

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**Envenenamento pela taturana *Lonomia obliqua*:
estudo das propriedades hemorrágica e inflamatória do
veneno em modelos animais.**

Perspectivas de desenvolvimento de um produto para tratamento
do quadro hemorrágico

Kátia Rosana Lima de Moura da Silva

Porto Alegre
Março de 2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**Envenenamento pela taturana *Lonomia obliqua*:
estudo das propriedades hemorrágica e inflamatória do
veneno em modelos animais**

**Perspectivas de desenvolvimento de um produto para tratamento
do quadro hemorrágico**

Kátia Rosana Lima de Moura da Silva

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre

Orientador: Prof. Dr. Jorge Almeida Guimarães

Porto Alegre

Março de 2007

BANCA EXAMINADORA

Profª Dra. Thereza Christina Barja Fidalgo
Universidade Estadual do Rio de Janeiro/UERJ

Profª Dra. Fabiana Horn
Centro de Biotecnologia/UFRGS

Profº Dr. Carlos Termignoni
Centro de Biotecnologia/UFRGS

À minha família

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao professor Dr. Jorge Almeida Guimarães pela oportunidade de estudar sob sua orientação e, sobretudo por ser modelo de mestre, demonstrando sempre disposição em explicar, discutir, fazer pensar... Obrigada pelos ensinamentos e exemplo de dedicação à pesquisa.

Ao Alberto Nicollela, diretor do Centro de Informação Toxicológica do Rio Grande do Sul (CIT/RS), pela compreensão, amizade e apoio incondicional para que eu pudesse realizar este trabalho.

Ao Prof^o Dr. Jamil Asseury Filho por receber-me gentilmente no laboratório do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). O conhecimento adquirido nestes experimentos muito contribuiu para a realização deste trabalho.

A Prof^a Dra. Thereza Christina Barja Fidalgo, prof^a Dra. Iolanda Fierro e a doutoranda Simone Vargas por receber-me gentilmente no Laboratório de Farmacologia da Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UERJ). Obrigada pela atenção e pelos ensinamentos essenciais à realização deste trabalho.

Aos professores participantes da banca examinadora Dra. Fabiana Horn e Dr. Carlos Termignoni.

Ao Dr. Antônio Frederico Michel Pinto pelos ensinamentos durante toda a realização deste trabalho e pelas valiosas sugestões realizadas durante a revisão da dissertação.

A Dra. Ana Beatriz Gorini da Veiga pelo apoio e ensinamentos.

Aos docentes do programa de pós-graduação em Biologia Celular e Molecular da UFRGS, que direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

À Sílvia Centeno e ao Luciano Saucedo pelo apoio e auxílio.

Agradeço a todos os amigos do Laboratório de Bioquímica Farmacológica, pessoas especiais que tive o prazer de conhecer, pelo carinho, amizade e pela convivência durante esse período, especialmente Markus Berger, Renata Terra, Simone Kobe, José Rech, Walter Beys, Lucélia Santi e Clarice Ricci. Agradeço também os demais colegas dos laboratórios 217 (Centro de Biotecnologia/UFRGS) e 204 (Departamento de Biofísica/UFRGS).

À amiga Dra. Eliane Dallegrave pelos ensinamentos, amizade, incentivo e inúmeras sugestões feitas durante a realização deste trabalho.

Às amigas, do Núcleo de Toxinas Naturais do CIT/RS, Dra. Maria da Graça Boucinha Marques e Dra. Maria Gorete Rossoni pela amizade, incentivo e companheirismo. À Lúcia e ao Lucas pela amizade e o cuidado com os animais.

Ao Hudson Barreto Abella pelo apoio e estímulo constantes oferecidos durante a realização deste trabalho.

À amiga Viviane Sebben pela amizade, confiança e cumplicidade.

Aos demais amigos do CIT/RS.

Aos meus pais Artur e Ana Maria e ao meu irmão Carlos Eduardo pelo amor, carinho e compreensão.

Ao Roni pelo amor e cumplicidade...

Ao meu filho Luís Felipe por ser a razão de tudo...

ÍNDICE

Agradecimentos	5
Lista de Figuras.....	10
Abreviaturas.....	12
Resumo.....	13
Abstract.....	15
1. Introdução.....	17
1.1. Dados Epidemiológicos.....	17
1.2. <i>Lonomia obliqua</i>	21
1.3. Hemostasia.....	25
1.4. Inflamação.....	30
1.5. Quadro Clínico provocado pelo envenenamento com a <i>Lonomia obliqua</i>	33
1.6. Princípios ativos presentes nas secreções das lagartas do gênero <i>Lonomia</i>	35
1.7. Semelhança entre os acidentes causados por <i>Lonomia obliqua</i> e serpentes do gênero <i>Bothrops</i>	37
2. Objetivos.....	39
2.1 Objetivos específicos.....	39
3. Materiais e Métodos.....	41
3.1. Extratos e secreções de <i>Lonomia obliqua</i>	41
3.2. Veneno de <i>Bothrops jararaca</i>	42
3.3. Reagentes.....	42
3.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	43
3.5. Western-blot.....	43

3.6. Ensaio de Coagulação – Tempo de Recalcificação.....	44
3.7. Atividade Fibrinogenolítica.....	45
3.8. Animais.....	46
3.9. Efeito hemorrágico pós-incisão da cauda.....	47
3.10. Extravasamento vascular.....	49
3.11. Air pouch.....	51
3.12. Análise Estatística.....	53
4. Resultados.....	54
4.1. Extratos e secreções de <i>Lonomia obliqua</i>	54
4.2. Atividade pró-coagulante.....	56
4.3. Atividade fibrinogenolítica.....	57
4.4. Avaliação de reação cruzada entre os soros e os venenos de <i>L. obliqua</i> e <i>B. Jararaca</i>	58
4.5. Efeito hemorrágico pós-incisão da cauda induzido por diferentes concentrações do extrato de espículas.....	61
4.6. Monitoramento do efeito hemorrágico pós-incisão da cauda.....	62
4.7. Monitoramento do efeito hemorrágico pós-incisão da cauda induzido pelo extrato de espículas de <i>L. obliqua</i> e do veneno de <i>B. Jararaca</i>	63
4.8. Ação do soro antilonômico sobre o efeito hemorrágico pós-incisão da cauda.....	64
4.9. Ação do soro antilonômico e do EDTA sobre o no ensaio de efeito hemorrágico pós- incisão da cauda.....	65
4.10. Extravasamento vascular induzido por diferentes concentrações de extrato de espículas.....	67
4.11. Monitoramento do extravasamento vascular induzido pelo extrato de espículas de <i>L. obliqua</i>	68
4.12. Extravasamento vascular e a ação de inibidores.....	69

4.13. Migração celular induzida por diferentes concentrações de extrato de espículas.....	70
4.14. Migração celular em relação ao tempo.....	71
4.15. Inibição da migração celular.....	72
5. Discussão	73
6. Conclusões.....	84
7. Referências Bibliográficas.....	85
8. Co-autoria em artigo publicado.....	91
9. Curriculum vitae – Kátia Rosana Lima de Moura da Silva.....	100

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição dos registros de acidentes causados por <i>L. obliqua</i> no Rio Grande do Sul.....	19
Figura 2 - Número de acidentes causados por <i>L. obliqua</i> registrados pelo CIT/RS no período de 1997 a 2005.....	20
Figura 3 - Sazonalidade dos acidentes causados por <i>L. obliqua</i> registrados pelo CIT/RS, no período de 1997 a 2005.....	21
Figura 4 - Ciclo de vida da <i>L. obliqua</i>	22
Figura 5 - Colônia de lagartas <i>L. obliqua</i>	23
Figura 6 - Morfologia e ultraestrutura do tegumento de <i>L. obliqua</i>	25
Figura 7 - Detalhe da extremidade da cerda e do canal interno.....	26
Figura 8 - Cascata de coagulação.....	29
Figura 9 - Migração celular.....	32
Figura 10 - Sinais clínicos do envenenamento por <i>L. obliqua</i>	34
Figura 11 - Esquema da ativação do sistema contato.....	36
Figura 12 - Ensaio de tempo de recalcificação.....	45
Figura 13 - Ensaio de efeito hemorrágico pós-incisão da cauda.....	47
Figura 14 - Ensaio de extravasamento vascular.....	50
Figura 15 – Ensaio “ air pouch”.....	52
Figura 16 - Perfil eletroforético dos extratos e secreções de <i>L. obliqua</i> em SDS-PAGE.....	54
Figura 17 - Western-blot dos extratos e secreções de <i>L. obliqua</i>	55
Figura 18 - Ensaio de tempo de recalcificação.....	56
Figura 19 - Ensaio de fibrinocoagulação.....	57
Figura 20 - Eletroforese em SDS-PAGE e Western-blot do extrato de espículas de <i>L. obliqua</i> e do veneno bruto de <i>B. jararaca</i>	58

Figura 21 - Efeito dos soros antilonômico e antibotrópico sobre a atividade pró-coagulante do extrato de espículas no ensaio de tempo de recalcificação.....	59
Figura 22 - Efeito dos soros antilonômico e antibotrópico sobre a atividade pró-coagulante do veneno bruto de <i>B. jararaca</i> no ensaio de tempo de recalcificação	60
Figura 23 -Efeito hemorrágico pós-incisão da cauda induzido pelo extrato de espículas.....	61
Figura 24 - Monitoramento do efeito hemorrágico pós-incisão da cauda Induzido pelo extrato de espículas.....	62
Figura 25 - Monitoramento do efeito hemorrágico pós-incisão da cauda Induzido pelo extrato de espículas de <i>L. obliqua</i> e do veneno de <i>B. jararaca</i>	63
Figura 26 – Efeito do Soro antilonômico na neutralização do efeito hemorrágico pós-incisão da cauda induzido pelo extrato de espículas.....	64
Figura 27- Efeito do soro antilonômico e do EDTA, pré-incubados com extrato de espículas, na neutralização do efeito hemorrágico pós-incisão da cauda	65
Figura 28 - Efeito do soro antilonômico e do EDTA na neutralização do efeito hemorrágico administrados após o veneno.....	66
Figura 29 - Efeito da concentração de extrato de espículas sobre o Extravasamento vascular.....	67
Figura 30 - Monitoramento do extravasamento vascular induzido pelo extrato de espículas.....	68
Figura 31-Efeito de inibidores da hemostasia sobre o extravasamento Vascular	69
Figura 32 -Efeito de diferentes concentrações do extrato de espículas sobre a migração celular.....	70
Figura 33 - Variação da migração celular induzida pelo extrato de espícula em função do tempo.....	71
Figura 34 - Inibição da migração celular.....	72

ABREVIATURAS

ANOVA: Análise de Variância

CaCl₂ : Cloreto de cálcio

CIT/RS: Centro de Informação Toxicológica do Rio Grande do Sul

COBEA: Colégio brasileiro de Experimentação Animal

EDTA: Ácido etileno diamino tetra-acético

FI: Fibrinogênio

FII: Protrombina

FIII: Fator tecidual (FT) ou tromboplastina

FIV: Ca²

FV: Proacelerina

FVII: Proconvertina

FVIII: Fator anti-hemofílico

FIX: Fator Christmas

FX: Fator Stuart

FXI: Precursor da tromboplastina plasmática

FXII: Fator Hageman

FXIII: Fator estabilizador da fibrina

kDa: Quilodalton

P: Nível de significância alcançado

PUCRS: Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida

PBS: Tampão Fosfato

PPM: Padrão de peso molecular

SAB: Soro Antibotrópico

SALon: Soro Antilonômico

SDS: Dodecilsulfato de sódio

RESUMO

O envenenamento causado pelo contato com a lagarta *Lonomia obliqua* apresenta uma alta taxa de letalidade, fazendo do lonomismo um dos mais graves causados por animais peçonhentos em todo o Brasil. O acidente é caracterizado por graves distúrbios hemostáticos que podem evoluir, em pacientes não tratados, ao óbito. O efeito paradoxal desse envenenamento (pró-coagulante e hemorrágico) é resultado da ação de diferentes princípios ativos presentes nas secreções venenosas da lagarta. Os efeitos clínicos paradoxais não são exclusivos do veneno desta lagarta. O envenenamento por serpentes do gênero *Bothrops* apresenta sintomatologia semelhante. Considerando a gravidade dos acidentes causados por *L. onomia obliqua* em toda a região Sul e seu difícil diagnóstico frente à similaridade com o acidente botrópico, este trabalho teve como objetivo estudar, utilizando modelos animais, os efeitos hemorrágicos e inflamatório desencadeados pelo veneno desta lagarta.

Utilizando ensaios de western-blot e de coagulação por tempo de recalcificação, verificamos que não há reação cruzada no reconhecimento das proteínas dos venenos de *L. obliqua* e *B. jararaca* pelos soros antilonômico e antibotrópico. Em modelos animais, estudamos o efeito hemorrágico através do acompanhamento do sangramento pós-incisão da cauda de ratos. Nesse ensaio, o extrato de espículas apresentou um efeito hemorrágico dose-dependente, sendo completamente revertido pelo soro antilonômico e EDTA. Os efeitos inflamatórios do veneno da taturana foram estudados através dos ensaios *in vivo* de extravasamento vascular e migração celular. O extrato de espículas foi capaz de

induzir extravasamento vascular e o efeito foi reduzido através da utilização de inibidores (pomadas de heparina, benzamidina e EDTA). Da mesma forma, EDTA, benzamidina e heparina foram capazes de inibir o efeito dose-dependente sobre a migração celular induzido pelo extrato de espículas no ensaio de *air pouch*.

Neste trabalho, estudamos o e inflamatório causado pelo extrato de espículas de *L. obliqua*. Os resultados aqui apresentados são essenciais para a melhor compreensão do quadro clínico conseqüente desse acidente. *L. obliqua*, assim como outros animais peçonhentos e/ou venenosos da fauna brasileira, representam importante fonte de recursos para a pesquisa, principalmente na área da saúde, como o desenvolvimento de novos medicamentos e de soros antivenenos mais específicos.

ABSTRACT

The envenomation caused by contact with *Lonomia obliqua* caterpillars presents a high lethality rate, being one of the most severe accidents with venomous animals in Brazil. The accident is characterized by a hemostatic disorder which can evolve, in untreated patients, to death. The paradoxical effect of the envenomation (pro-coagulant and hemorrhagic) results from the action of several active principles present in the caterpillar's venomous secretions. These paradoxical effects are not exclusive of caterpillar's venoms. Envenomation by *Bothrops* genus snakes has a similar symptomatology. Considering the severity of the accidents caused by *L. obliqua* in Southern Brazil and the difficult diagnostic due to the bothropic envenomation similarity, in this work we studied the hemorrhagic and inflammatory effects triggered by the caterpillar's venom using animal models.

Using western-blot and coagulation (recalcification time) assays, we demonstrated that there is no cross reactivity of the *L. obliqua* and *B. jararaca* venoms by antilonomic and antibothropic sera. In animal models, the hemorrhagic effect using bleeding time assay was analyzed. In this assay, the caterpillar's bristle extract presented a dose-dependent hemorrhagic activity, which is completely inhibited by antilonomic serum and EDTA. The inflammatory effects of the lonomic venom were studied using vascular extravasation and cell migration assays. The bristle extract was capable of inducing vascular extravasation and this activity was inhibited by heparin, benzamidin and EDTA pomades. Also, heparin, benzamidin and EDTA inhibited the dose-dependent cell migration induced by bristle extract in the air pouch assay.

In this work, we studied hemorrhage and inflammation caused by *Lonomia obliqua* bristle extract. The results presented here are essential to the better comprehension of the clinical profile in the lonomic envenomation. *Lonomia obliqua*, as well as other venomous animals from the Brazilian fauna, represents an important source for research, specially in health sciences, to the development of new drugs and specific antivenom sera.

1. Introdução

1.1. Dados Epidemiológicos

Os acidentes causados por insetos da ordem Lepidoptera, a qual inclui borboletas (hábitos diurnos) e mariposas (hábitos noturnos), são classificados como erucismo ou lepidopterismo. Erucismo é a denominação dada aos acidentes causados por lagartas urticantes (eruca = larva), enquanto lepidopterismo é o termo utilizado para acidentes causados pelas formas adultas destes insetos. Usualmente, estes acidentes causam um ou mais dos seguintes quadros: dermatite urticante, periartrite falangeana e síndrome hemorrágica (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001).

Dermatite urticante é o tipo mais comum e resulta do contato com as cerdas de lagartas urticantes pertencentes a vários gêneros encontradas em todo o país. Os sintomas são dor imediata, edema e eritema. No Brasil, os agentes causais são predominantemente pertencentes às famílias Saturniidae (gêneros *Automeris*, *Dirphia*, *Hylesia* e *Lonomia*), Megalopygidae (gêneros *Podalia* e *Megalopyge*) e Limacodidae (gêneros *Phobetron* e *Sibine*) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001). A lagarta *Premolis semirufa* da família Arctiidae, conhecida popularmente como pararama, é a responsável pela periartrite falangeana ou reumatismo dos seringueiros. Além dos sintomas iniciais de dor, edema e sensação de queimadura, alguns pacientes evoluem para um quadro de limitação dos movimentos articulares, fibrose periarticular e anquilose (deformações que simulam a artrite reumatóide) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001).

Diferentemente dos acidentes acima referidos, o contato com as cerdas de lagartas do gênero *Lonomia* resulta numa severa síndrome hemorrágica, acidente de importância médica devido à gravidade dos casos.

O gênero *Lonomia*, objeto de estudos neste trabalho, é encontrado somente no continente americano (LEMAIRE, 1972) e, embora no Brasil existam vinte e cinco espécies do gênero *Lonomia*, apenas duas estão relacionadas com o quadro hemorrágico. A *Lonomia achelous* que é encontrada na região Norte, principalmente nos estados do Pará e Amapá (FRAIHA *et al.*, 1986). Também é encontrada na Venezuela, onde é responsável pelos acidentes hemorrágicos registrados desde 1967 (AROCHA-PIÑANGO, 1967). Há ainda registros de acidentes com este inseto na Guiana Francesa, Paraguai, Peru e Equador (AROCHA-PIÑANGO *et al.*, 1992).

Em Minas Gerais, há registros de *Lonomia circumstans* como praga de cafezais, resultando em importante prejuízo para a agricultura, mas não são relatados acidentes hemorrágicos com esta espécie (D'ANTÔNIO, 1983).

Na Região Sul do Brasil, a lagarta *Lonomia obliqua*, conhecida popularmente por taturana, lagarta de fogo, maranduvá ou ruga, é a responsável por um número crescente de acidentes que resultam em grave quadro hemorrágico em crianças e adultos vitimados pelo contato com a taturana. Casos isolados desse mesmo tipo de envenenamento têm sido registrados em São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais.

No Rio Grande do Sul, os primeiros acidentes registrados com *L. obliqua*, aconteceram em 1989, despertando, desde então, uma constante preocupação das equipes de saúde em monitorar estas ocorrências (DUARTE *et al.*, 1990). Como

mostrado na Figura 1, nos últimos anos houve um aumento do número de municípios no Estado do Rio Grande do Sul onde a lagarta *L. obliqua* foi identificada e acidentes registrados. O aumento de registros pode, em parte, ser atribuído às campanhas de identificação e informação sobre a gravidade do quadro clínico, que vêm realizando as equipes de conscientização à população da necessidade de procurar auxílio médico em caso de acidente.

