina, é promovida pela atividade fibrino(geno)lítica presente nas amostras. Recentemente foi purificada pelo nosso grupo uma enzima de 30 kDa responsável por essa atividade presente na secreção de estresse térmico, a Lonofibrase (Pinto, 2002). A atividade fibrinogenolítica foi descrita ainda no extrato de espículas (Gouveia *et alli*, 2002). Resultados obtidos pelo nosso grupo demonstram ainda que o veneno atua também ativando o plasminogênio (Silva-da-Silva *et alli*, 1999).

As atividades fosfolipásica e amidolítica sobre diversos substratos cromogênicos, assim como outras atividades do veneno que vêm sendo descritas pelo nosso grupo, tais como a ação sobre o sistema calicreína cinina, evidenciada por uma atividade cininásica e atividade tipo-bradicinina (Bohrer *et alli*, 2002), sugerem ainda que o veneno pode atuar de forma alternativa na desregulação da hemostasia.

Tal modelo parece mais coerente com o quadro característico da coagulopatia de consumo do que a proposta de que o ativador de protombina isolado do extrato de espículas



(Lopap) seria o responsável pela síndrome hemorrágica (Reis *et alli*, 1999; Reis *et alli*, 2001 a e b), sugerindo inclusive a administração do mesmo no combate à trombose (Pesquisa FAPESP, 2001) o que provavelmente só agravaria o quadro dos pacientes tratados por tal princípio ativo. A ativação da protrombina só explica uma parte do quadro de coagulação intravascular disseminada, ou seja, a formação da trombina. A degradação dos coágulos induzidos pela atividade da trombina só pode ser explicada pela presença de proteases no veneno ou pela ativação de proteases plasmáticas. Os resultados apresentados aqui demonstram exatamente essas atividades.

Um outro exemplo de coagulopatia de consumo induzida por envenamento é causada por *Bothriopsis jararaca*, envolvendo também a formação de trombina através da ativação de protrombina e de fator X, associada à formação de fibrina devido à atividade trombina-like (Santoro e Sano-Martins, 1993; Yamada *et alli*, 1997) paralelamente à atividade fibrinolítica (Sugiki *et alli*, 1995).

Os nossos resultados estão de acordo ainda com os resultados obtidos para *L. achelous* sugerindo a semelhança na forma de atuação do veneno das duas espécies. As diferenças encontradas nos venenos das duas espécies até agora podem ser explicadas pelas diferentes abordagens dadas pelos pesquisadores que estudam essas taturanas, como utilização de materiais obtidos a partir de diferentes partes do corpo da lagarta (Arocha-Piñango, 2000).

## PERSPECTIVAS

Para o prosseguimento desse trabalho seriam importantes os seguintes estudos:

- Ensaios *in vivo* que permitam uma melhor caracterização da importância de cada secreção obtida a partir da taturana na formação do quadro clínico.
- Estudos a respeito da atuação do veneno sobre a hemostasia de outros modelos animais além de mamíferos, tais como aves e répteis a fim de verificar o alcance desse mecanismo de defesa químico desenvolvido pela taturana.
- Purificação dos princípios ativos responsáveis pelas atividades aqui descritas.
- Padronização dos estudos de *L. obliqua* e *L. achelous*, a fim de verificar as verdadeiras semelhanças apresentadas pelas duas espécies.
- Estudos bioquímicos e filogenéticos sobre *L. obliqua* e *L. achelous* que permitam verificar até que ponto os resultados obtidos para uma espécie são aplicáveis para a outra.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AROCHA-PIÑANGO, C. L. E GUERRERO, B. Lonomia Genus Caterpillar Envenomation: Clinical and Biological Aspects. *Haemostasis* 2001; 31:288-293.
- AROCHA-PIÑANGO, C. L. E PEPPER, D. S. Studies of a Fibrinolytic Enzyme from Larvae of *Lonomia achelous* (Cramer) Using Chromogenic Peptide Substrates. *Thrombosis and Hemostasis* (Stuttgart) 46 (4) 710-713, 1981.
- AROCHA-PIÑANGO, C. L. Fibrinolysis producida por contacto con orugas. *Acta Científica Venezolana* 1967; 18: 136-139.
- AROCHA-PIÑANGO, C. L.; GUERRERO. Lonomia genus caterpillar toxins: Biochemical aspects. *Biochimie* 82: 937-942, 2000.
- BANDINELLI, E. e SIMON D. Dinâmica de coagulação sangüínea: aspectos gerais. In: SACHET, A. M. O. F. *Genética, para que te quero?* Porto Alegre: Ed. Universidade/Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1999.
- BOHRER, C. B; BASTIANI, M.; TERMIGNONI, C.; GUIMARÃES, J. A. XIV Salão de Iniciação Científica – Livro de Resumos. UFRGS. Porto Alegre, 2002.
- COLL-SANGRONA, E.; AROCHA-PIÑANGO, C. L. Fibrinolytic action on fresh human clots of whole body extracts and two semipurified fractions from *Lonomia achelous* caterpillars. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 31 (6): 779-784, 1998.
- DAVIE, E. W.; FUJIKAWA, K.; KISIEL, W. The Coagulation Cascade: Initiation, Maintenance, and Regulation. *Biochemistry* 30 (43): 10363-10368, 1991.
- DING, Z. e XU, Y. A Rapid Simplified Purification of Bovine Thrombin. *Preparative Biochemistry* 25 (1 e 2): 21-28, 1995).
- DONATO, J. L.; MORENO, R. A.; HYSLOP, S.; DUARTE, A.; ANTUNES, E.; LE BONNIEC, B. F.; RENDU, F.; NUCCI, GILBERTO de. Lonomia obliqua Caterpillar Spicules Trigger Human Blood Coagulation via Activation of Factor X and Prothrombin. *Thrombosis & Haemostasis* 79: 539-542.