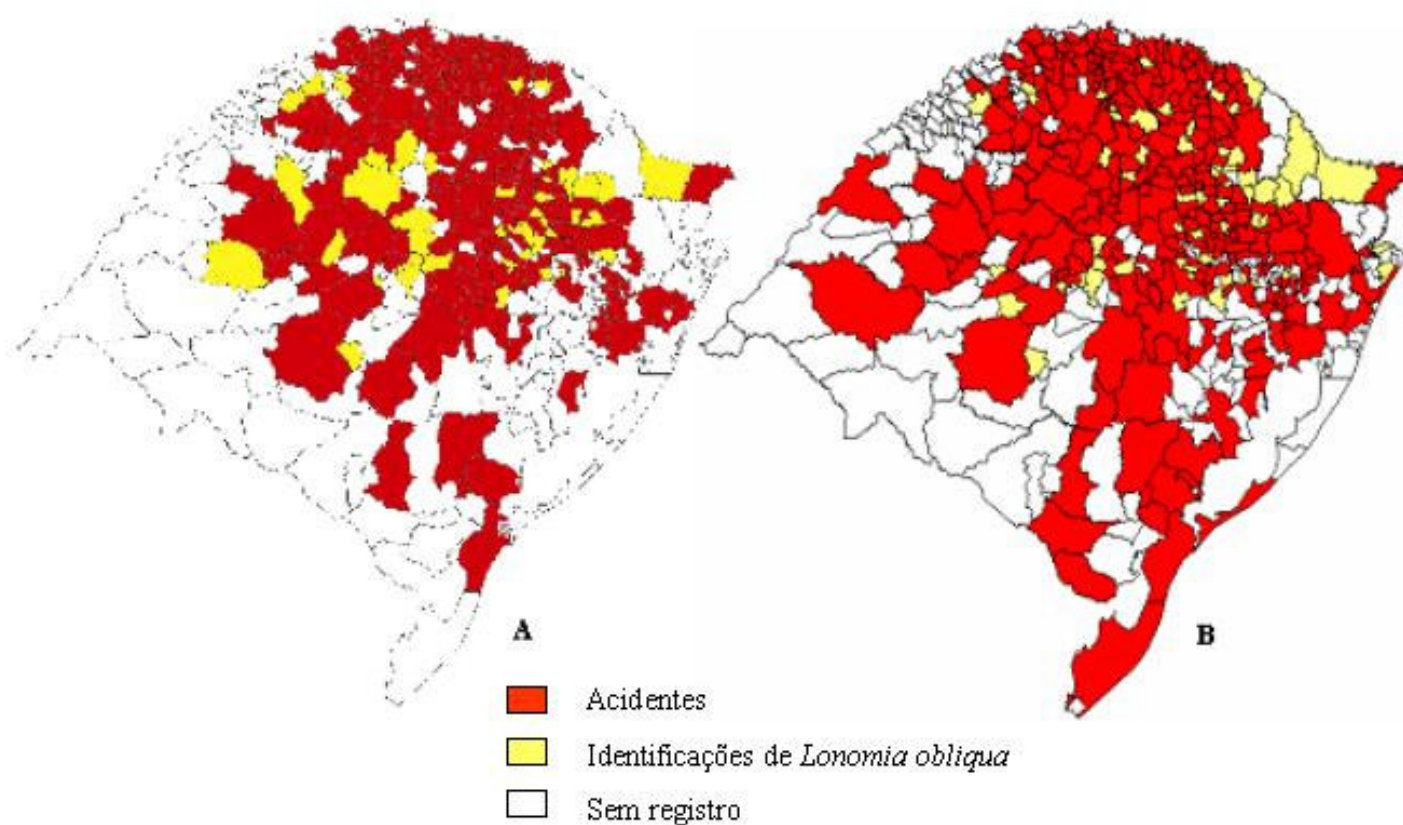


Figura 1. Distribuição dos registros de acidentes causados por *Lonomia obliqua* no Rio Grande do Sul. **A.** Mapa demonstrando os registros de acidentes no período de 1989 a 1998. **B.** Mapa demonstrando os registros de acidentes no período de 1989 a 2005.

De fato, entre os anos de 1997 e 2005 foram registrados pelo Centro de Informação Toxicológica do Rio Grande do Sul (CIT/RS), 1009 acidentes com a taturana, sendo que 984 ocorreram no Estado e 25 em outras regiões (Figura 2). Deste total, sete pacientes evoluíram para óbito sendo cinco no Rio Grande do Sul, um em Minas Gerais e um no Paraná, resultando numa taxa de letalidade de 0,7% (ABELLA *et al.*,2006).

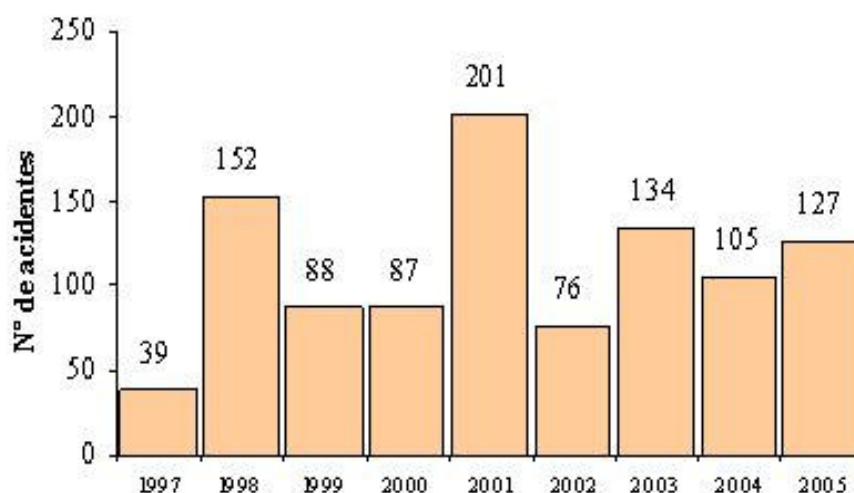


Figura 2. Número de acidentes causados por *L. obliqua* registrados pelo CIT/RS no período de 1997 a 2005 (ABELLA *et al.*,2006).

Em Santa Catarina, no período de janeiro de 1990 a dezembro de 2001 foram registrados 1.851 acidentes, sendo que seis óbitos aconteceram entre os anos de 1990 e 1995 (ZANNIN *et al.*,2003). No Paraná, entre 1997 e 2005, aconteceram 329 acidentes, com registro de seis óbitos (taxa de letalidade de 1,8%) (ABELLA *et al.*,2006).

O índice de letalidade tanto no RS quanto no PR apresenta-se alto quando comparado aos acidentes causados por ofídios na região Sul (0,33%). Este

dado faz do acidente causado pela taturana *L. obliqua* um dos mais graves causados por animais peçonhentos em todo o Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001).

O perfil de sazonalidade dos acidentes com esta lagarta é semelhante ao dos acidentes ofídicos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001). Como pode ser observado na Figura 3, o maior número de casos ocorre nos meses de verão, época em que o animal está na fase larval, coincidindo com a atividade agrícola mais intensa e com a época de férias, período em que as pessoas estão mais expostas e mantém maior contato com o ambiente natural (ABELLA *et al.*,2006).

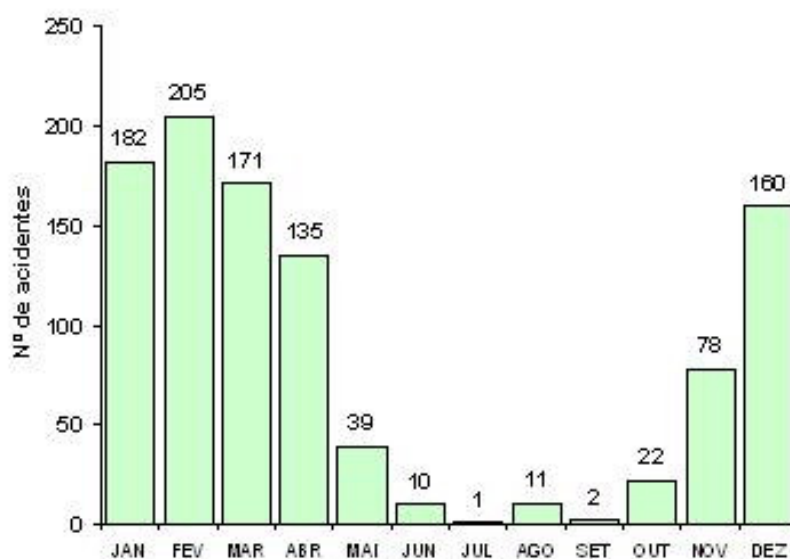


Figura 3. Sazonalidade dos acidentes causados por *L. obliqua* registrados pelo CIT/RS, no período de 1997 a 2005.

1.2. *Lonomia obliqua*

A lagarta *L. obliqua* apresenta um ciclo de vida médio de seis meses, desde a postura, eclosão dos ovos, fase larval, fase de pupa e animal adulto, incluindo, obrigatoriamente, o período do verão (Figura 4).

Na fase adulta há um evidente dimorfismo sexual, no qual a mariposa macho apresenta coloração amarelada e a fêmea rosa-pardo. Esta fase tem duração de 7 a 10 dias. Após a cópula, a fêmea deposita os ovos nas folhas das plantas que servirão de alimento para as lagartas. Os ovos eclodem em aproximadamente 17 dias.

A fase de lagarta tem duração média de 85,6 dias, sendo que cada instar perdura por aproximadamente duas semanas.

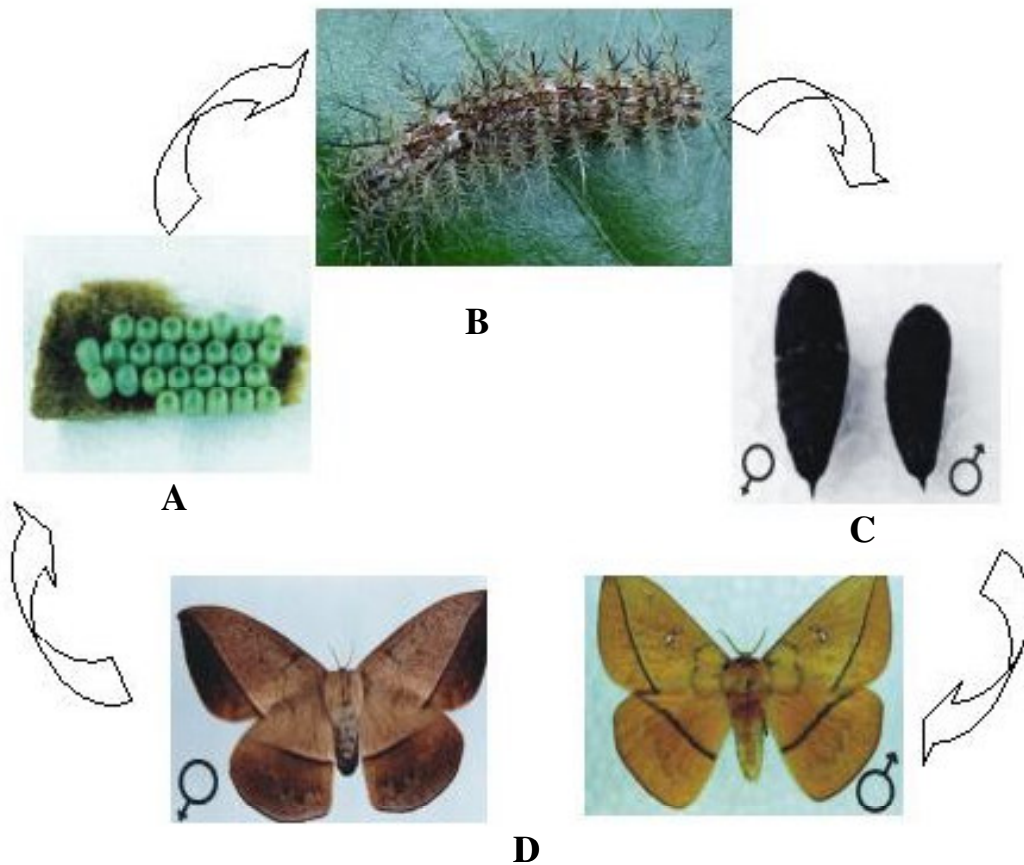


Figura 4. Ciclo de vida da *L.obliqua*. **A.** Ovos. **B.** Fase larval (lagarta). **C.** Fase de pupa. **D.** Fase adulta.

Durante o dia, as lagartas, em qualquer dos instares, permanecem agregadas (Figura 5) no caule das árvores e à noite sobem para copa das árvores para se alimentar. São fitófagas, alimentando-se de folhas de diversas árvores como cedro (*Cedrella fissilis*), ipê (*Tabebuia pulcherrima*), figueira do mato (*Ficus subtriplinervia*), abacateiro (*Persea gratissima*), pessegueiro (*Prunus persica*), plátano (*Platanus acerifolia*), araticum (*Rollinia emarginata*), seringueira (*Ficus elastica*), pereira (*Pyrus communis*), amexeira (*Prunus domestica*), figueira (*Ficus carica*), entre outras, sendo, portanto, consideradas polífagas.

Na fase larval, a lagarta apresenta coloração castanho-clara, com uma listra longitudinal marrom-escura marginada de preto, manchas claras descontínuas levemente amareladas dispostas em alguns segmentos torácicos. As cerdas são verdes, com extremidades pretas (LORINI, 1997; LORINI, 1999).

A coloração da lagarta, aliada aos hábitos gregários (grande número de animais juntos) facilita a camuflagem com o ambiente (Figura 5) e, conseqüentemente, a ocorrência dos acidentes. (LORINI, 1997; LORINI, 1999).



Figura 5. Colônia de lagartas *L. obliqua* (Dados CIT/RS)

O desmatamento está diretamente envolvido com aumento da ocorrência de acidentes. As residências construídas onde antes havia mata, atraem através da iluminação, as mariposas que acabam fazendo a postura dos ovos em árvores próximas. Além disso, parece haver uma rápida adaptação destes animais em relação às plantas cultivadas, principalmente pomares, onde encontram alimentação farta (MORAES, 2002).

No último instar, os animais já adquiriram peso (fase larval é a única em que se alimentam), descem para o solo e entram na fase de pupa. A ocorrência de acidentes predominantemente registrados nos meses do verão indica que fase de pupa tem duração de aproximadamente seis meses, prolongando-se até os meses de novembro-dezembro, evoluindo, a partir de então, para a fase adulta. Fatores climáticos como o aumento e a diminuição do fotoperíodo, juntamente com a umidade e variações na temperatura, podem influenciar a maior ou menor duração do período pupal (LORINI, 1999).

A morfologia da lagarta *L. obliqua* e a ultraestrutura do tegumento foram bem caracterizados em trabalhos anteriores do nosso grupo na UFRGS (VEIGA, 2001; VEIGA *et al*, 2001). Como pode ser observado na Figura 6A, cada segmento do corpo da lagarta apresenta um conjunto de cerdas ou espículas denominado *scolus*. Na base do *scolus*, o epitélio forma numerosas dobras que ampliam a superfície de contato com a hemolinfa (Figura 6B), facilitando a absorção de nutrientes presentes neste fluido. Além disso, a presença de núcleos volumosos e muitos grânulos no citoplasma caracterizam o tecido epitelial como secretor.

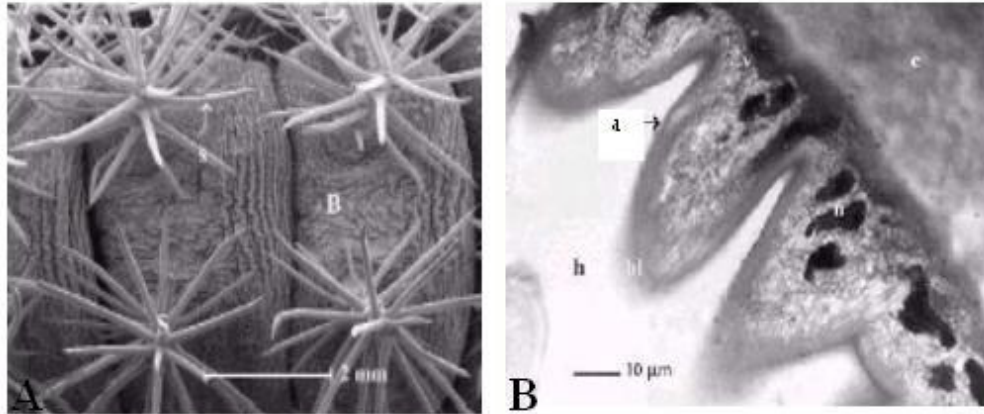


Figura 6. Morfologia e ultraestrutura do tegumento de *L. obliqua*. **A.** Vista dorsal do tegumento, em microscopia eletrônica de varredura, destacando *scolus*, composto por várias cerdas. **B.** Corte longitudinal do epitélio, próximo a um *scolus*, d: detalhe das dobras da lâmina basal, n: núcleos das células, h: hemolinfa (VEIGA, 2001; VEIGA *et al*, 2001).

As cerdas são formadas por um tecido epitelial contínuo ao epitélio da base do tegumento, sendo uma evaginação deste. Não foram encontradas glândulas ou qualquer estrutura glandular neste inseto. A secreção venenosa secretada pelo epitélio tegumentar fica armazenada na região subcuticular e no canal que percorre as cerdas (Figura 7A) internamente (VEIGA, 2001; VEIGA *et al*, 2001). Quando ocorre o contato com a pele do indivíduo (leve contato da pele), a extremidade mais frágil da cerda, por apresentar menor quantidade de quitina, se quebra e a secreção venenosa é inoculada na vítima (Figura 7B).

Pode-se dizer que cada cerda se constitui em uma microseringa a qual permite o imediato escoamento do veneno pelo canal interno da espícula. Como se descreve adiante, os efeitos desse envenenamento se fazem sentir no paciente, sobretudo nos processos mediados pela hemostasia.

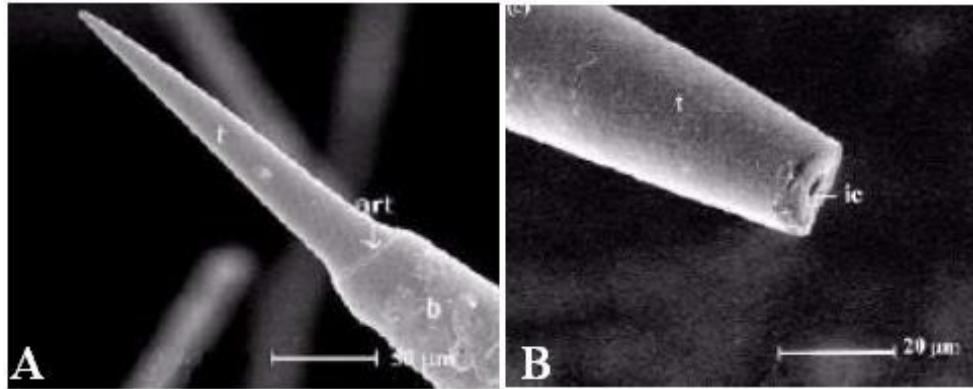


Figura 7. Detalhe da extremidade da cerda e do canal interno. **A.** Extremidade da cerda, região que apresenta menos quantidade de quitina. **B.** Detalhe do canal que percorre a cerda internamente e se quebra no contato com a pele do paciente (VEIGA, 2001; VEIGA *et al*, 2001).

1.3. Hemostasia

Ao longo da evolução, os mamíferos, desenvolveram um mecanismo extremamente complexo e eficiente para evitar a perda sangüínea (excessiva) nos casos de dano tecidual e, ainda, assegurar que o sangue circulante permaneça fluido dentro do leito vascular. Este processo fisiológico conhecido como hemostasia ou processo hemostático consiste em um arranjo multifuncional, finamente regulado onde estão incluídos a parede vascular, estruturas e agentes envolvidos na vasoconstrição e vasodilatação, adesão e agregação plaquetária e as cascatas de coagulação e de fibrinólise (DAHLBÄCK, 2000).

O dano tecidual e o conseqüente rompimento da estrutura vascular expõem proteínas da matriz extracelular como o colágeno, um potente indutor da ativação plaquetária. As plaquetas ativadas sofrem mudança de forma (*shape change*), tornando-se arredondadas, e emitem pseudópodes. Uma vez ativadas, as plaquetas aderem à fibrila de colágeno e, como conseqüência dessa etapa de

adesividade das plaquetas, ocorre um processo de intensa reatividade celular com liberação de outros agonistas plaquetários, como ADP, tromboxana e serotonina, que estimulam o recrutamento e a aglomeração de mais plaquetas à camada inicial, resultando na agregação ou “plug” plaquetário, conhecida como a etapa primária da hemostasia.

Simultaneamente à agregação plaquetária, a própria lesão tecidual inicia o processo de ativação da cascata de coagulação sanguínea propriamente dita (Figura 8). Os eventos bioquímicos da cascata de coagulação incluem dois conjuntos de componentes macros e multimoleculares compondo as chamadas vias extrínseca e intrínseca da coagulação sanguínea. A via extrínseca é mediada pelo fator tecidual, cuja ativação possibilita uma resposta (formação do coágulo) de maneira rápida e eficiente. Já a via intrínseca, também chamada via do sistema-contato, é responsável pela manutenção, de forma continuada (até sua desativação pela ação de inibidores) da ativação dos fatores de coagulação.

A ativação dos componentes zimogênicos da cascata de coagulação ocorre tanto pela indução de modificações conformacionais como também por proteólise limitada produzida sobre o fator protéico inativo.

Na lesão vascular, o fator tecidual, liberado da membrana das células endoteliais, liga-se à forma inativa do FVII, gerando a forma ativa dessa proteína (FVIIa). O conjunto multimolecular formado por FVIIa mais o fator tecidual, cálcio e fosfolipídios formam o complexo Xase extrínseco, responsável pela ativação do FX a FXa.

Na seqüência do processo, a próxima etapa inclui a participação do FXa, FVa, fosfolipídios e cálcio, formando o complexo protrombinase, que produz a

conversão da protrombina a trombina, a enzima responsável pela clivagem do fibrinogênio, resultando no coágulo de fibrina.

A trombina, enzima central de todo o processo de coagulação, também é a responsável pela ativação dos fatores V, VIII e XI, num mecanismo de retroalimentação positiva. Além disso, a trombina ativa o FXIII a FXIIIa (transglutaminase), que resulta numa rede estável de fibrina.

A via intrínseca é também acionada quando da lesão tecidual, resultando na exposição, à luz do vaso, de componentes celulares e moleculares contendo superfícies com cargas negativas. Sobre tal superfície alojam-se o FXII, o cininogênio de alto peso molecular e a precalicreína. Dessa etapa resulta a ativação dos fatores enzimáticos, resultando na formação da calicreína plasmática e do FXIIa, além da liberação de bradicinina por ação da calicreína sobre o cininogênio. O acionamento dessa via ocorre em condições especiais, em que o processo resulta de estímulo continuado como nos procedimentos cirúrgicos.

Na evolução da cascata de eventos, o FXIIa ativa o FXI a FXIa, que por sua vez ativa o FIX a FIXa. Em conjunto, os fatores FIXa, FVIIIa, fosfolípidios e cálcio formam o complexo Xase intrínseco.

Em condições fisiológicas, o coágulo formado pela conversão de fibrinogênio em fibrina é dissolvido, de maneira eficiente, pelo sistema fibrinolítico. A cascata de fibrinólise, etapa complementar à cascata de coagulação, uma vez ativada, facilita a recomposição do estágio potencial da coagulação sanguínea, onde os fatores protéicos plasmáticos que atuam neste eficiente processo estão presentes como zimogênios ou precursores dos fatores propriamente ativos da

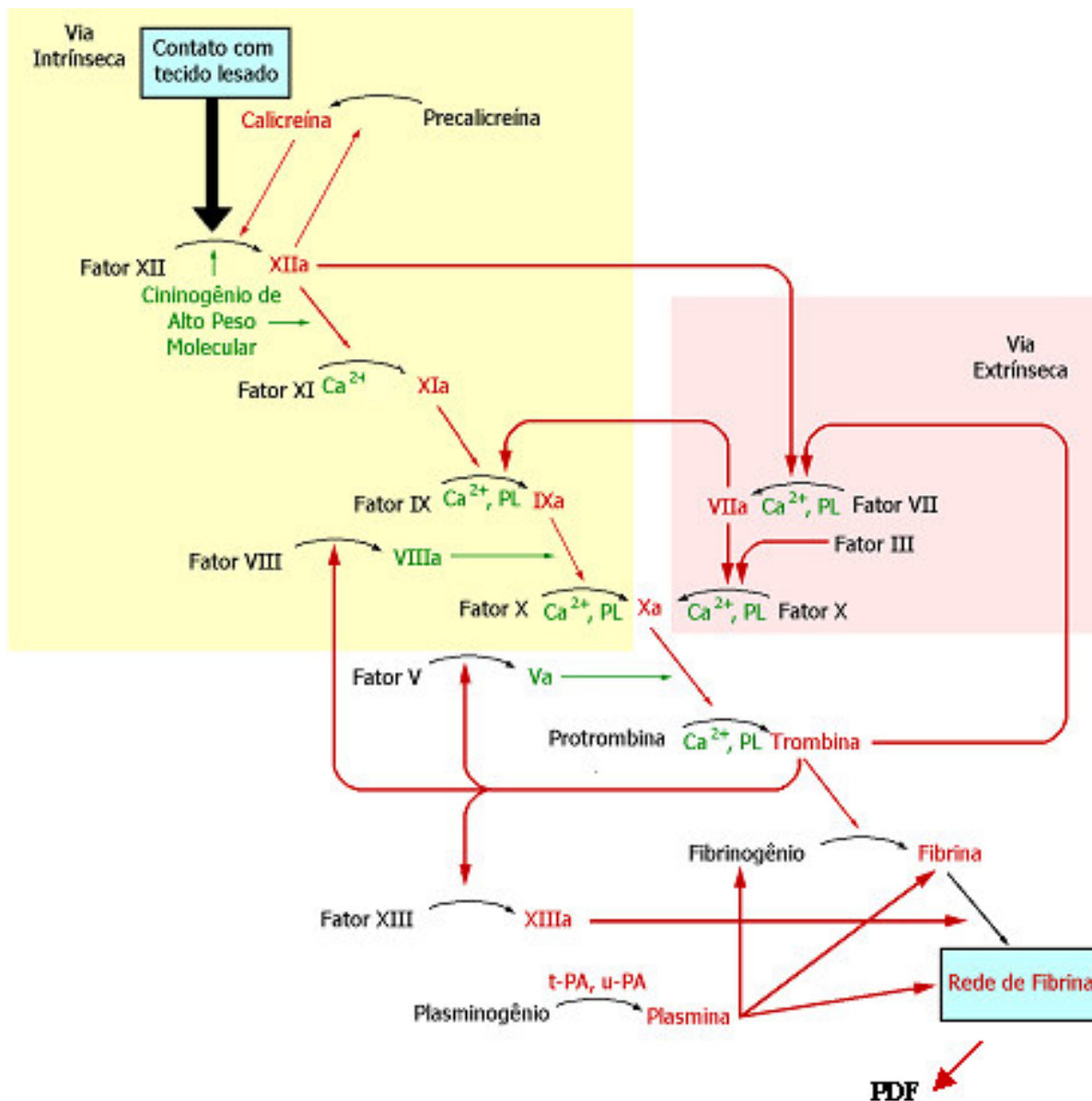


Figura 8. Cascata de Coagulação Sangüínea. Vias Intrínseca (fundo amarelo) e Extrínseca (fundo rosa). Os fatores de coagulação ativados estão representados em vermelho, enquanto os cofatores (fatores V e VIII, cálcio e fosfolipídios) estão em verde (Modificado de Streyer, 1992).

coagulação, resultando na manutenção da forma fluida do sangue (TAKADA *et al*, 1994). Também como visto na Figura 8, nesse processo, o precursor é o plasminogênio. Esta pró-enzima circulante é ativada tanto pelo ativador tecidual do plasminogênio (t-PA) como pelo ativador tipo-uroquinase (u-PA), gerando plasmina,

uma protease central no processo de degradação da fibrina. A plasmina atua em pontos específicos da rede de fibrina, desestruturando o coágulo e formando os produtos de degradação da fibrina (PDF). Além do seu papel na degradação da rede de fibrina, a plasmina tem ação importante nos quadros fisio-patológicos, como nos envenenamentos por animais peçonhentos, em que o plasminogênio pode ser ativado diretamente por componentes do veneno, sem envolvimento da cascata da coagulação e, portanto, da formação de fibrina. Assim, na ausência de fibrina para a qual tem maior afinidade, a plasmina uma vez ativada, é capaz de degradar o fibrinogênio, constituindo um quadro particular de coagulopatia de consumo onde, se muito prolongada esta ação, poderá resultar em hemorragia por falta do substrato (fibrinogênio) para formar o coágulo quando (e se) houver acionamento da cascata de coagulação. Como se verá mais adiante, esta condição tem interesse especial nos estudos desenvolvidos nesse trabalho.

1.4. Inflamação

O processo inflamatório se constitui, como um todo num conjunto de reações complexas, não específicas, que ocorre no tecido conjuntivo vascularizado em resposta a estímulos endógenos ou exógenos. Pode ser aguda ou crônica. A inflamação aguda é caracterizada como uma resposta rápida a um agente nocivo, variando de alguns minutos a alguns dias. Já a inflamação crônica tem uma duração maior em resposta a estímulos mais continuados e envolve a presença de componentes celulares, incluindo ativa participação de linfócitos e macrófagos e a ocorrência de necrose tecidual (ROITT *et al.*, 1997; CONTRAN *et al.*, 2000).

A inflamação aguda é composta por etapas distintas, mas inter-relacionadas como os fenômenos exudativos, que alteram o calibre vascular, aumentando o fluxo sanguíneo e a permeabilidade vascular, causando assim, o extravasamento de proteínas plasmáticas e de leucócitos da circulação, resultando na migração dessas células, principalmente de neutrófilos e monócitos, para o foco inflamatório (MONTENEGRO & FECCHIO, 1999; CONTRAN *et al.*, 2000).

A migração celular evocada pelo processo inflamatório resulta de uma resposta induzida (quimiotaxia) a partir do disparo de um mecanismo de liberação de certos agonistas celulares que direcionam estas células para o local da inflamação. O processo compreende também mecanismos de reconhecimento célula-célula e célula-matriz extracelular (SPRINGER, 1990; STOOLMAN, 1989). A Figura 9 resume as etapas desse processo. Com o aumento da permeabilidade vascular e conseqüente redução da velocidade do fluxo sanguíneo, os leucócitos assumem uma posição periférica ao longo da superfície endotelial chamada de marginação. Em seguida, enfileirados, aderem levemente ao longo do endotélio, por mediação de moléculas da família das selectinas (moléculas de baixa afinidade), constituindo o processo de “rolamento” endotelial. Na seqüência, aderem firmemente ao endotélio. O processo de adesão celular é mediado pelas integrinas, moléculas para as quais possuem alta afinidade. Uma vez aderidos, os neutrófilos emitem pseudópodes que penetram a junção intercelular das células endoteliais, posicionando-se entre estas e a membrana basal, possibilitando assim, a transmigração celular (CONTRAN *et al.*, 2000).

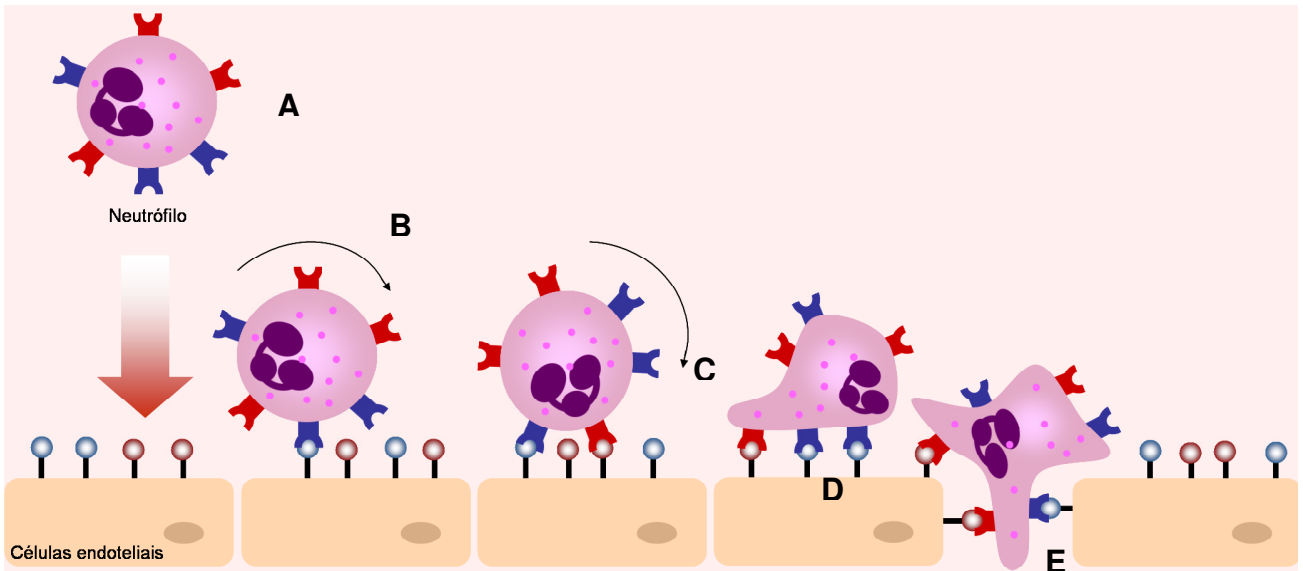


Figura 9. Migração celular. **A.** Neutrófilo; **B.** Rolamento **C.** Adesão; **D.** Adesão firme; **E.** Transmigração.

Os neutrófilos polimorfonucleados (PMN) representam cerca de 50 a 70% do total de leucócitos no sangue. São as primeiras células de defesa que se deslocam para o sítio inflamatório. São originários de células da medula óssea e, após a maturação passam para a circulação, onde permanecem cerca de 8 h. Além dos PMN, os eosinófilos e células mononucleadas também migram para o local da inflamação.

Existem muitos estudos demonstrando a relação entre a inflamação e a coagulação. Citocinas próinflamatórias são importantes mediadores da coagulação, ativando fatores de coagulação e inibidores fisiológicos. Da mesma forma, a cascata fibrinolítica pode modular a inflamação através de receptores celulares específicos (CHOIR *et al.*, 2006. ; ESMON, 2005).

1.5. Quadro Clínico provocado pelo envenenamento com a *L. obliqua*

O contato com a lagarta provoca, instantaneamente, dor, sensação de queimadura, edema e eritema (ABELLA *et al.*, 1998). Estes sintomas variam de intensidade de acordo com as circunstâncias do acidente, como número de lagartas e a fase larval (instar) em que se encontra. A Figura 10 ilustra algumas das principais manifestações clínicas, que são caracterizadas por graves distúrbios hemorrágicos (hematúria, gengivorragia, epistaxe, sangramentos pós-traumáticos, equimose intensa, hematomas, hemorragias intra e extra-peritoniais), coagulação intravascular disseminada (CIVD) e insuficiência renal aguda (IRA) (ABELLA *et al.*,1998; DUARTE *et al.*,1990; DUARTE *et al.*,1996; ZANNIN *et al.*,2003).

Hemorragias menos comuns, localizadas em órgãos como tireóide e peritônio, juntamente com hemorragias intracerebral e pulmonar são complicações severas destes acidentes e enfatizam a gravidade do mesmo (DUARTE *et al.*,1990; DUARTE *et al.*,1996; KELEN *et al.*,1995). Embora constitua grave sintoma resultante do envenenamento, o mecanismo de disfunção renal ainda não está esclarecido, havendo indícios de que ocorra grande deposição de fibrina nos capilares dos glomérulos (GAMBORGI *et al.*, 2006).

Os pacientes acidentados por *L. obliqua* apresentam os tempo de protrombina (PT), tempo de tromboplastina parcialmente ativada (APTT) e tempo de trombina (TT) prolongados. Há redução dos níveis de fibrinogênio, fatores V e XIII e plasminogênio e elevados níveis circulantes de produtos de degradação do fibrinogênio (FDP) (ZANNIN *et al.*,2003).

A necessidade de um tratamento específico fez com que o Instituto Butantan desenvolvesse um soro capaz de neutralizar este veneno. O soro antilonômico, uma solução de imunoglobulinas obtidas a partir da imunização de eqüinos com extrato bruto de espículas, está disponível para uso desde 1996 (DA SILVA *et al.*, 1996; ROCHA-CAMPOS *et al.*, 2001).



Figura 10. Sinais clínicos do envenenamento por *L. obliqua*. **A.** Gengivorragia; **B.** Hematoma no dedo do paciente; **C-D.** Equimoses espalhadas pelo corpo (ABELLA *et al.*, 1998; ZANNIN *et al.*, 2003).

A Organização Mundial de Saúde recomenda aos países tropicais que os soros antivenenos sejam apresentados na forma liofilizada por ser mais estável e de fácil armazenamento. No entanto, no Brasil, o soro é produzido somente na forma líquida, requerendo, pois, maiores cuidados na conservação (temperatura

deve permanecer entre 4 – 8 °C), devendo-se ter o cuidado para que este soro não congele, pois perderia sua ação neutralizante. Torna-se ainda importante ressaltar que a administração do soro é intravenosa e realizada em ambiente hospitalar visto que, por tratar-se de proteínas heterólogas, há risco desencadear reação anafilática à soroterapia. A freqüência de reações à soroterapia é muito variável, entre 4,6% até 87,2%, e geralmente ocorre durante a aplicação ou até 2h após o tratamento do paciente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001).

1.6. Princípios ativos presentes nas secreções das lagartas do gênero *Lonomia*

No Brasil, alguns grupos de pesquisa vêm estudando os princípios ativos presentes na secreção venenosa da lagarta *L. obliqua*, buscando elucidar seu mecanismo de ação, bem como o quadro que se estabelece no paciente envenenado pelo contato com a taturana. Sabe-se que o alvo principal do veneno é o processo hemostático, em especial a cascata de coagulação, sendo, todavia, paradoxal o quadro clínico estabelecido caracterizado por efeitos antagônicos: ação pró-coagulante e hemorrágica. Já foram identificados um ativador de fator X e um ativador de protrombina (DONATO *et al.*, 1998) e enzimas com atividade fibrinolítica e fibrinogenolítica (FRITZEN *et al.*, 2003; PINTO, 2002; PINTO *et al.*, 2004; PINTO *et al.*, 2006; VEIGA *et al.*, 2003). A participação de princípios ativos do veneno em outros processos como inflamação (FRITZEN *et al.*, 2003) edema e nocicepção (DE CASTRO BASTOS *et al.*, 2004) também já foram alvo de estudos e caracterização.

Recentemente, o nosso grupo identificou uma atividade ativadora de precalicreína, que mostra o envolvimento do sistema calicreína-cininas no envenenamento. Como mencionado acima e ilustrado na Figura 11, uma vez ativada, a calicreína plasmática atua diretamente sobre a cascata da coagulação, ativando FXII na via intrínseca e, por proteólise limitada do cininogênio de alto peso molecular, libera a bradicinina, um potente vasodilatador e, em conseqüência, um agente hipotensor. Por sua ação vasodilatadora, a bradicinina promove a permeabilidade vascular, interferindo indiretamente na migração celular atuando portanto, nos processos inflamatórios. Uma condição patológica importante resultante da diminuição do fluxo sangüíneo na artéria renal, devido à hipotensão mediada pelo sistema calicreína-cininas, é a insuficiência renal aguda (BOHRER, *et al.*, 2007).

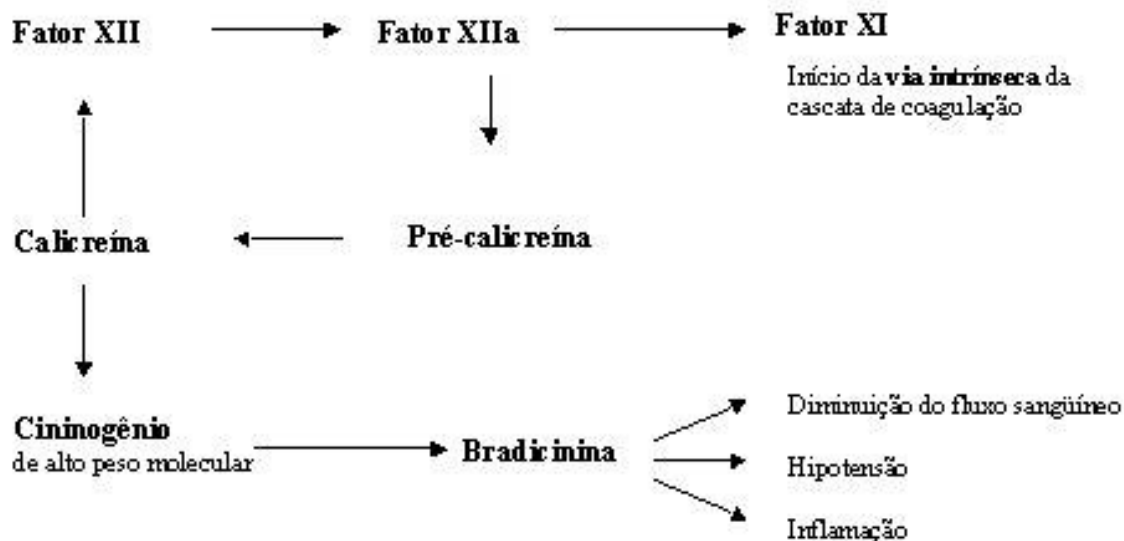


Figura 11. Esquema da ativação do sistema contato. Ativação do fator XII inicia a via intrínseca da cascata de coagulação, através da ativação do fator XI, ao mesmo tempo em que inicia o processo inflamatório pela liberação de bradicinina do cininogênio plasmático

1.7. Semelhança entre os acidentes causados por *L. obliqua* e serpentes do gênero *Bothrops*

O efeito paradoxal (coagulação e hemorragia) resultante do envenenamento pela lagarta, devido à presença de princípios ativos com atividades pró e anticoagulantes é característico do veneno de *L. obliqua*, mas também ocorre no veneno de serpentes do gênero *Bothrops*. (jararaca, cruzeira, cotiara, jararaca-pintada).