- DUARTE, A. C.; CAOVILO, J.; LORINI, I.; LORINI, D.; MANTOVANI, G.; SUMIDA, J.; MANFRE, P. C.; SILVEIRA, R. C.; MOURA, S. P. Insuficiência renal aguda por acidentes com lagartas. *Jornal Brasileiro de Nefrologia* 12 (4): 184-186, 1990.
- DUARTE, A. C.; CRUSIUS, P. S.; PIRES, C. A. L.; SCHILLING, M. A.; FAN, H. W. Intracerebral haemorrhage after contact with *Lonomia* caterpillars. *The Lancet* 348: 1033, 1996.
- FAN, H. W.; CARDOSO, J. L.; OLMOS, R. D.; ALMEIDA, F. J.; VIANA, R. P.; MARTINEZ, A. P. P. *Rev. Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 1998; 40 (2): 119-120.
- GOUVEIA, A. I. C. B.; MOREIRA, A. B.; CHAIM, O. M.; APPEL, M. H.; GREMSKI, L. H.; MANGILI, O. C.; VEIGA, S. S.; GREMSKI, W. Detection of a serine-protease with a direct fibrinogenolytic effect in *Lonomia obliqua* caterpillar hair extracts. Livro de Programa e Resumos da XXXI Reunião Anual da SBBq, p. 30, 2002.
- GUERRERO, B. A. G.; AROCHA-PIÑANGO, C. L.; JUAN, A. G. S. Degradation of human factor XIII by lonomin V, a purified fraction of *Lonomia achelous* caterpillar venom. *Thrombosis Research* 87 (1): 83-93, 1997.
- GUERRERO, B. A. G.; AROCHA-PIÑANGO, C. L.; JUAN, A. G. S. *Lonomia achelous* caterpillar venom (LACV) selectively inactivates blood clotting factor XIII. *Thrombosis Research* 87 (1): 83-93, 1997.
- GUERRERO, B.; PERALES, J.; GIL, A.; PIÑANGO, C. L. A. P. Effect on Platelet FIII and Partial Characterization of Lonomin V, a Proteolytic Enzyme from *Lonomia achelous* Caterpillars. *Thrombosis Research* 93: 243-252, 1999.
- GUERRERO, B.; AROCHA-PIÑANGO, C. L. Activation of Human Prothrombin by the Venom of *Lonomia achelous* (Cramer) Caterpillars. *Thrombosis Research* 66: 169-177, 1992.
- HOUGIE, C. *Fundamentals of Blood Coagulation and Clinical Medicine*. New York, McGraw-Hill, 1963. p. 25-48.
- JENNY, N. S. e MANN, K. G. Coagulation Cascade: an Overview. In: LOSCALZO, J. e SCHAFER, A. I. *Thrombosis and Hemorrhage*. Maryland, Williams & Wilkins, 1998. Cap. 1, p 3-27.
- HARTWIG, J. H. Platelet Morphology. In: LOSCALZO, J. e SCHAFER, A. I. *Thrombosis and Hemorrhage*. Maryland, Williams & Wilkins, 1998. Cap. 10, p 207-228.

- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685, 1970.
- LEDERHOUSE, R. C. Avoiding the Hunt: Primary Defenses of Lepidopteran Caterpillars. In: EVANS, D. L. e SCHMIDT, J. O. *Insect Defenses – Adaptive Mechanisms and Strategies of Prey and Predators*. State University of New York, 1990. p. 175-189.
- LÓPEZ, M.; GIL, A.; AROCHA-PIÑANGO, C. L. The Action of *Lonomia achelous* Caterpillars Venom on Human Factor V. *Thrombosis Research* 98: 103-110, 2000.
- LORINI, L. M. *A taturana: aspectos biológicos e morfológicos da Lonomia obliqua*. Passo Fundo: EDIUPF, 1999.
- MARCUS, A. J.; SAFIER, L. B. Thromboregulation: multicellular modulation of platelet reactivity in hemostasis and thrombosis. *The FASEB Journal* 7 (6): 516-522, 1993.
- 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* 37: 1491-1504, 1999.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos*. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2001.
- NGAI, P. K. e CHANG, J. Y. A novel one-step purification of human  $\alpha$ -thrombin after direct activation of crude prothrombin enriched from plasma. *Biochemical Journal* 280: 805-808, 1991.
- PESCE, H. e DELGADO, A. Poisoning from Adult Moths and Caterpillars. In: Bücherl, W. e Buckley, E. E. *Venomous Animals and their Venoms*, vol. 3. New York, Academic Press, 1971. p. 120-156
- PESQUISA FAPESP. Veneno de taturana contra trombose. *Pesquisa FAPESP* 2001; 67: 42-43.
- PINTO, A. F. M. *Purificação e Caracterização de uma Enzima Fibrinogenolítica de Lonomia obliqua*. UFRGS. Porto Alegre, 2002.
- REBELATO, G. S.; CALLINARI-MARTIN, M. R.; PEREIRA, R. Determinação da ação do veneno de primeiro instar da lagarta “taturana” *Lonomia obliqua* Walker, 1855. *Revista Brasileira de Toxicologia* 14 (2): 173, 2001

- REIS, C. V.; KELEN, E. M. A.; FARSKY, S. H. P.; PORTARO, F. C. V.; SAMPAIO, C. A. M.; FERNANDES, B. L.; CAMARGO, A. C. M.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. A  $\text{Ca}^{++}$  activated serine protease (LOPAP) could be responsible for haemorrhagic syndrome caused by the caterpillar *Lonomia obliqua*. *The Lancet* 353: 1942, 1999 a.
- REIS, C. V.; FARSKY, S. H. P.; FERNANDES, B. L.; SANTORO, M. L.; OLIVA, M. L. V.; MARIANO, M.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. In Vivo Characterization of Lopap, a Prothrombin Activator Serine Protease from the *Lonomia obliqua* Caterpillar Venom. *Thrombosis Research* 102: 437-443, 2001b.
- REIS, C. V.; PORTARO, F. C. V.; ANDRADE, S. A.; FRITZEN, M.; FERNANDES, B. L.; SAMPAIO, C. A. M.; CAMARGO, A. C. M.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. A Prothrombin Activator Serine Protease from the *Lonomia obliqua* Caterpillar Venom (Lopap) Biochemical Characterization. *Thrombosis Research* 102: 427-436, 2001.
- RIBEIRO, J. M.; SCHNEIDER, M. e GUIMARÃES, J. A. Purification and Characterization of Prolixin S (Nitrophorin 2), the salivary anticoagulant of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. *Biochemical Journal*, 308: 243-249, 1995.
- ROCHA-CAMPOS, A.C.M.; ALVES, E.W.; MELO, P.D.; MACHADO, O.L.T.; DA SILVA, W.D. Lonomiatoxin: a 20 kDa protein present in bristle extracts of *Lonomia obliqua* extracts. . Cuenavaca, México, Abstract Book, P- 033 Mo, 1997.
- RUBIO, G. B. G. Vigilância epidemiológica da distribuição da lagarta *Lonomia obliqua* Walker, 1855, no Estado do Paraná, Brasil. *Caderno de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 17 (4): 1036, jul-ago, 2001.
- SANTORO, M. L.; SANO-MARTINS, I. S. Different Clotting Mechanisms of *Bothrops jararaca* Venom on Human and Rabbit Plasmas. *Toxicon* 31 (6): 733-742, 1993.
- SILVA-DA-SILVA, M. A.; PINTO, A. F. M. e GUIMARÃES, J. A. Ativação de Plasminogênio Produzida pelo veneno de *Lonomia obliqua*. XI Salão de Iniciação Científica – Livro de Resumos. UFRGS. Porto Alegre, 1999.
- SILVA, W. D. da; CAMPOS, A. C. M. R.; GOLÇALVES, L. R. C.; SOUSA-E-SILVA, M. C. C.; HIGASHI, H. G.; YAMAGUSHI, I. K.; KELEN, E. M. A. Development of an antivenom against toxins of *Lonomia obliqua* caterpillars. *Toxicon*, 34 (9): 1045-1049, 1996.