O diagnóstico sobre a origem do envenenamento tem como base principal a descrição do acidente feita pelo paciente, de uma avaliação médica do acidentado e de exames laboratoriais pertinentes com o quadro hemorrágico. Todavia, tal diagnóstico se torna bastante difícil nos casos (não raros) em que o paciente não viu o animal e, portanto não foi possível verificar se teve contato com uma taturana (basta uma lagarta para causar um grave acidente) ou se foi picado por uma serpente (filhotes de jararaca são extremamente perigosos).

Acidentes com serpentes do gênero *Bothrops*, principalmente animais jovens, apresentam uma sintomatologia muito semelhante àquela causada pela *L. obliqua*. O edema volumoso, sintoma importante na caracterização do acidente botrópico causado por uma jararaca adulta, apresenta-se muito discreto ou está completamente ausente quando a serpente causadora é jovem. As enzimas proteolíticas responsáveis pelos sintomas no local da picada, como dor e edema, não são expressas no veneno de filhotes.

Os principais sintomas do envenenamento por serpentes do gênero *Bothrops* incluem hemorragia local ou sistêmica, além de edema, dor e necrose.

Também são comuns choque hipotensivo, coagulação intravascular disseminada e insuficiência renal.

A distribuição geográfica destes animais poderia auxiliar no diagnóstico dos acidentes em que o agente causador não foi visualizado. Porém, em regiões que ocorrem tanto *Lonomia* sp. quanto *Bothrops*. sp. e ainda com o mesmo perfil sazonal, como é o caso da região Sul do Brasil, a indefinição sobre a origem do agente causador do acidente agrava sobremaneira o diagnóstico apropriado. Desta forma, sendo os sintomas iniciais muito semelhantes nos dois tipos de envenenamento, torna-se bastante difícil definir o tratamento clínico de maneira adequada, a começar da escolha do soro a ser aplicado no paciente, o que constitui motivo de grande preocupação entre as equipes de saúde que atuam nas regiões de grande incidência de tais acidentes.

2. OBJETIVOS

Considerando a gravidade dos acidentes causados por *L. obliqua* em toda a região Sul, em que os pacientes apresentam hemorragias e complicações importantes podendo levar ao óbito, pretende-se com este trabalho estudar o e inflamatório desencadeados pelo veneno desta lagarta, assim como identificar inibidores deste veneno que pudessem ser utilizados na neutralização dos efeitos nocivos, como uma perspectiva de tratamento, de uso tópico, em pacientes.

2.1 Objetivos específicos

Identificar a especificidade do soro antilonômico no reconhecimento das proteínas presentes nos extratos e secreções de *L. obliqua*, bem como a ação neutralizante deste soro frente às atividades pró-coagulante e fibrinogenolítica responsáveis pelo quadro clínico.

Verificar a existência de reação cruzada entre os soros e os venenos de *L. obliqua* e *B. jararaca*;

Padronizar um modelo experimental para a avaliação do induzido pelo extrato de espículas de *L.obliqua*, determinando a dose de veneno capaz de induzir sangramento, bem como a duração deste efeito e a ação do soro antilonômico e do EDTA como inibidores desta atividade.

Verificar a ocorrência de extravasamento vascular induzido pelo extrato de espículas em modelo animal, determinando a dose de veneno capaz de provocar este fenômeno, assim como a duração deste efeito e a ação de inibidores da hemostasia sobre o extravasamento vascular.

Monitorar a ocorrência de migração celular, determinando a dose capaz de induzir a migração, o intervalo de tempo e a ação de inibidores da hemostasia sobre a migração celular.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Extratos e secreções de *L. obliqua*

As lagartas foram coletadas por equipes municipais de saúde do interior do Rio Grande do Sul, encaminhadas ao CIT/RS e cedidas para o nosso laboratório. Foram utilizados quatro diferentes materiais neste trabalho: extrato de espículas e de tegumento, hemolinfa e crio-secreção.

O extrato de espículas foi preparado cortando-se as cerdas junto ao tegumento de lagartas imobilizadas a -20°C . As cerdas foram maceradas em potter (Potter Elvehjem-Style Tissue Homogenizer) com 2 mL de água milli-Q. Este material foi centrifugado a 9600 g por 20 min e o sobrenadante, identificado por “extrato de espículas”, foi mantido a -20°C .

A hemolinfa foi preparada utilizando lagartas imobilizadas a -20°C . Inicialmente era feita pressão sobre a região da cabeça para que fosse expelida secreção digestiva e em seguida cortava-se uma das falsas pernas para a coleta da secreção. Material coletado foi centrifugado a 9600 g por 20 min e o sobrenadante, identificado como “hemolinfa”, foi mantido a -20°C .

O tegumento foi isolado cortando as duas extremidades da lagarta e fazendo-se um corte longitudinal, possibilitando a retirada dos órgãos internos e limpeza deste tecido. O tegumento foi homogeneizado em potter com 2 mL de água milli-Q. Este material foi centrifugado a 9600 g por 20 min e o sobrenadante, identificado por “extrato de tegumento”, foi mantido a -20°C .

A crio-secreção foi coletada submetendo as lagartas de maior tamanho a um estresse térmico, com temperatura de -20°C por um período de 24 h. Após esta

fase, cada lagarta foi lavada com 500 μ L de água milli-Q. A secreção obtida foi centrifugada à 9600 g por 20 min e o sobrenadante, identificado como “criossecreção”, foi mantido a -20°C .

3.2. Veneno de *B. jararaca*

O veneno utilizado foi uma mistura liofilizada resultante da extração de vários espécimes adultos de serpente *B. jararaca*, fornecido pelo Laboratório de Toxinas Naturais do CIT/RS.

3.3. Reagentes

As soluções utilizadas foram preparadas com reagentes de grau analítico.

Plasma humano citratado foi cedido pelos Bancos de Sangue do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e da PUCRS.

Soro antilonômico, lote 0104062/A, produzido pelo Instituto Butantan e o soro antibotrópico, lote 980929/05C, produzido pela Fundação Ezequiel Dias foram cedidos pelo CIT/RS.

O sistema para eletroforese (SDS-PAGE), BCIP e NBT foi adquirido da Bio-Rad (EUA).

Fibrinogênio bovino e Comassie Brilliant Blue-G, EDTA, Benzamidina, Heparina, Azul de Evans foram adquiridos da Sigma (EUA).

Os anestésicos cloridrato de quetamina 10% (Dopalen®) e cloridrato de xilazina 2% (Anasedan®) foram adquiridos da Vetbrands.

3.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) foi realizada segundo o método de Laemmli (1970) usando o gel de empacotamento a 5% e gel de corrida a 12%. Foram utilizados como marcadores de peso molecular: fosforilase B (97 kDa), albumina bovina (67 kDa), ovoalbumina (45 kDa), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (36 kDa), anidrase carbônica (29 kDa) e tripsinogênio (24 kDa). Os géis foram corados com Comassie Brilliant Blue-G.

3.5. Western-blot

A transferência das amostras do gel para a membrana de nitrocelulose teve duração de 1h no sistema NovaBlot Pharmacia, logo após foi feito bloqueio da membrana com solução de caseína 5% (overnight). A incubação com anticorpo primário foi feita na diluição 1:1000 (Soro Antilonômico) ou 1:5000 (Soro Antibotrópico) por 24 h. O anticorpo secundário (soro de coelho anti-imunoglobulina de cavalo) marcado com fosfatase alcalina, foi adicionado na diluição 1:10000 por 1 h. A revelação ocorreu incubando-se a membrana com substrato para fosfatase alcalina: 0,016% BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolyl-phosphate) e 0,033% NBT (nitroblue tetrazolium salt).

3.6. Ensaio de Coagulação – Tempo de Recalcificação

A atividade pró-coagulante do extrato de espículas e do veneno de jararaca sobre o plasma humano foi testada pelo ensaio de tempo de recalcificação, adaptado para o sistema SpectraMax (RIBEIRO *et al.*, 1995). Em um volume final de 150 μL , 25 μg de extrato de espículas ou 15 μg de veneno de *B. jararaca* foram incubados com 75 μL de tampão HEPES 20 mM, pH 7,4 e 50 μL de plasma humano citratado. Para iniciar a reação de coagulação, após 5min a 37°C, foram adicionados 10 μL de CaCl_2 150 mM. A reação foi monitorada durante 20 min com leituras a cada 15 segundos a 650 nm.

Para analisar o efeito do soro antilonômico em neutralizar a atividade pró-coagulante do extrato de espículas e do veneno de *B. jararaca*, foram pré-incubados 25 μg de extrato de espícula ou 15 μg de veneno de *B. jararaca* com 50 μL de soro antilonômico por 30 min, a 37°C. Da mesma forma, foram incubados 25 μg de extrato de espículas ou 15 μg de veneno de *B. jararaca* com 50 μL de soro antibotrópico por 30 min, a 37°C. Após a incubação, plasma bovino (50 μL) foi adicionado e incubado a 37°C por 5 min. A reação de coagulação foi iniciada pela adição de CaCl_2 150 mM. A cinética da coagulação foi monitorada a 650 nm, a 37°C.

Em um ensaio de coagulação (Figura 12), observam-se três fases distintas: fase lag, fase log e o platô da curva. A fase inicial, chamada de lag, ocorre imediatamente após da adição do cálcio. É nesta etapa que ocorre a ativação dos fatores de coagulação dependentes de cálcio. Nessa fase não se observa nenhum

incremento na densidade ótica. A fase log ou exponencial ocorre em seguida à fase inicial, onde os fatores de coagulação já ativados convertem a protrombina em trombina e esta forma o coágulo de fibrina a partir do fibrinogênio. Nesta etapa observa-se o aumento de absorbância no meio, relativo ao coágulo. A última fase é chamada de platô da curva, onde todo o fibrinogênio já foi convertido a fibrina. Nessa fase, não há aumento de absorbância.

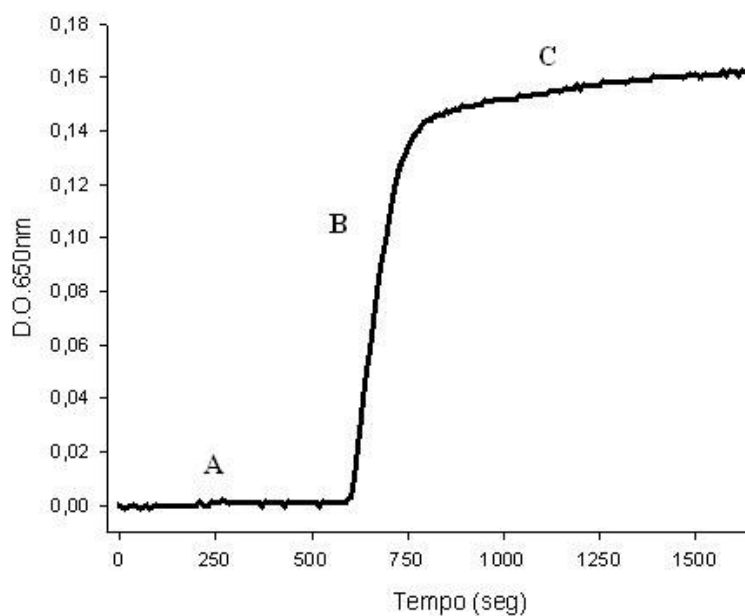


Figura 12. Ensaio de Tempo de Recalcificação.
A. Fase Lag, B. Fase Log e C. Platô da curva

3.7. Atividade Fibrinogenolítica

A atividade da crio-secreção sobre o fibrinogênio foi estudada através do ensaio de fibrinocoagulação. Crio-secreção (13 µg) foi incubada com fibrinogênio por 30 min ou pré-incubada com 50 µL de soro antilonômico pelo mesmo período

de tempo, a 37°C. Após a pré-incubação (soro + criosecreção) fibrinogênio foi adicionado e incubado a 37°C por 30 min. A reação foi disparada com a adição de trombina (0,2 µg). A cinética da coagulação foi monitorada a 650 nm em equipamento SpectraMax.

3.8. Animais

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*), machos, da linhagem Wistar, pesando entre 200 g e 300 g, nos modelos de efeito hemorrágico pós-incisão da cauda e extravasamento vascular. Os animais foram cedidos pelo Biotério do Departamento de Bioquímica/UFRGS.

No modelo de air pouch de migração celular, foram utilizados camundongos (*Mus domesticus*) machos pesando entre 25 g e 30 g. Estes animais foram cedidos pelo Biotério da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS).

Todos os animais foram mantidos em caixas apropriadas de polipropileno, em ambiente com temperatura controlada (22-24 °C), em fotoperíodo de 12 h claro/escuro. Alimento e água foram fornecidos *ad libitum* durante todo o experimento.

Os animais foram anestesiados com 100 mg/kg de cloridrato de quetamina 10% associado na mesma seringa com 10 mg/kg de cloridrato de xilazina 2%, por via intraperitoneal.

Todos os protocolos envolvendo os animais de experimentação estão de acordo com o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

3.9. Efeito hemorrágico pós-incisão da cauda

O monitoramento do sangramento induzido pelo extrato de espículas de *L. obliqua* foi realizado pelo modelo experimental de incisão da ponta da cauda (Figura 13) após a administração do veneno. Inicialmente foi aplicado, via subcutânea, o extrato de espículas no dorso dos animais.

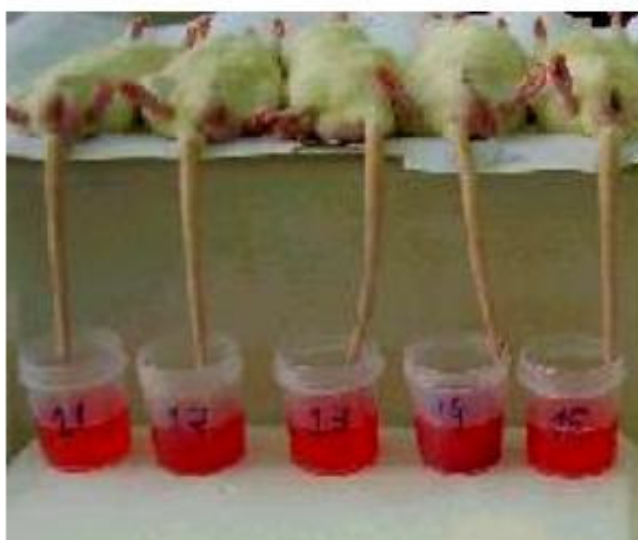


Figura 13. Ensaio de Efeito hemorrágico pós-incisão da cauda. Animais anestesiados com as caudas imersas em água destilada onde permaneciam até 1 h após a incisão.

Após 2 h, os animais foram anestesiados, a cauda foi incisada (3 mm) e imediatamente colocada imersa em uma proveta com 40 mL de água. O grupo controle recebeu o mesmo volume de tampão PBS e teve a cauda incisada após 2 h da administração do tampão. O sangramento foi monitorado até 1h após a incisão da cauda. Alíquotas foram recolhidas para leitura em espectrofotômetro a 540 nm.

Os animais, devidamente anestesiados, foram sacrificados pelo corte do diafragma. Os resultados são apresentados pela quantidade de hemoglobina/mL.

O efeito da dose de extrato de espículas no efeito hemorrágico foi realizado utilizando concentrações crescentes do extrato (50 µg/kg, 100 µg/kg e 200 µg/kg). O grupo controle recebeu o mesmo volume de tampão PBS.

A duração do também foi testada em 12 e 24 horas após a aplicação do extrato de espículas. Foram administrados 200 µg/kg de extrato de espículas de *L. obliqua*, diluídos em 100 µL de tampão PBS, via subcutânea, no dorso dos animais e a incisão da cauda realizada após 2 h, 12 h e 24 h.

O estudo comparativo do induzido pelo extrato de espículas de *L. obliqua* e o veneno de *B. jararaca* foi realizado pela administração via subcutânea dos venenos 30 minutos após a incisão da cauda. Foram utilizados 200 µg/kg de extrato de espículas ou de veneno bruto de *B. jararaca*, diluídos em 100 µL de tampão PBS. A perda sanguínea foi monitorada através de alíquotas (100 µL) coletadas num intervalo de 30 min até 5 h após a incisão da cauda. O grupo controle recebeu o mesmo volume de tampão PBS.

A ação do soro antilonômico frente ao induzido pelo veneno de *L. obliqua* foi testada pré-incubando 200 µg/kg extrato de espículas com 80 µL de soro antilonômico, num volume final de 150 µL, durante 15 min, 30 min ou 60 min, em temperatura ambiente. Após este período, o material incubado (soro + veneno) foi administrado no dorso do animal. Após 2 h, a cauda foi incisada e os demais procedimentos realizados como descrito acima. Os controles positivo e negativo receberam 200 µg/kg de extrato de espícula diluídos em 150 µL de tampão PBS ou apenas tampão PBS, respectivamente.

A ação do EDTA também foi testada frente ao induzido pelo extrato de espículas. Extrato de espículas de *L. obliqua* (200 µg/kg) foi pré-incubado com 80 µL de soro antilonômico por 60 min ou com EDTA 10 mM por 15 min, num volume final de 150 µL. Após este período, foi administrado no dorso do animal como nos ensaios anteriores.

A ação inibitória do soro antilonômico e do EDTA frente ao foi testada diretamente nos animais. Extrato de espículas de *L. obliqua* (200 µg/kg) foi aplicado, via subcutânea, no dorso dos animais. Os controles positivo e negativo receberam 200 µg/kg de extrato de espícula diluídos em 150 µL de tampão PBS ou apenas tampão PBS, respectivamente.

Após 30 min foram administrados 80 µL de soro antilonômico (via endovenosa) ou EDTA 10 mM (via subcutânea) diluídos num volume final de 150 µL. Os controles positivo e negativo receberam, após 30 min, 150 µL de tampão PBS.

3.10. Extravasamento vascular

A análise do extravasamento vascular induzido pelo extrato de espículas em modelo animal foi realizada pelo ensaio baseado na quantificação do corante de azul de Evans ($C_{34}H_{24}N_6Na_4O_{14}S_4$). Animais anestesiados foram submetidos à tricotomia e demarcados em 12 quadrantes na região dorsal (Figura 14A). Na seqüência, foram administrados 50 mg/kg do corante azul de Evans (via veia peniana).

Para estabelecer a dose a ser utilizada neste experimento, foram aplicadas em cada quadrante concentrações diferentes do extrato de espícula (15 μg , 30 μg e 60 μg) diluídas em 100 μL de tampão PBS, via subcutânea. O controle recebeu tampão PBS no mesmo volume das amostras. Após 30 min, os animais devidamente anestesiados foram sacrificados pelo corte da jugular e tiveram a pele dorsal removida (Figura 14B). Os quadrantes de pele foram recortados e mantidos numa solução de formamida 1:1 a 40°C por 48 h. Alíquotas desta solução foram lidas no espectrofotômetro, a 600 nm. Os resultados são apresentados pela quantidade de azul de Evans/mL.

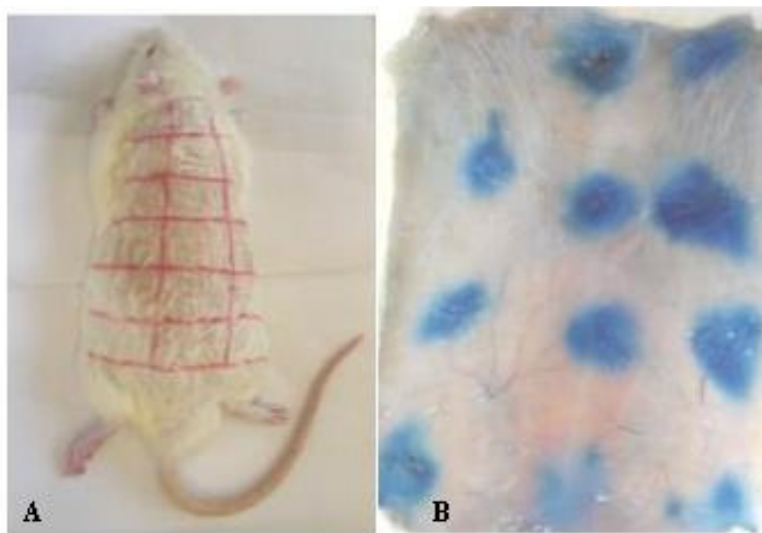


Figura 14. Ensaio de Extravasamento vascular. A. Animal anestesiado após tricotomia e demarcação da área a serem aplicadas as amostras. B. Pele removida contendo manchas azuis referentes ao extravasamento do corante azul de Evans.

Para constatar a presença de extravasamento vascular após 24 h da administração do extrato de espículas, foram aplicados 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de extrato de espícula 24 h e 2 h antes da injeção do azul de Evans. O controle negativo recebeu

tampão PBS no mesmo volume das amostras. O controle positivo recebeu 30 µg/kg de extrato de espículas logo em seguida da aplicação do corante de azul de Evans.

O efeito de inibidores da hemostasia no extravasamento vascular induzido pelo extrato de espículas foi testado pela aplicação de cremes imediatamente após a administração do veneno. Os inibidores EDTA (40 mM), Benzamidina (40 mM) e Heparina (20 UI) diluídos em propilenoglicol foram homogeneizados, vagarosamente, com vaselina (70 %) e lanolina (30 %). Também foi utilizada a pomada comercial Hirudoid (organo-heparinóide polissulfato de mucopolissacáridos, 3 mg/g). A aplicação dos cremes foi padronizada com uma medida padrão.

3.11. Air pouch

A bolha de ar subcutânea (air pouch) simula uma cavidade existente no organismo, permitindo o estudo de migração celular in vivo. Os animais foram sedados com a inalação de éter etílico, em seguida 3 mL de ar estéril (oriundo de capela de filtro laminar, equipada com luz U.V.) foi aplicado via subcutânea no dorso dos camundongos. Após três dias da 1ª aplicação de ar, mais 3 mL de ar estéril foi administrado na mesma bolha. Os animais foram utilizados para o experimento no 6º dia (Figura 15).



Figura 15. Ensaio de “Air pouch”. Camundongo sedado com éter etílico, após 2ª aplicação de ar estéril na bolha subcutânea.

A dose a ser utilizada foi estabelecida testando três diferentes concentrações do extrato de espículas (5 μg , 10 μg e 20 μg por cavidade) diluídas em 1 mL de tampão PBS estéril. O grupo controle recebeu o mesmo volume de tampão PBS estéril. Após 8 h, os animais previamente anestesiados foram sacrificados. Em seguida foi administrado 3 mL de PBS com 60 UI de heparina na bolha de ar e, sem retirar a agulha, fez-se uma leve massagem para homogeneizar e retirar o lavado. A contagem total de células foi realizada diluindo-se alíquotas (10 μL) em 200 μL de solução de Turk (ácido acético glacial e água deionizada) e aplicando 20 μL desta diluição na câmara de Neubauer para a contagem em microscopia óptica. Os valores foram expressos em número de células totais por mL.

Para verificar qual o intervalo de tempo, após a administração de extrato de espícula, apresentava a melhor resposta de migração celular, foram

administrados 20 µg de extrato de espícula por cavidade e após 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h e 24 h os animais previamente anestesiados foram sacrificados como no ensaio anterior. O grupo controle recebeu o mesmo volume de tampão PBS estéril.

A ação de inibidores da hemostasia sobre a migração celular foi testada utilizando benzamidina, EDTA e heparina na técnica do air pouch. EDTA (1mM), benzamidina (20 mM) ou heparina (6 UI) foram diluídos em 150 µL de tampão PBS estéril e aplicados na bolha de ar 15 min antes da administração de 20 µg de extrato de espícula. Os animais controle receberam o mesmo volume de tampão PBS estéril. Os demais procedimentos são idênticos aos anteriores.

3.12. Análise Estatística

Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) de 8 animais por grupo. Para análise estatística, foi usada análise de variância (ANOVA) de uma via ou de medidas repetidas seguida pelo teste de Bonferroni, quando indicado. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos (ZAR, 1999).

4. RESULTADOS

4.1. Extratos e secreções de *L. obliqua*

Como pode ser observado na Figura 16, o perfil eletroforético apresentado nas quatro amostras (extratos e secreções) de *L. obliqua* demonstra diferenças específicas em cada tipo de material analisado. A maioria das proteínas, em todas as amostras, apresenta massa molecular abaixo de 66 kDa.

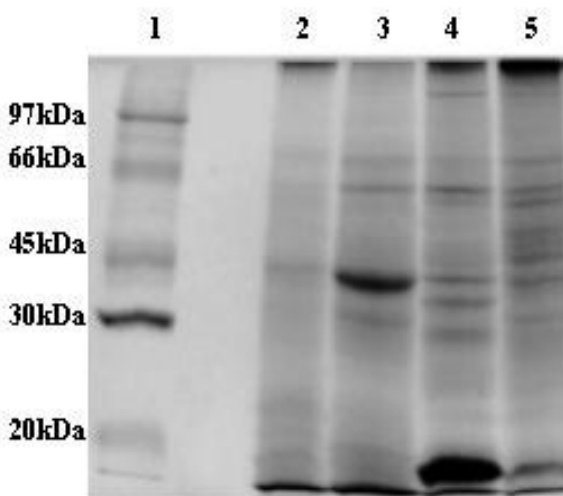


Figura 16. Perfil eletroforético dos extratos e secreções de *L. obliqua* em SDS-PAGE **1.** PPM; **2.** criossecção (20 µg); **3.** hemolinfa (20 µg); **4.** extrato de espículas (20 µg); **5.** extrato de tegumento (20 µg). Corado com Comassie Brilliant Blue-G

Na análise por western-blot (Figura 17) em que o soro antilonômico foi utilizado como anticorpo primário, houve reconhecimento de proteínas de diversas massas moleculares, principalmente entre 66 e 30 kDa, em todos os extratos e secreções. A hemolinfa apresentou o maior número de proteínas reconhecidas pelo

soro antilonômico, enquanto a criosecreção, o menor. Os extratos de espículas e tegumento apresentaram reconhecimento semelhante.

Em todos os materiais a maioria das proteínas reconhecidas apresenta baixo peso molecular. Quatro bandas de massa molecular semelhante (52 kDa, 46 kDa, 32 kDa e 15 kDa) foram reconhecidas nos quatro materiais analisados:

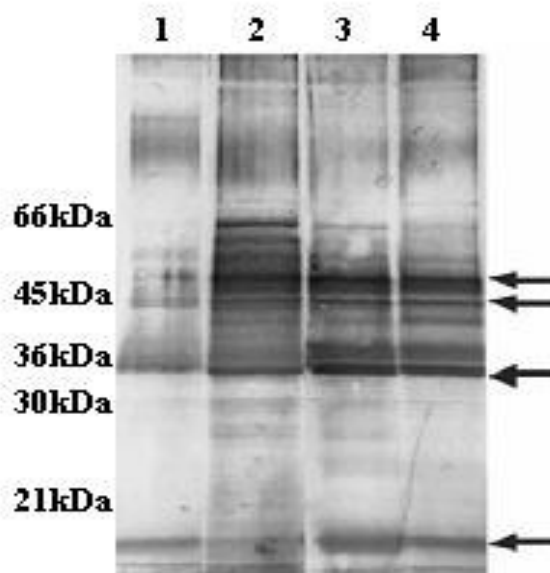


Figura 17. Western-blot dos extratos e secreções de *L. obliqua*. **1.** criosecreção (20 μ g); **2.** hemolinfa (20 μ g); **3.** extrato de espículas (20 μ g); **4.** extrato de tegumento (20 μ g). Soro antilonômico utilizado como anticorpo primário (1:1000).

4.2. Atividade pró-coagulante

No ensaio de tempo de recalcificação (Figura 18) o extrato de espículas apresentou evidente atividade pró-coagulante quando comparado com o controle (plasma sem amostra), eliminando a fase lag da coagulação. Quando este extrato foi incubado com o soro antilonômico, ocorreu a neutralização desta atividade, apresentando um perfil semelhante ao do controle.

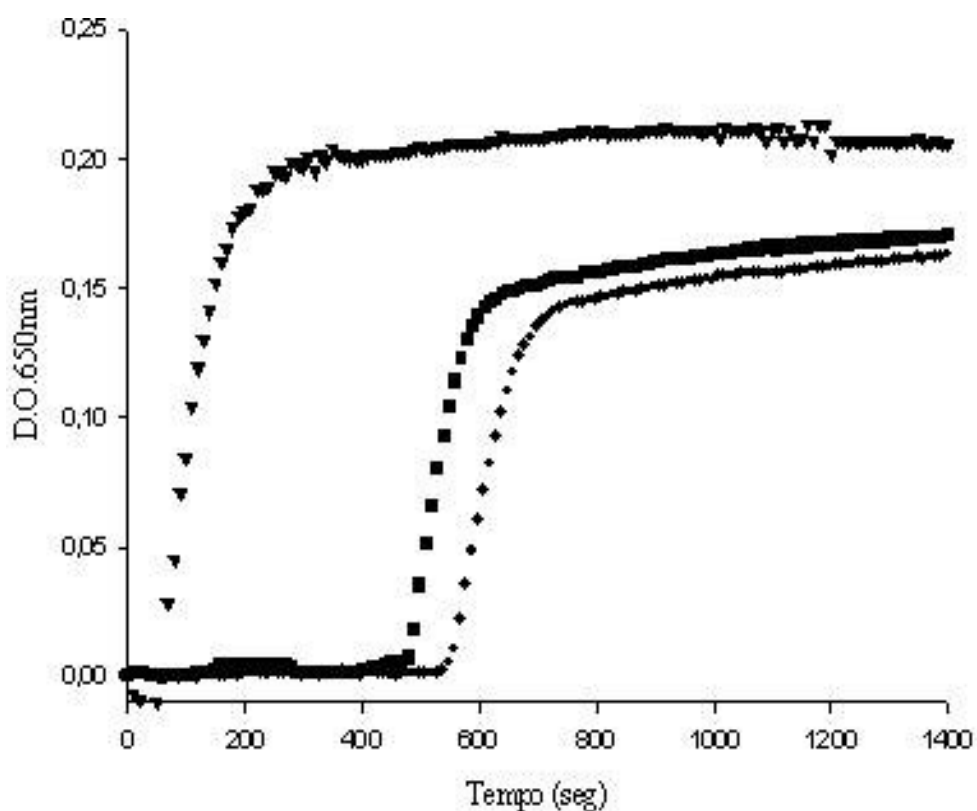


Figura 18. Ensaio de Tempo de Recalcificação. Tampão HEPES 20mM incubado com plasma (◆); com 25 µg extrato de espículas (▼) ou com extrato espículas + 50 µL de soro antilonômico(■).A reação foi iniciada com adição de 10 µL de CaCl₂ 150 mM. A Absorbância (D.O.) foi medida a 650 nm.

4.3. Atividade fibrinogenolítica

A Figura 19 mostra o efeito da crio-secreção de *L. obliqua* no perfil de fibrinocoagulação induzida por trombina. É possível observar que, quando o fibrinogênio foi incubado com a crio-secreção por 30 min, ocorreu total inibição da fibrinocoagulação. Esse efeito inibitório se dá pela degradação total do fibrinogênio no meio (Pinto, *et.al.*,2004). Para verificar se o soro antilonômico era capaz de neutralizar a atividade fibrinogenolítica presente na crio-secreção, foram incubados 50 μ L de soro antilonômico com 13 μ g de amostra durante 30 min à 37°C°. O soro antilonômico neutralizou a atividade fibrinogenolítica presente nesta secreção, apresentando um perfil semelhante ao controle.

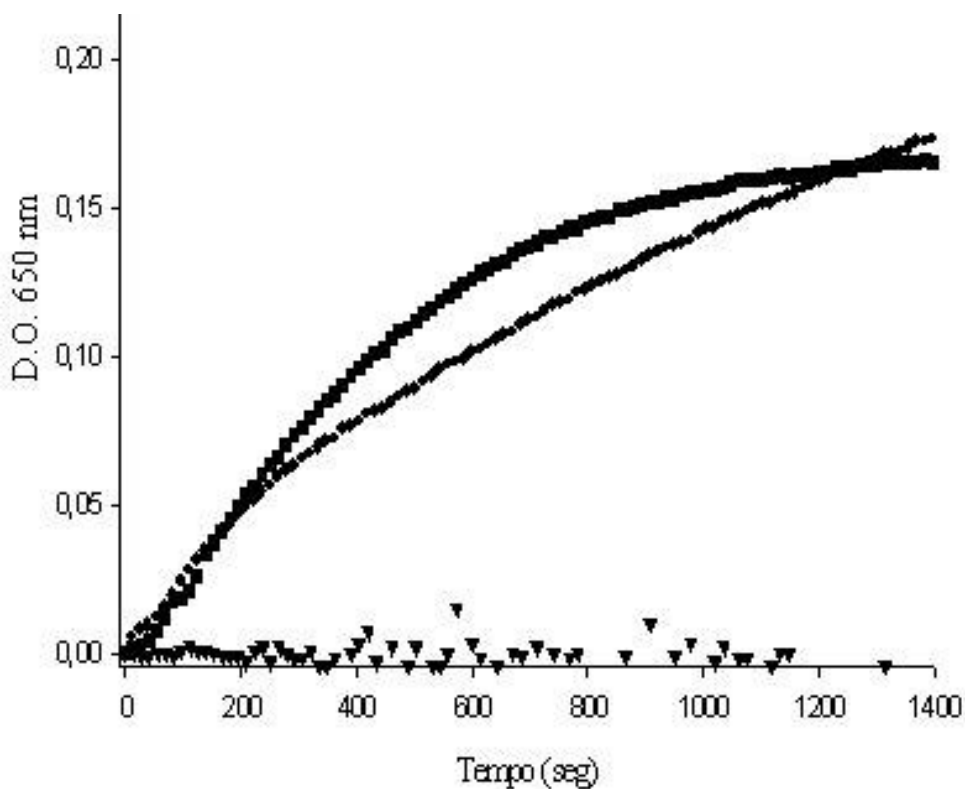


Figura 19. Ensaio de Fibrinocoagulação. Fibrinogênio (■); incubado com 13 μ g de crio-secreção (▼) ou com 13 μ g de crio-secreção + 50 μ L de soro antilonômico (◆). A reação foi iniciada com a adição de trombina (0,2 μ g). A Absorbância (D.O.) foi medida a 650nm.

4.4. Avaliação de reação cruzada entre os soros e os venenos de *L. obliqua* e *B. jararaca*

Em gel de SDS-PAGE (Figura 20A), o extrato de espículas de *L. obliqua* e o veneno de *B. jararaca* apresentam perfis distintos. Quando os dois venenos, no ensaio de western-blot, são incubados com o soro antilonômico (anticorpo primário) ocorre o reconhecimento de proteínas apenas do extrato de espículas (Figura 20B). Da mesma forma, quando o anticorpo primário utilizado foi o soro antibotrópico somente as proteínas presentes no veneno de *B. jararaca* foram reconhecidas (Figura 20C), evidenciando a alta especificidade desses anti-soros para seus respectivos antígenos.

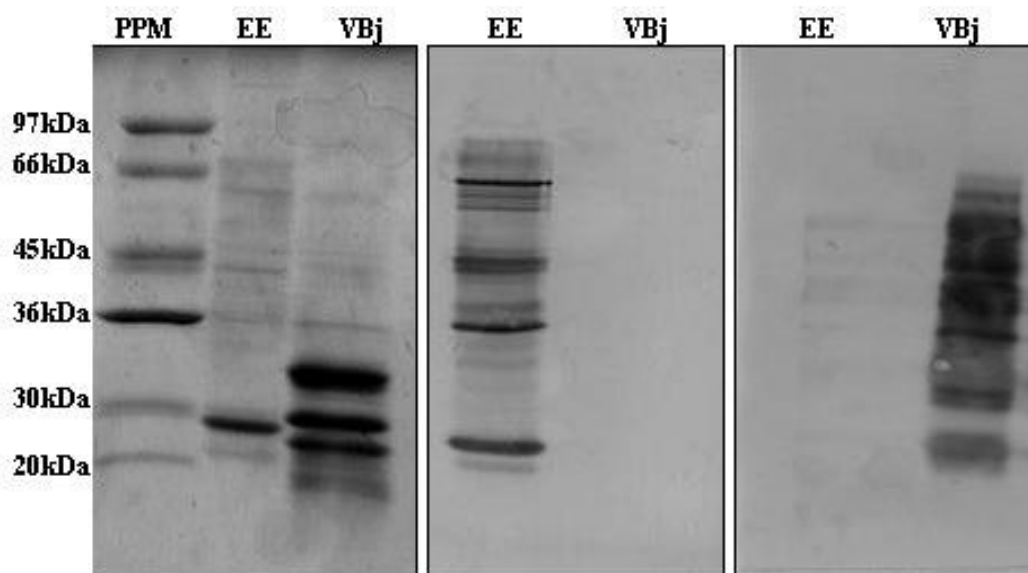


Figura 20. Eletroforese em SDS-PAGE e Western-blot do extrato de espículas de *L. obliqua* e do veneno bruto de *B. jararaca*. A. SDS-PAGE onde foram aplicados 20 μ g de extrato de espícula e 20 μ g de veneno bruto de *B. jararaca*; B-C. Western-blot do extrato de espículas de *L. obliqua* e do veneno bruto de *B. jararaca* utilizando como anticorpo primário, B. soro antilonômico e C. soro antibotrópico. PPM: padrão de peso molecular; EE: extrato de espícula; VBj: veneno bruto de *B. jararaca*.

No ensaio de tempo de recalcificação (Figura 21) foi comparada a capacidade dos soros antilonômico e antibotrópico em neutralizar a atividade pró-coagulante presente no extrato de espículas.

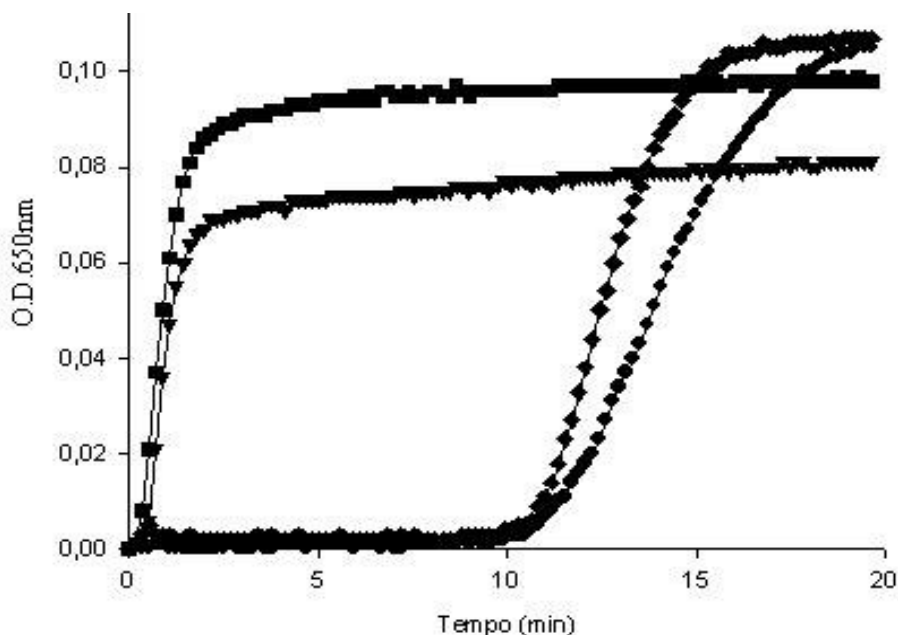


Figura 21. Efeito dos soros antilonômico e antibotrópico sobre a atividade pró-coagulante do extrato de espículas no ensaio de tempo de recalcificação. Tampão HEPES 20 mM incubado com plasma (●); 25 µg de extrato de espícula (■), 25 µg de extrato espículas + 50 µL de soro antibotrópico (▼) 25 µg de extrato espículas + 50 µL de soro antilonômico(◆) A reação foi iniciada com adição de CaCl_2 150 mM. A Absorbância (D.O.) foi medida a 650 nm.

Como demonstrado anteriormente, o extrato de espícula diminui o tempo de coagulação e quando incubado com o soro antilonômico, essa atividade foi totalmente inibida. Por outro lado, quando a mesma quantidade de extrato de espículas foi incubada com soro antibotrópico, não houve diferença em relação à amostra sem soro, demonstrando que o soro antibotrópico não é capaz de neutralizar a atividade pró-coagulante do extrato de espículas.

Verificou-se que, ao incubarmos extrato de espículas com soro antilonômico, ocorreu a neutralização desta atividade, apresentando um perfil semelhante ao controle. Ao contrário, quando incubamos a mesma concentração de extrato de espículas com soro antibotrópico não houve diferença em relação à amostra sem soro, demonstrando que o soro antibotrópico não neutraliza a atividade pró-coagulante do extrato de espículas.