- SUGIKI, M.; MURUYAMA, M; YOSHIDA, E.; MIHARA, H; KAMIGUTI, A. e THEAKSTON, G.  
Enhancement of plasma fibrinolysis in vitro by Jararhagin, the main haemorrhagic metalloproteinase in *Bothrops jararaca* venom. *Toxicon*, 33 (12): 1605-1617, 1995.
- VAUGHAN, D. E. e DECLERCK, P. J. Fibrinolysis and its Regulation. In: LOSCALZO, J. e SCHAFER, A. I. *Thrombosis and Hemorrhage*. Maryland, Williams & Wilkins, 1998. Cap. 7, p 155-170.
- VEIGA, A. B. G. Lonomia obliqua: estrutura secretora e propriedades funcionais do seu veneno sobre a coagulação e a fibrinólise. UFRGS. Porto Alegre, 2001. Dissertação de Mestrado.
- VEIGA, A. B. G.; BLOTCHTEIN, B. e GUIMARÃES, J. A. Structures involved in production, secretion and injection of the venom produced by the caterpillar *Lonomia obliqua* (Lepidoptera, Saturniidae). *Toxicon* 39: 1343-1351, 2001.
- VULINEC, K. Collective Security: Aggregation by Insects as a Defense. In: EVANS, D. L. e SCHMIDT, J. O. *Insect Defenses – Adaptative Mechanisms and Strategies of Prey and Predators*. State University of New York, 1990. p. 251-288.
- WHITMAN, D. W.; BLUM, M. S. e ALSOP, D. W. Allomones: Chemicals for Defense. In: EVANS, D. L. e SCHMIDT, J. O. *Insect Defenses – Adaptative Mechanisms and Strategies of Prey and Predators*. State University of New York, 1990. p. 289-351.
- WILLIAMS, E. Disseminated Intravascular Coagulation. In: LOSCALZO, J. e SCHAFER, A. I. *Thrombosis and Hemorrhage*. Maryland, Williams & Wilkins, 1998. Cap. 44, p 963-985.
- WOLFF, J. L. C.; MORAES, R. H. P.; KITAJIMA, E.; LEAL, E. S.; ZANOTTO, P. M. de A. Identification and characterization of a baculovirus from *Lonomia obliqua* (Lepidoptera: Saturniidae). *Journal of Invertebrate Pathology* 79: 137-145, 2002.
- YAMADA, D.; SEKIYA, F. e MORITA, T. Prothrombin and Factor X Activities in the Venoms of Viperidae Snakes. *Toxicon* 35 (11): 1581-1589, 1997.
- ZANNIN, M. Avaliação dos parâmetros de coagulação e fibrinólise no plasma de pacientes acidentados por contato com lagartas de *Lonomia obliqua*. São Paulo, 2002. Tese de Doutorado.

## ANEXO

Os resultados apresentados fazem parte dos seguintes trabalhos:

- DOBROVOLSKI, R.; PINTO, A. F. M.; VEIGA, A. B. G.; GUIMARÃES, J. A. Estudo Comparativo de Atividades Anti-Hemostáticas de *Lonomia obliqua*. XIII Salão de Iniciação Científica – Livro de Resumos. UFRGS: Porto Alegre, 2001.
- DOBROVOLSKI, R.; PINTO, A. F. M.; VEIGA, A. B. G.; GUIMARÃES, J. A. Estudo Comparativo de Atividades Anti-Hemostáticas de *Lonomia obliqua*. III Reunião Anual do Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular – PPBGBCM. Livro de Resumos. UFRGS: Porto Alegre, 2001.
- DOBROVOLSKI, R.; PINTO, A. F. M.; VEIGA, A. B. G.; GUIMARÃES, J. A. Comparative Study of Anti-Hemostatic Activities from Different Materials of *Lonomia obliqua*. XXXI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular-SBBQ. Programa e Resumos. Caxambu, 2002.
- VEIGA, A. B. G.; PINTO, A. F. M.; VEIGA, A. B. G.; GUIMARÃES, J. A. Fibrino(geno)lytic Active of Four Materials from *Lonomia obliqua*. XXXI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular-SBBQ. Programa e Resumos. Caxambu, 2002.
- DOBROVOLSKI, R.; PINTO, A. F. M.; VEIGA, A. B. G.; GUIMARÃES, J. A. Atividades do Veneno de *Lonomia obliqua* sobre a Hemostasia. IV Reunião Anual do Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular – PPBGBCM. Livro de Resumos. UFRGS: Porto Alegre, 2002.
- PINTO, A. F. M.; VEIGA, A. B. G.; DOBROVOLSKI, R.; GUIMARÃES, J. A. Characterization of Fibrino(geno)lytic Activities present in a *Lonomia obliqua* secretion. XVII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental – FESBE. Livro de Programa e Resumos. Salvador, 2002.
- DOBROVOLSKI, R.; PINTO, A. F. M.; VEIGA, A. B. G.; GUIMARÃES, J. A. O Veneno da Taturana *Lonomia obliqua* e a Hemostasia. XIV Salão de Iniciação Científica – Livro de Resumos. UFRGS: Porto Alegre, 2002.