Na Figura 22, a ação dos soros antibotrópico e antilonômico frente à atividade pró-coagulante do veneno bruto de *B. jararaca* foi mostrada.. O veneno bruto de *B. jararaca* apresentou intensa atividade pró-coagulante quando comparado ao controle. Quando este veneno foi incubado com o soro

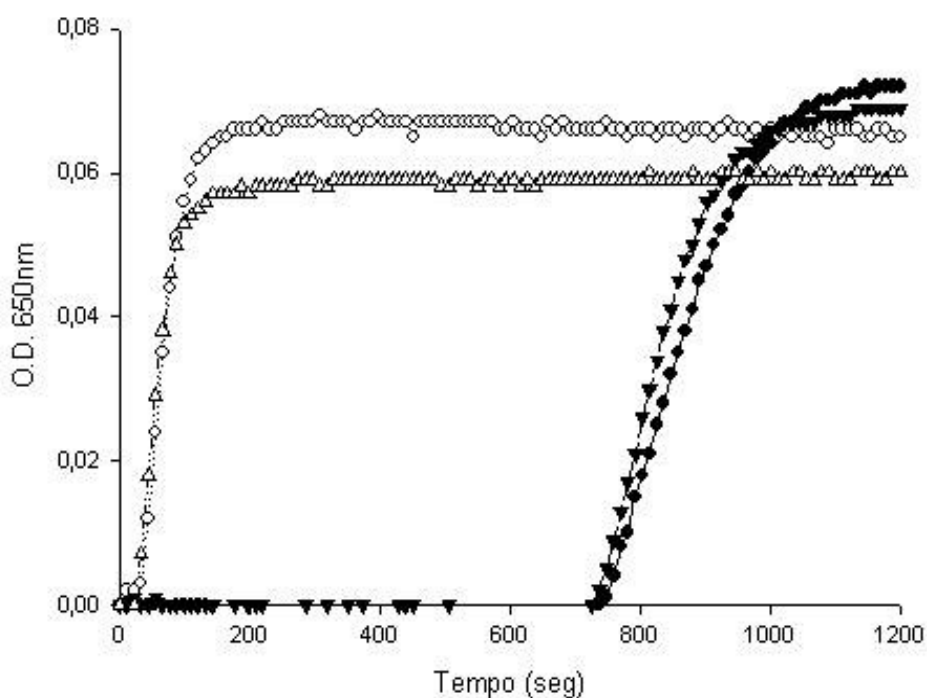


Figura 22. Efeito dos soros antilonômico e antibotrópico sobre a atividade pró-coagulante do veneno bruto de *B. jararaca* no ensaio de tempo de recalcificação. Tampão HEPES 20 mM incubado com plasma (●); com 15 µg veneno de *B. jararaca* (○), com 15 µg veneno de *B. jararaca* + 50 µL de soro antilonômico(Δ) e com veneno de *B. jararaca* + 50 µL de soro antilobotrópico (▼)A reação foi iniciada com adição de CaCl₂ 150 mM. A Absorvância (D.O.) foi medida a 650 nm.

antibotrópico ocorreu a neutralização desta atividade, retornando aos níveis do controle. Entretanto, quando incubado com soro antilonômico, não houve alteração na atividade pró-coagulante do veneno de *B. jararaca*.

4.5. Efeito hemorrágico pós-incisão da cauda induzido por diferentes concentrações do extrato de espículas

O efeito hemorrágico induzido por 50 µg/kg, 100 µg/kg e 200 µg/kg de extrato de espículas foi monitorado pela perda sanguínea através da incisão da extremidade da cauda 2 h após a administração de veneno.

O efeito hemorrágico apresentou um perfil dose-dependente nas concentrações utilizadas. Como a dose de 200 µg/kg, apresentou evidente, esta dose foi utilizada nos ensaios seguintes.

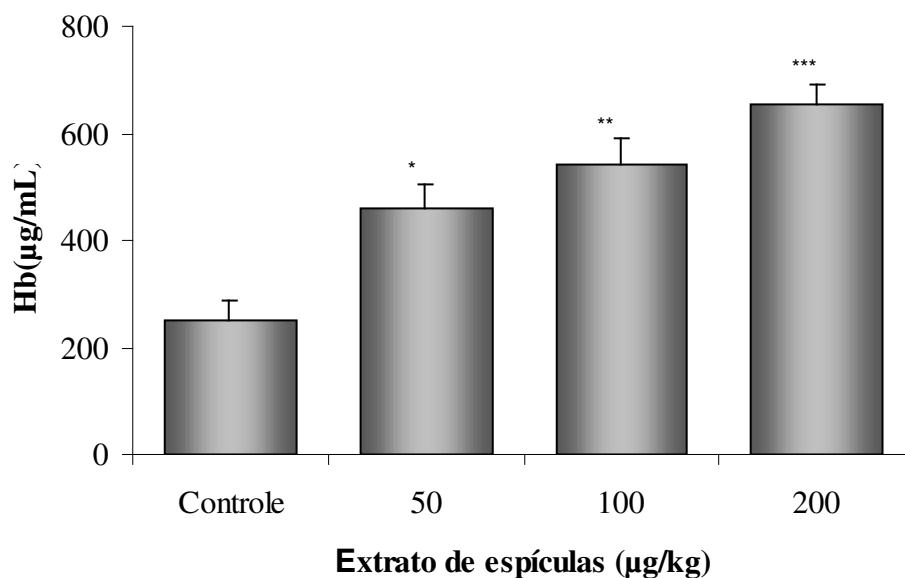


Figura 23. Efeito hemorrágico pós-incisão da cauda induzido pelo extrato de espículas. Extrato de espículas foi administrado nas doses de 50, 100 ou 200 µg/kg, via subcutânea, duas horas antes da incisão (3 mm) da cauda. O grupo controle recebeu PBS. A cauda foi cuidadosamente imersa em 40 mL de água destilada em temperatura ambiente. A perda sanguínea foi monitorada até 60 min (pós-incisão) e avaliada pela absorvância a 540 nm. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$: ANOVA, Bonferroni (diferença em relação ao controle)

4.6. Monitoramento do efeito hemorrágico pós-incisão da cauda

Após 12 h da administração do veneno de *L. obliqua*, a perda sangüínea ainda foi intensa, não apresentando diferença significativa em relação ao grupo de corte após 2 h. Entretanto, o grupo que teve a cauda incisada após 24 h não demonstrou perda sangüínea importante, apresentando um perfil semelhante ao grupo controle (PBS).

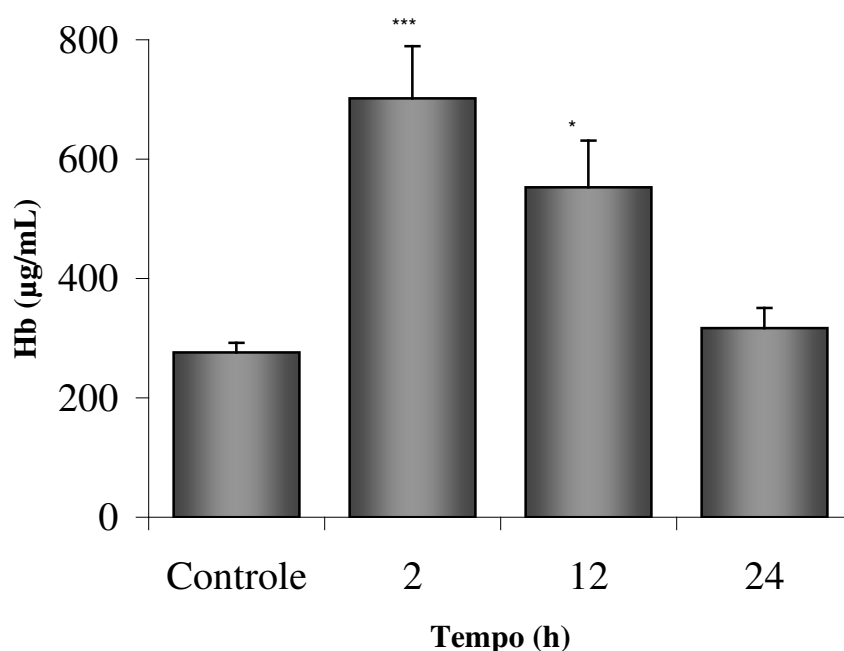


Figura 24. Monitoramento do efeito hemorrágico pós-incisão da cauda induzido pelo extrato de espículas. Extrato de espículas (200 µg) foi administrado, via subcutânea, nos diferentes grupos e a cauda incisada 2 h, 12 h ou 24 h após a administração do veneno. O grupo controle recebeu PBS. A cauda foi cuidadosamente imersa em 40 mL de água destilada em temperatura ambiente. A perda sangüínea foi monitorada até 60 min (pós-incisão) e avaliada pela absorvância a 540nm. * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$: ANOVA, Bonferroni (diferença em relação ao controle).

4.7. Monitoramento do efeito hemorrágico pós-incisão da cauda induzido pelo extrato de espículas de *L. obliqua* e do veneno de *B. jararaca*

Como mostra a Figura 25, o perfil de perda sangüínea apresentado pelos animais que receberam o extrato de espículas de *L. obliqua* e os que receberam o veneno de *B. jararaca* foi bastante semelhante, não havendo diferença significativa entre eles. Houve diferença significativa (iniciada após 60 min) entre os grupos que receberam os venenos e o grupo controle.

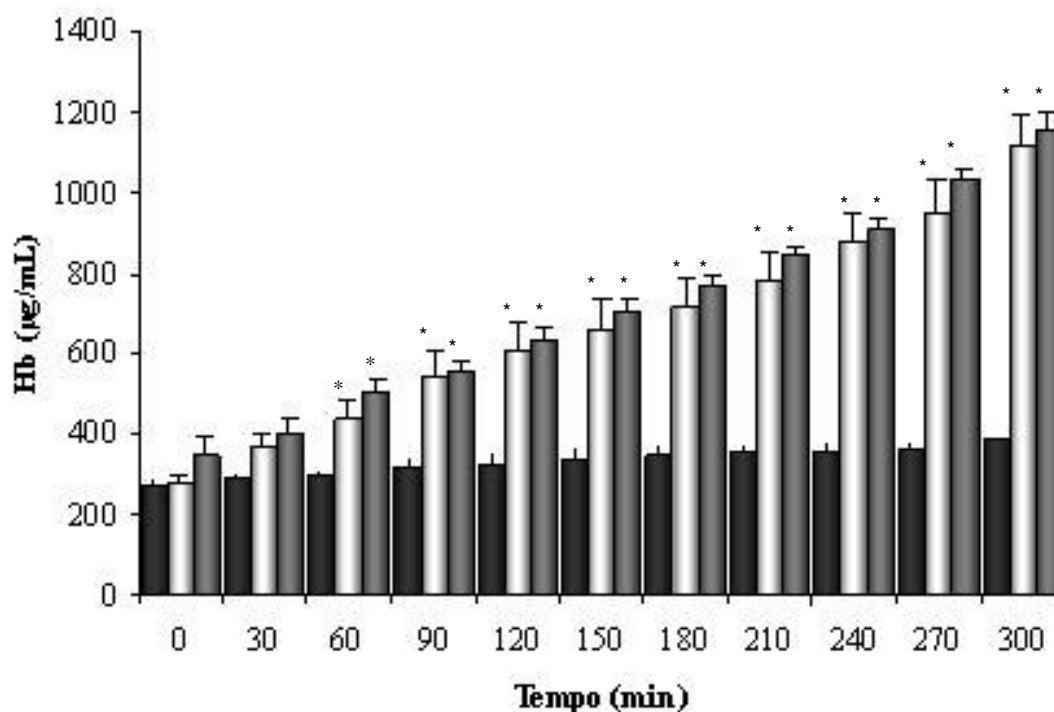


Figura 25. Monitoramento do efeito hemorrágico pós-incisão da cauda induzido pelo extrato de espículas de *L. obliqua* e do veneno de *B. jararaca*. Os animais foram anestesiados, a cauda foi incisada e cuidadosamente imersa em 40 mL de água destilada. Após 30 min foram administrados os venenos de *L. obliqua* e *B. jararaca*. No grupo controle foi aplicado tampão PBS. A perda sangüínea foi monitorada em intervalos de 30 min até 5 h após o corte da cauda e avaliada pela absorvância a 540 nm. ■ Controle, ■ *B. jararaca*, ■ *L. obliqua*. * $P < 0,05$: ANOVA, análise de medidas repetidas, Bonferroni (diferença em relação ao controle).

4.8. Ação do soro antilonômico sobre o efeito hemorrágico pós-incisão da cauda

A Figura 26 mostra o efeito do soro antilonômico na neutralização do efeito hemorrágico induzido pelo extrato de espículas. O soro antilonômico apresentou um perfil dose-dependente na redução do efeito hemorrágico.

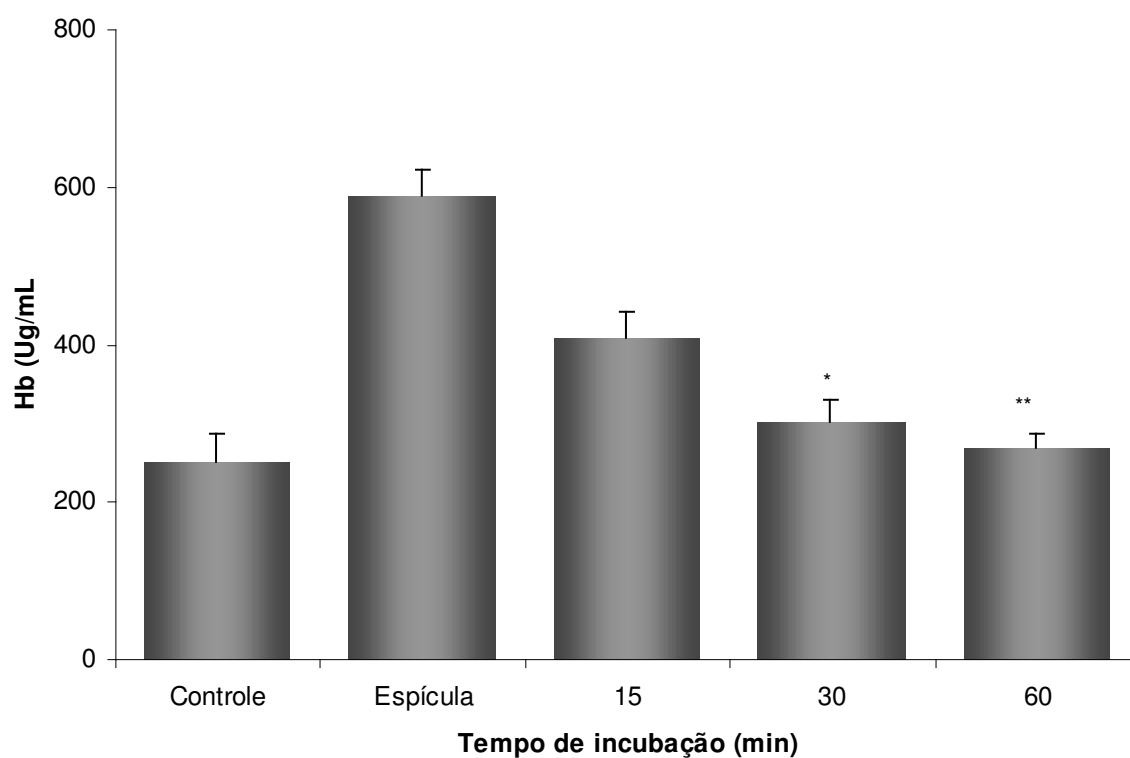


Figura 26. Efeito do Soro antilonômico na neutralização do efeito hemorrágico induzido pelo extrato de espículas. Extrato de espículas (200 µg) foi incubado com 80µL de soro antilonômico durante 15, 30 ou 60 min. Em seguida, esta mistura (veneno + soro) foi aplicada via subcutânea. O grupo controle recebeu PBS. Após 2h a cauda foi incisada. A perda sanguínea foi monitorada até 60min (pós-incisão) e avaliada pela absorbância a 540 nm. * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$: ANOVA, Bonferroni (diferença em relação à espícula).

4.9. Ação do soro antilonômico e do EDTA sobre o efeito hemorrágico pós-incisão da cauda

Estudos anteriores realizados com extrato de espículas apontaram o EDTA como um potente inibidor (95%) da atividade amidolítica sobre o substrato cromogênico para Fator Xa, S 2222 (PINTO *et al.*, 2006). Com base nestes dados, estudamos a ação do EDTA como possível inibidor dos efeitos hemorrágicos em modelo animal. Como pode ser observado na Figura 27, o extrato de espículas incubado tanto com soro antilonômico quanto com o EDTA apresentou redução significativa da perda sangüínea quando comparado ao grupo que somente recebeu extrato de espículas.

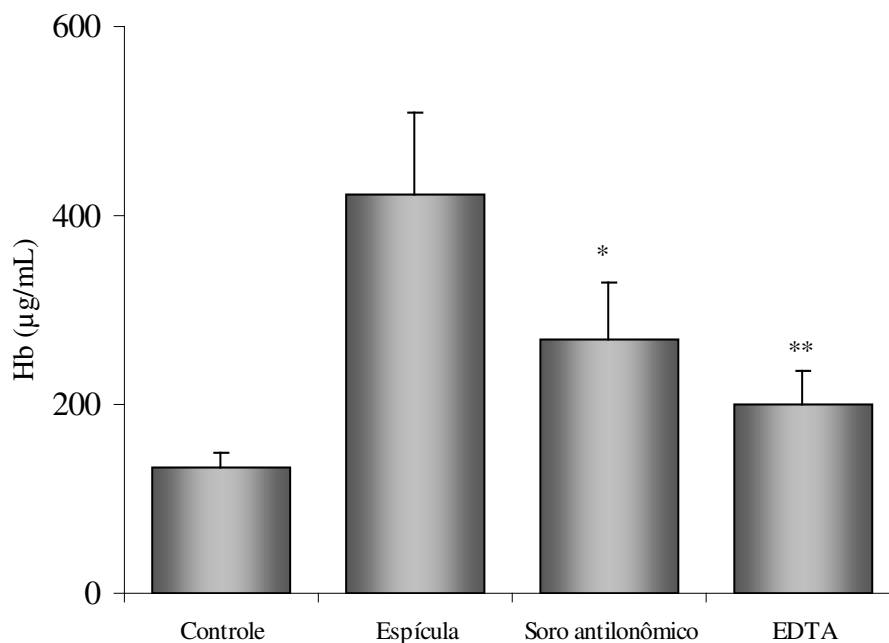


Figura 27. Efeito do soro antilonômico e do EDTA, pré-incubados com extrato de espículas, na neutralização do efeito hemorrágico. Extrato de espículas (200 µg) foi pré-incubado com 80 µL de soro antilonômico durante 60 min ou com EDTA (10 mM) por 15 min. Em seguida, esta mistura foi aplicada, via subcutânea. O grupo controle recebeu PBS. Após 2 h a cauda foi incisada. A perda sangüínea foi monitorada até 60 min (pós-incisão) e avaliada pela absorbância a 540nm. * $P < 0,05$ e *** $P < 0,001$: ANOVA, Bonferroni (diferença em relação à espícula).

Como o efeito hemorrágico induzido pelo extrato de espículas foi reduzido com a incubação prévia do soro antilonômico e do EDTA, a ação destes inibidores foi testada quando administrados após o veneno. Quando administrados 30min após o envenenamento, o soro antilonômico e o EDTA apresentaram evidente redução do , como mostrado na Figura 28.

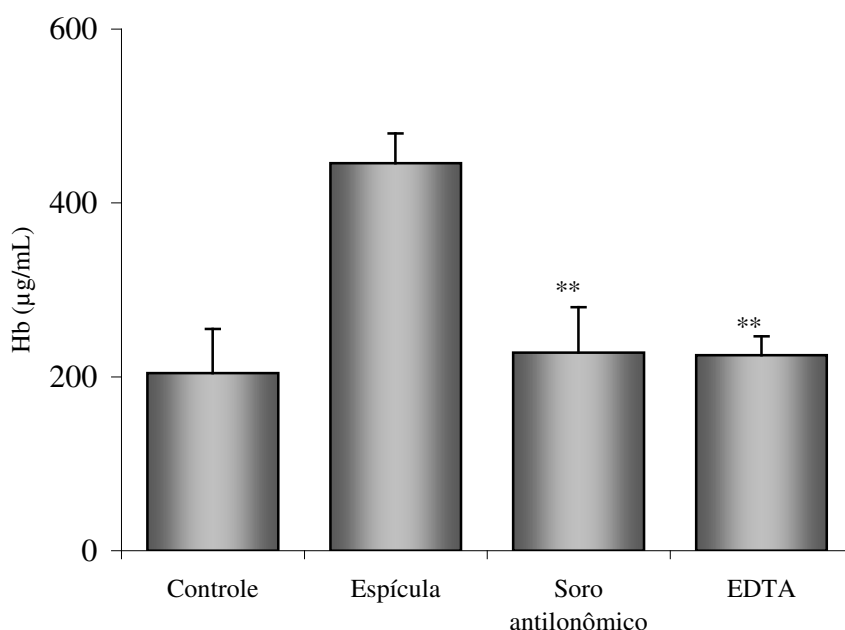


Figura 28. Efeito do soro antilonômico e do EDTA na neutralização do efeito hemorrágico administrados após o veneno. Extrato de espículas (200 µg/kg) foi administrado, via subcutânea. Após 30 min foi aplicado 80 µL de soro antilonômico, via intravenosa, ou EDTA (10 mM), via subcutânea. O grupo controle recebeu PBS. Após 2 h da aplicação dos venenos a cauda foi incisada e a perda sangüínea foi monitorada até 60 min (pós-incisão) e avaliada pela absorbância a 540 nm. ** $P < 0,01$: ANOVA, Bonferroni (diferença em relação à espícula).

4.10. Extravasamento vascular induzido por diferentes concentrações de extrato de espículas

A permeabilidade vascular pode ser mensurada pelo extravasamento de corantes específicos para os tecidos. Os resultados demonstram a permeabilidade vascular induzida pelo extrato de espículas de *L. obliqua*, utilizando o corante Azul de Evans, que possui uma grande afinidade pela albumina plasmática.

A dose de 30 $\mu\text{g/mL}$ de extrato de espículas foi capaz de induzir maior extravasamento vascular quando comparada com as demais doses e o controle (Figura 29).

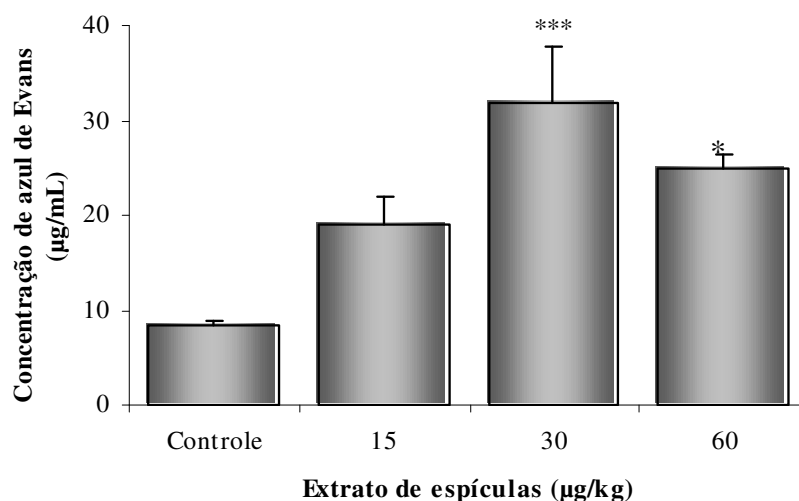


Figura 29. Efeito da concentração de extrato de espículas sobre o extravasamento vascular. Os animais foram anestesiados, o dorso foi tricotomizado e demarcada a área a ser aplicadas as amostras. Azul de Evans foi aplicado, via endovenosa. Em seguida foram administradas doses crescentes (15, 30 e 60 $\mu\text{g/kg}$) de extrato de espículas. PBS foi utilizado como controle. Após 30min, os animais foram sacrificados, os quadrados de pele foram recortados e colocados em solução de formamida por 48 h. Alíquotas foram avaliadas pela absorbância a 600 nm. * $P < 0,05$ e *** $P < 0,001$: ANOVA, Bonferroni (diferença em relação ao controle).

4.11. Monitoramento do extravasamento vascular induzido pelo extrato de espículas de *L. obliqua*

Para verificar se o fenômeno do extravasamento persistia no tempo, foram aplicados 30 µg de extrato de espículas 24 h e 2 h antes da administração do corante de azul de Evans e no tempo 0 (controle positivo) a amostra foi aplicada imediatamente após a administração do corante. Como pode ser observado na Figura 30 o veneno aplicado 2 h antes da administração endovenosa de azul de Evans, ainda causa um efeito de extravasamento vascular relevante. Após 24 h não houve extravasamento vascular significativo, apresentando diferença em relação ao controle positivo.

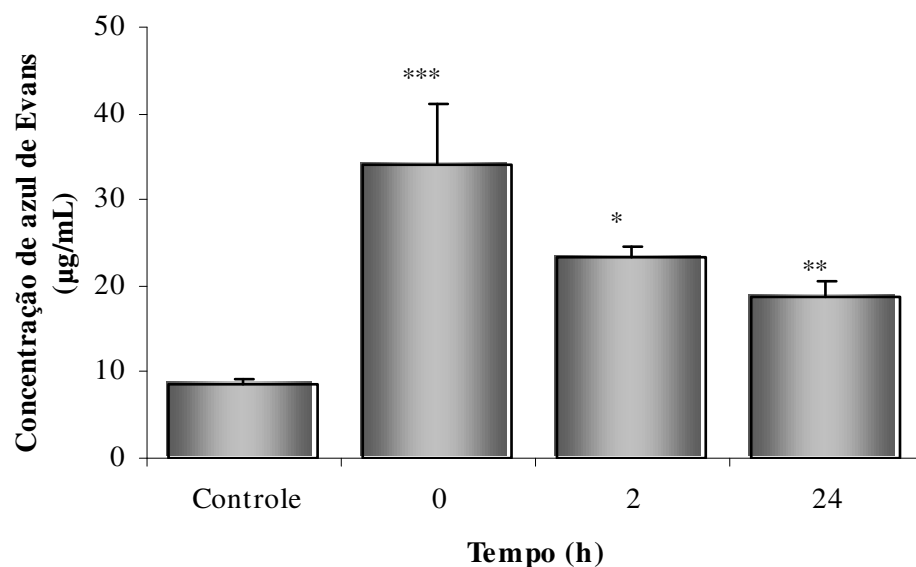


Figura 30. Monitoramento do extravasamento vascular induzido pelo extrato de espículas. Os animais foram anestesiados, o dorso foi tricotomizado e demarcada a área a ser aplicadas as amostras. Foi aplicado extrato de espícula (30 µg) em um quadrado. Após 22 h foi aplicado extrato de espícula (30 µg) em outro quadrado. Após 2 h foi administrado Azul de Evans, via endovenosa, e em seguida foi aplicado 30 µg de extrato de espículas em outro quadrado. PBS foi utilizado como controle. Após 30 min, os animais foram sacrificados, os quadrados de pele foram recortados e colocados em solução de formamida por 48h. Alíquotas foram avaliadas pela absorbância a 600 nm. *** $P < 0,001$ e * $P < 0,05$ (diferença em relação ao controle) ** $P < 0,01$ (diferença em relação ao controle positivo) :ANOVA. Bonferroni.

4.12. Extravasamento vascular e a ação de inibidores

Para verificar se o extravasamento local, induzido pelo extrato de espículas, poderia ser reduzido pela ação de algum inibidor da hemostasia foram utilizadas “pomadas” com EDTA 40 mM (inibidor de metaloproteinases), benzamidina 40 mM (inibidor de serino proteases), mistura de EDTA 40mM e benzamidina 40 mM, Heparina 20 UI (inibidor de trombina, Fator X, IX) e a pomada comercial Hirudoid® (polissulfato de mucopolissacáridos - organo-heparinóide) (Figura 31).

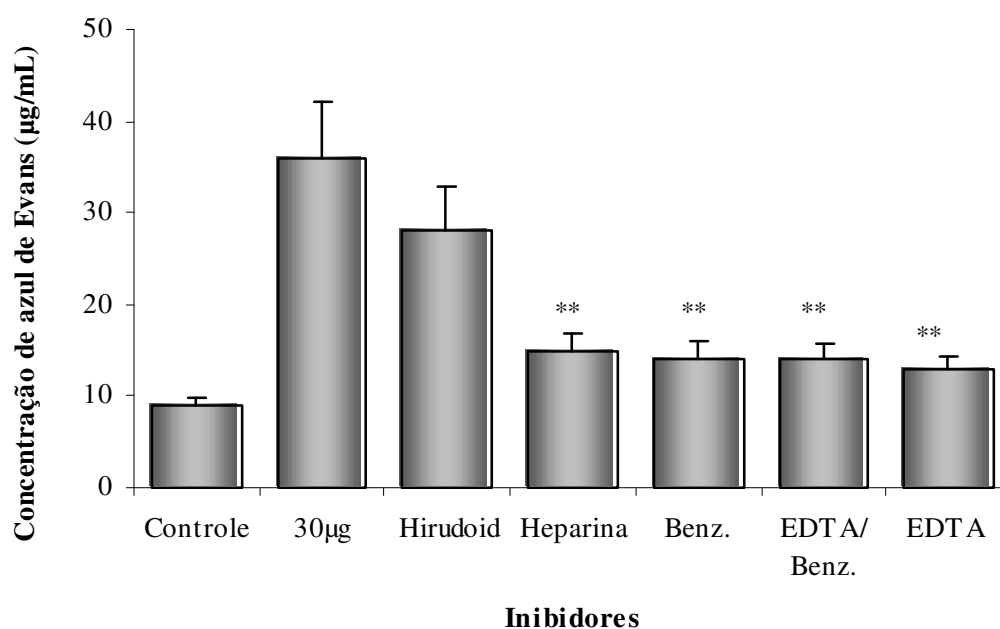


Figura 31. Efeito de inibidores da hemostasia sobre o extravasamento vascular. Os animais foram anestesiados, o dorso foi depilado e marcado. Azul de Evans foi aplicado, via endovenosa, e em seguida foi aplicada 30 µg de extrato de espícula (controle positivo), 30 µg logo em cima pomada de EDTA, Benzmidina, EDTA + Benzamidina, Heparina e a pomada comercial Hirudoid®, no dorso do animal. PBS foi utilizado como controle negativo. Após 30 min, os animais foram sacrificados, os quadrados de pele foram recortados e colocados em solução de formamida por 48 h. Alíquotas foram avaliadas pela absorbância a 600 nm. ** $P < 0,001$: ANOVA, Bonferroni (diferença em relação à espícula).

As pomadas de Heparina, Benzamidina, EDTA, EDTA/Benzamidina, quando aplicadas logo após a administração do veneno, apresentaram redução do extravasamento vascular quando comparadas ao veneno. A pomada comercial Hirudoid® não apresentou redução significativa.

4.13. Migração celular induzida por diferentes concentrações de extrato de espículas

Para verificar se o extrato de espículas seria capaz de induzir migração celular foi utilizado o modelo de “air pouch”. O extrato de espículas foi capaz de induzir uma migração de leucócitos para a bolha de ar subcutâneo (Figura 32) de maneira dose-dependente.

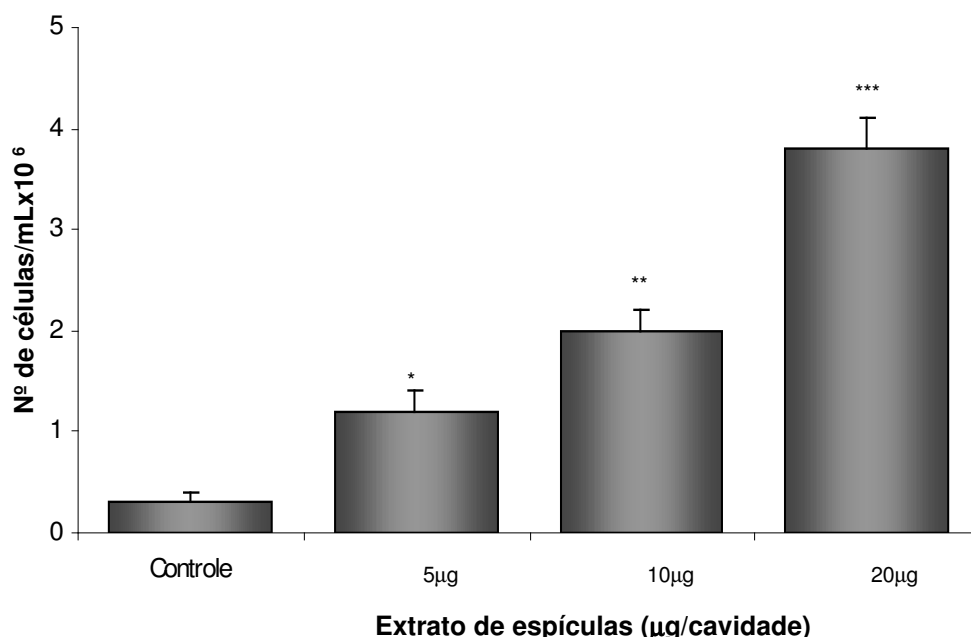


Figura 32. Efeito de diferentes concentrações do extrato de espículas sobre a migração celular. Após a formação da bolha de ar subcutânea, os animais foram sedados com éter etílico e em seguida, aplicados 5 µg, 10 µg ou 20 µg de extrato de espículas na bolha de ar. Após 8h os animais foram sacrificados. Foi aplicado 3 mL de tampão PBS estéril na bolha, massageado com cuidado e coletado. Este líquido foi diluído 20 x em solução de Turk e a contagem total foi realizada na câmara de Neubauer. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$: ANOVA, Bonferroni (diferença em relação ao controle).

4.14. Migração celular em relação ao tempo

Foi utilizado o modelo de “air pouch” para avaliar a migração celular induzida pelo extrato de espículas em função do tempo. Foram aplicados 20 µg de extrato de espículas 24 h, 12 h, 8 h, 6 h, 4 h e 2 h antes dos animais serem sacrificados.

Como se observa na Figura 33, após 2 horas da administração do extrato de espículas há um aumento de migração celular para a bolha de ar subcutânea de maneira significativa e tempo-dependente.

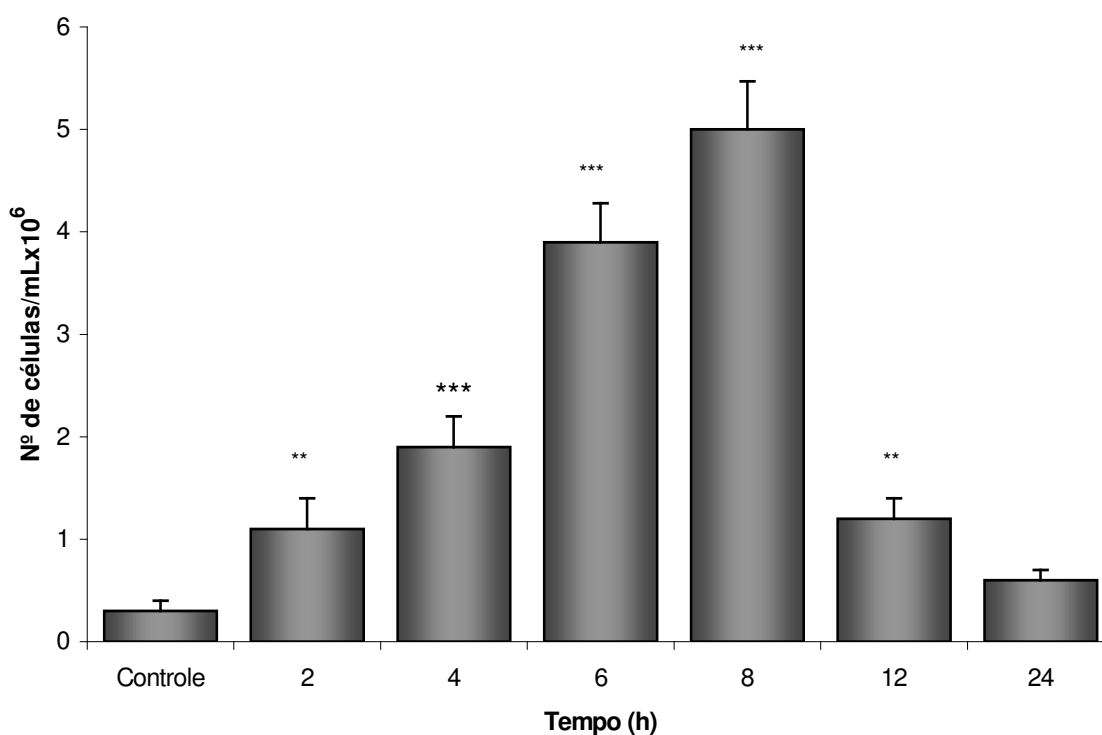


Figura 33. Variação da migração celular induzida pelo extrato de espícula em função do tempo. Após a formação da bolha de ar subcutânea, os animais foram sedados com éter etílico e em seguida, aplicados 20 µg de extrato de espículas na bolha de ar, 24 h, 12 h, 8 h, 6 h, 4 h, 2 h antes dos animais serem sacrificados. Foi aplicado 3mL de tampão PBS estéril na bolha, massageado com cuidado e coletado. Este líquido foi diluído 20 x em solução de Turk e a contagem total foi realizada na câmara de Neubauer. ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$: ANOVA, Bonferroni (diferença em relação ao controle).

4.15. Inibição da migração celular

Para verificar se o fenômeno de migração celular no modelo de “air pouch” seria diminuído pela ação de algum inibidor da hemostasia, foram administrados EDTA (1 mM), Benzamidina (20 mM) ou Heparina (2 UI) num volume total de 100 μ L, diluídos em tampão PBS estéril, em cada bolha de ar. Após 10min, foram aplicados 20 μ g de extrato de espículas.

Como pode ser observado na Figura 34, a migração celular para dentro da bolha de ar subcutânea induzida por 20 μ g de extrato de espículas foi inibida pelo EDTA, benzamidina e a heparina. A migração celular foi melhor inibida pela heparina, benzamidina e EDTA respectivamente.

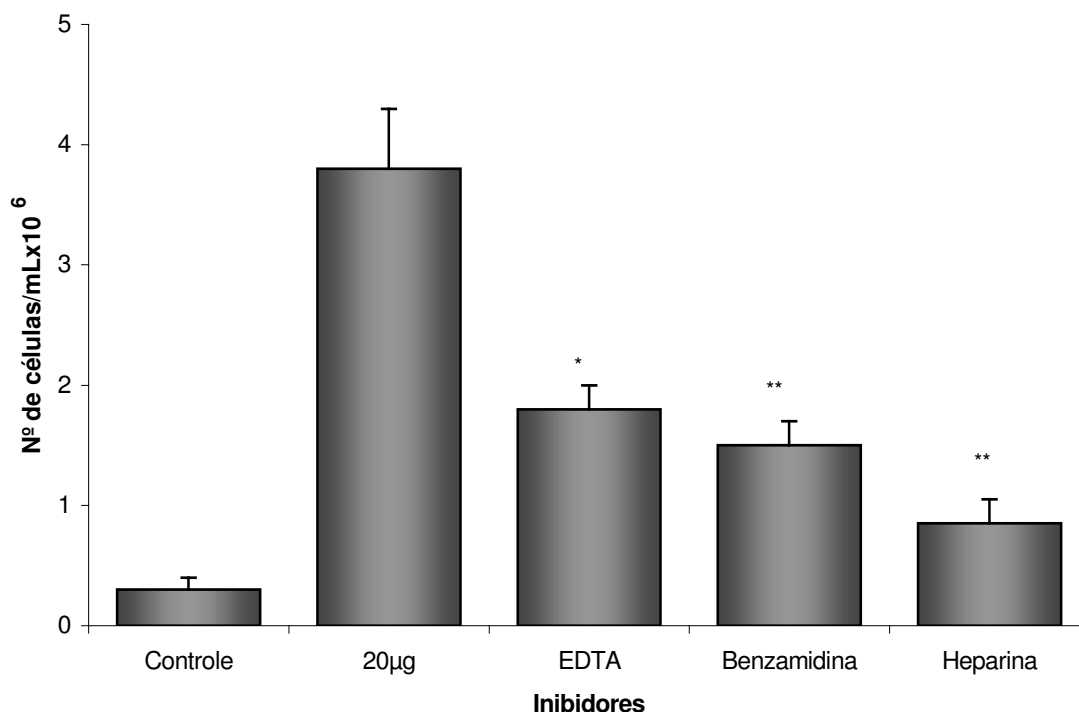


Figura 34. Inibição da migração celular. Após a formação da bolha de ar subcutânea, os animais foram sedados com éter etílico e em seguida, aplicados 1 mM de EDTA ou 20 mM de Benzamidina ou 2 UI de Heparina num volume total de 100 μ L, na bolha de ar. Após 10min, foram administrado 20 μ g de extrato de espículas. Após 8 h os animais foram sacrificados. Foi aplicado 3 mL de tampão PBS estéril na bolha, massageado com cuidado e coletado. Este líquido foi diluído 20 x em solução de Turk e a contagem total foi realizada na câmara de Neubauer. * $P < 0,05$ e *** $P < 0,001$: ANOVA, Bonferroni (diferença em relação a espícula).

5. DISCUSSÃO

O quadro hemorrágico induzido pelo extrato de espículas de *L. obliqua* bem como a ocorrência de extravasamento vascular e migração celular foram monitorados neste trabalho. Para avaliação destes fenômenos, característicos de manifestações inflamatórias, foram utilizados três modelos experimentais: efeito hemorrágico pós-incisão da cauda, extravasamento vascular e migração celular através da técnica de “air pouch”.

Enquanto as pesquisas com a lagarta *L. achelous* eram realizadas a partir das cerdas, da hemolinfa e do animal inteiro (AROCHA-PIÑANGO & LAYRISSE, 1969; AROCHA-PIÑANGO *et al*, 1992; AROCHA-PIÑANGO *et al*, 2000; AROCHA-PIÑANGO & GUERRERO, 2001), com a *L. obliqua* apenas as cerdas eram utilizadas (KELEN *et al.*, 1995; DONATO *et al.*, 1998; REIS *et al.*, 1999, REIS *et al.*, 2001). No laboratório de Bioquímica Farmacológica do Centro de Biotecnologia da UFRGS, foram realizados experimentos utilizando quatro materiais: extrato de espículas, tegumento, hemolinfa e criossecreção. Os resultados demonstram que os extratos de espículas e tegumento apresentam grande semelhança nos seus perfis eletroforéticos, provavelmente pelo fato do epitélio da cerda da lagarta ser contínuo ao epitélio da base do tegumento. Além disso, a inexistência de glândulas produtoras de veneno torna o epitélio tegumentar o provável local de produção e secreção do veneno (VEIGA, 2001; VEIGA *et al.*, 2001).

O estudo bioquímico dos venenos de *L. achelous* e de *L. obliqua* foi bastante intensificado nos últimos anos. A purificação e caracterização de algumas enzimas têm auxiliado na compreensão do quadro clínico provocado por estes

insetos. Da lagarta *L. achelous* já foram caracterizadas a Lonomin II (atividade semelhante à da plasmina); Lonomin III (ativador de protrombina); Lonomin IV (atividade semelhante ao Fator Xa). Lonomin V (atividade proteolítica sobre o FXIII e atividade ativadora de plasminogênio); Lonomin VI (ativador de FV); Lonomin VI (atividade inibitória sobre o FV) e a Lonomin VII (atividade semelhante à da calicreína) (; AROCHA-PIÑANGO *et al*, 2000).

Duas atividades pró-coagulantes presentes no extrato de espículas de *L. obliqua* já foram caracterizadas: um ativador de fator X e um ativador de protrombina cálcio-dependente (DONATO *et al.*, 1998; REIS *et al.*, 1999; REIS *et al.*, 2001). O ativador de Fator X, chamado de Losac, é uma proteína de 43kDa que ativa Fator X de maneira dose dependente, não apresentando ação sobre outros fatores da coagulação como a protrombina, nem atividade amidolítica sobre substratos cromogênicos (FLORES *et al.*, 2004). A presença de uma potente atividade ativadora de protrombina foi identificada também por Veiga *et al.*, 2003. Porém esta atividade não mostrou ser dependente do íon cálcio.

Pinto *et al.* (2006) referem que, além do extrato de espículas, tegumento, hemolinfa e a crio-secreção também apresentam atividade pró-coagulante. Entretanto, o extrato de espículas apresenta atividade pró-coagulante mais intensa: apenas 0,6 µg deste material é capaz de reduzir pela metade o tempo de coagulação em relação ao controle.

No presente trabalho, a atividade pró-coagulante do extrato de espículas foi demonstrada através do ensaio de tempo de recalcificação. Neste, a fase log da coagulação é iniciada quase que imediatamente à adição do cálcio, suprimindo a

fase de ativação dos fatores de coagulação (fase lag), evidenciando esta potente atividade.

A atividade fibrinogenolítica também já foi testada nos extratos e secreções de *L. obliqua*. Extratos de espículas, tegumento, hemolinfa e criossecreção apresentam atividade fibrinogenolítica. Entretanto, a criossecreção e a hemolinfa se destacam: apenas 0,25 µg de criossecreção e 1 µg de hemolinfa incubados por 15 min são suficientes para degradar completamente as cadeias de fibrinogênio (PINTO *et al.*, 2006). O extrato de espículas, embora apresente uma atividade fibrinogenolítica reduzida quando comparada com a criossecreção, também possui ação sobre fibrinogênio de forma dose-dependente (VEIGA *et al.*, 2003). A atividade fibrinogenolítica foi identificada, também, na lagarta *L. achelous* (AROCHA-PINÃNGO *et al.*, 2000) e seria em consequência de princípios ativos agindo diretamente sobre o fibrinogênio, a fibrina e a degradação de fator XIII (AROCHA-PINÃNGO & GUERRERO, 2001).

No ensaio de fibrinocoagulação realizado neste estudo, os resultados indicam uma intensa ação fibrinogenolítica presente na criossecreção. Esta atividade é responsável pela total degradação do fibrinogênio, impedindo que ele sirva de substrato para a trombina formar o coágulo de fibrina.

Na criossecreção, foi identificada e caracterizada uma potente enzima com atividades fibrinolítica e fibrinogenolítica chamada de Lonofibrase. Esta enzima, de aproximadamente 35 kDa, degrada o fibrinogênio de maneira dose-dependente, agindo preferencialmente sobre a cadeia A α , apresentando pouca eficiência sobre a cadeia B β e γ (PINTO, 2002; PINTO *et al.*, 2004).

Segundo Zannin (2002), que estudou as variações nos parâmetros de coagulação de pacientes acidentados por *Lonomia obliqua* em Santa Catarina, do total de 105 pacientes, 91 (87%) apresentavam redução intensa de fibrinogênio. Em 70% dos pacientes os níveis de fibrinogênio foram menores que 0,5 g/L, e em 33 pacientes não foi detectável. Os valores de referência para o fibrinogênio são entre 2-4 g/L. Estes dados evidenciam a importante atividade fibrinogenolítica presente neste envenenamento.

O Instituto Butantan iniciou a produção do soro antilonômico em 1996 (DA SILVA *et al.*, 1996), sendo este produzido exclusivamente das espículas de *L. obliqua*.

No ensaio de western blot realizado neste trabalho, o soro antilonômico foi capaz de reconhecer proteínas em outros materiais da lagarta (tegumento, hemolinfa e crio-secreção) indicando que os princípios ativos, responsáveis pelo quadro clínico resultante deste envenenamento, estão presentes em várias secreções da taturana. Entretanto, quando o extrato de espículas e o veneno de *B. jararaca* foram incubados com soro antilonômico ou soro antibotrópico, destaca-se a inexistência de reação cruzada entre estes venenos e os soros correspondentes. Complementando este resultado, a atividade pró-coagulante do extrato de espículas somente foi neutralizada pelo soro antilonômico, assim como a atividade pró-coagulante do veneno de *B. jararaca* com o soro antibotrópico.

Nos acidentes causados por *L. obliqua*, a gravidade do quadro clínico é classificada em leve, moderada e grave. Nos casos leves, onde o tempo de coagulação permanece normal, não é administrado soro antilonômico. O quadro clínico é considerado moderado quando o tempo de coagulação apresenta-se

alterado (acima de 10 min) e há presença de sangramentos na pele e mucosas, havendo indicação de 5 ampolas. Nos acidentes classificados como graves, além do tempo de coagulação apresentar-se alterado, ocorrem manifestações hemorrágicas em vísceras, sendo indicado o uso de 10 ampolas de soro antilonômico (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001).

O quadro clínico em consequência de um acidente botrópico é classificado de acordo com manifestações locais (dor, edema e equimose), sistêmicas (manifestações hemorrágicas, choque e anúria) e pelas alterações do tempo de coagulação. O tratamento é baseado em uma sintomatologia leve, onde o paciente pode receber de 2 – 4 ampolas de soro antibotrópico, moderada, com indicação de 4 – 8 ampolas, e grave onde há indicação de 12 ampolas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001).

Pacientes que não conseguem relatar o histórico do acidente e apresentam sintomas que se enquadram tanto no acidente lonômico quanto no botrópico, podem receber um tratamento antiveneno equivocado. Algumas vezes é iniciado o tratamento com um tipo de soro (antilonômico ou antibotrópico) e como os sintomas não amenizam a equipe médica, após suplementar a dose de soro indicada, necessita “tentar” a administração de outro tipo de soro, na expectativa que o quadro clínico melhore. Considerando que o soro é composto por proteínas heterólogas e que há o risco eminente de choque anafilático, esta situação causa apreensão pelas equipes diretamente envolvidas no diagnóstico e tratamento destes acidentes.

A redução intensa do fibrinogênio é a alteração mais comum destes dois tipos de envenenamento (ZANNIN *et al.*,2003). De um total de 78 envenenados por

B. jararaca, o fibrinogênio apresentava níveis inferiores a 1,5 g/l em 75,5% dos pacientes e menor que 0,5 g/l em 29,5% deles (KAMIGUTI *et al.*,1986), enquanto do total de 105 pacientes acidentados por *L. obliqua*, o fibrinogênio apresentava níveis inferiores à 1,5 g/l em 84% dos pacientes e inferior a 0,5 g/l em 68% deles (ZANNIN *et al.*,2003).

Em humanos, as alterações na hemostasia induzidas pelo acidente com lagartas de *L. obliqua* têm início precoce (até 6h após o acidente). A principal alteração diagnosticada no momento da admissão hospitalar foi hipofibrinogenemia. A maioria dos pacientes (64%) procurou atendimento médico após 12h do contato com a lagarta, sendo que os valores de fibrinogênio bastante reduzido foram encontrados nestes pacientes (ZANNIN, 2002). Nos resultados de pós-incisão da cauda em modelo animal, verificou-se que após 2h da administração do veneno os animais apresentavam um quadro hemorrágico importante e dose-dependente quando comparado ao controle. Porém, o tempo decorrido após o envenenamento não é o único agravante. O número de lagartas, o instar que ela se encontra, o tipo de acidente (contato superficial com as espículas ou contato com demais secreções), histórico de presença de comorbidades no paciente, entre outros, contribuem para a gravidade do acidente (AROCHA-PIÑANGO, *et al.*, 1992; ZANNIN, *et al.*,2003).

O soro antilonômico, como era esperado, foi capaz de neutralizar o provocado pelo extrato de espículas quando pré-incubado com o veneno, bem como quando aplicado após a administração deste. Embora a soroterapia não seja um procedimento isento de riscos à saúde do acidentado, o soro específico é, ainda, o único tratamento eficaz recomendado pelo Ministério da Saúde para a

maioria dos acidentes causados por animais peçonhentos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001).

Em estudos recentes realizados no Laboratório de Bioquímica Farmacológica, o EDTA apresentou 95% de inibição sobre a atividade amidolítica do extrato de espículas sobre o substrato (S 2222) para fator Xa (PINTO *et.al.*, 2006). Nos resultados apresentados, o EDTA reduziu o , causado pelo extrato de espículas, quando pré-incubado com o extrato de espículas ou ainda quando aplicado 30 min após a administração do veneno. O EDTA também apresentou atividade inibitória nos modelos de extravasamento vascular, quando utilizado sob a forma de pomada (40 mM) ou combinado com a pomada de benzamidina (40 mM). O EDTA também inibiu a migração celular para a bolha de ar subcutânea, no modelo de air pouch. A ação inibitória do EDTA sobre o extrato de espículas poderia sugerir a presença de proteases metal-dependentes o que justificaria a redução do extravasamento vascular e da migração celular. No entanto, nenhuma seqüência de enzimas do tipo metaloproteinase foi encontrada nos estudos de transcriptoma da lagarta *Lonomia obliqua* (VEIGA *et al.*, 2005), o que sugere que o EDTA esteja inibindo co-fatores envolvidos na cascata de coagulação, essenciais para que as enzimas presentes no veneno de *L. obliqua* se manifestem.

A benzamidina, um inibidor específico de serino proteases, foi capaz de inibir o extravasamento vascular na forma de pomada (40 mM) ou ainda combinada com EDTA (40 mM). Também inibiu a migração celular induzida pelo extrato de espículas de maneira significativa.

Em um estudo comparativo entre os extratos e secreções de *L. obliqua* sobre a atividade amidolítica e a conseqüente inibição desta atividade, o inibidor

benzamidina apresentou maior efeito dentre os inibidores testados. Na crio-secreção e hemolinfa, a benzamidina apresentou uma inibição de 74 a 99% sobre os substratos cromogênicos testados, enquanto no extrato de espícula apresentou uma inibição parcial sobre o substrato para Fator Xa (PINTO *et al.*, 2006). A redução do extravasamento vascular e da migração celular por benzamidina comprova o tipo de enzimas que predominam neste extrato, as serino-proteases.

O extravasamento vascular foi estudado através da quantificação do corante azul de Evans. Este corante é muito utilizado em experimentos relativos à inflamação pela sua propriedade de ligar-se à albumina plasmática. O aumento da permeabilidade vascular e conseqüente extravasamento do exsudato (líquido rico em proteínas) é uma das principais características da inflamação aguda (MONTENEGRO & FECCHIO, 1992). O aumento do volume do líquido extravascular é chamado de edema inflamatório (BECKER, 1997). O extrato de espículas induziu extravasamento vascular de maneira significativa e este pode ser detectado até 2h após a administração do veneno.

As manifestações clínicas locais do envenenamento por *Lonomia obliqua* em humanos são caracterizadas por dor em queimação, de início imediato, prurido, hiperemia, bolhas e edema discreto (ZANNIN, 2002). Em modelos animais, o extrato de espículas, também é capaz de induzir a uma resposta nociceptiva, dose-dependente e de duração de aproximadamente 30 minutos (DE CASTROS BASTOS *et al.*, 2004). Mediadores inflamatórios como as prostaglandinas, aminas simpatomiméticas e histamina, além da ação direta de nociceptores parecem estar envolvidos com esta resposta (DE CASTROS BASTOS *et al.*, 2004). O extrato de

espículas (35 µg) induziu edema em pata de camundongo a partir de 30 min da aplicação do veneno (BOHRER *et al.*, 2007) e teve duração de até 6 h (DE CASTROS BASTOS *et al.*, 2004). Após 24 h não havia mais edema. A aplicação de aprotinina (inibidor de caliceína plasmática e fator XIIa) e HOE 140, 30 min antes do veneno, reduziu em 50% o volume do edema em pata de camundongo (BOHRER *et al.*, 2007).

Em seguida ao extravasamento vascular, os leucócitos migram no tecido conjuntivo em direção ao local da lesão tecidual, desta forma a presença de leucócitos é uma das evidências mais importantes da reação inflamatória.

A técnica de “air pouch” tem sido utilizada como modelo experimental para o estudo de diversos trabalhos sobre resposta inflamatória aguda (KOWANKO *et al.*, 1986). Embora existam outros modelos experimentais para estudar a inflamatória aguda, como a pleurisia e peritonite, a bolha de ar subcutânea apresenta a vantagem de ser fácil a aplicação e análise de fluido (SEDFEWICK *et al.*, 1985).

Os resultados obtidos demonstram que o extrato de espículas é capaz de induzir uma migração de leucócitos para a bolha de ar subcutâneo de maneira dose-dependente.

Estudos de migração celular, utilizando linhagens geneticamente selecionadas a partir da mínima ou máxima resposta inflamatória aguda, foram realizados (RAMOS *et al.*, 2004). Entretanto, nestes estudos, a dose de 40 µg de extrato de espículas induziu migração celular somente em uma linhagem (com máxima resposta inflamatória) na ordem de 10^5 células, enquanto os resultados deste trabalho foram da ordem de 10^6 células. Na maioria das formas de inflamação

aguda, os neutrófilos predominam no infiltrado inflamatório durante as primeiras 6 h, permanecendo até 24 h, entretanto Ramos e colaboradores (2004) analisaram a resposta à inflamação aguda no intervalo de tempo de 24 h após a administração do extrato de espículas. Pelos resultados do presente trabalho, após 24 h não ocorreu mais migração, sendo que o pico desta foi entre 6 h e 8 h.

O tipo de leucócito presente em uma reação inflamatória varia em número com a idade da lesão e com a natureza do estímulo. Assim, na maioria dos tipos de inflamação aguda, predominam os neutrófilos nas primeiras 6 a 24 horas, sendo substituídos pelos linfócitos, e células derivadas de monócitos (macrófagos) em 24 a 48 horas.

Estudos demonstram que a heparina também apresenta atividade anti-inflamatória, inibindo eventos importantes como a formação de edema e migração de neutrófilos (TYRREL *et al.*, 1995; SALIBA *et al.*, 2001; ELSAYED & BECKER, 2003).

Neste trabalho, a heparina reduziu o extravasamento vascular induzido pelo extrato de espículas, assim como a migração celular para a bolha de ar subcutânea. A heparina é amplamente utilizada no tratamento de trombozes arteriais e venosas. Apresenta atividade inibitória, principalmente em relação à trombina. A heparina possui a propriedade de ligar-se a antitrombina e potencializar a ação desta. A ligação antitrombina/heparina induz uma mudança conformacional causando a inativação de vários fatores ativados da coagulação, como os fatores IXa, Xa, XIa, XIIa e IIa. Pela inibição da trombina não somente a formação do coágulo é impedida, mas também a ativação dos fatores V e VIII, que são induzidos

pela trombina. A ação da heparina inibindo a amplificação da cascata pode ter maior impacto do que a inibição direta da trombina (OFOSU *et al.*,1987).

A ação inibitória da heparina nos dois modelos experimentais apresentados sugere que esta esteja inibindo fatores de coagulação que são ativados pelo veneno.

6. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados, foi possível concluir que o soro antilonômico reconheceu proteínas em todos extratos e secreções da lagarta *L. obliqua*, bem como foi capaz de neutralizar as atividades pró-coagulante e fibrinogenolítica, presentes nos extratos e secreções da lagarta.

Não houve ocorrência de reação cruzada entre os venenos e os respectivos soros.

O efeito hemorrágico pós-incisão da cauda, apresentou-se dose dependente, com duração de até 12h. O soro antilonômico e o EDTA, pré-incubados com extrato de espículas ou administrados diretamente nos animais foram capazes de reduzir o sangramento.

O extrato de espículas foi capaz de induzir um extravasamento vascular significativo, mantendo seu efeito até duas horas da administração do veneno. Os inibidores da hemostasia Heparina, Benzamidina e EDTA foram capazes de reduzir o extravasamento vascular induzido pelo extrato de espículas. A pomada Hirudoid® não apresentou redução do extravasamento de maneira significativa. A migração celular induzida pelo extrato de espículas mostrou-se dose dependente, e tempo-relacionada, atingindo platô entre 6h e 8h. EDTA, Benzamidina e Heparina foram capazes de diminuir, de maneira significativa, o processo de migração celular para a bolha de ar subcutâneo.

Neste trabalho, foram estudados os efeitos hemorrágico e inflamatório induzido pelo extrato de espículas de *Lonomia obliqua*, em modelos animais. Este envenenamento caracterizado por um efeito paradoxal, com atividades pró e anti-

coagulantes ainda é considerado recente, com os primeiros registros de acidentes somente no final da década de 80. Embora a caracterização bioquímica, os experimentos em modelos animais e o estudo do transcriptoma da lagarta tenham sido essenciais para a compreensão do quadro clínico decorrente deste acidente, há muito ainda a ser estudado. *L. obliqua*, assim como outros animais peçonhentos e/ou venenosos da fauna brasileira, representam importante fonte de recursos para a pesquisa, principalmente na área da saúde, como o desenvolvimento de novos medicamentos e de soros antivenenos mais específicos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABELLA, H. B.; TORRES, J.B.; MARQUES, M.G.B.; DUARTE, A.C.; BARROS, E. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por *Lonomia*. Porto Alegre: CIT/RS, 1998.

ABELLA, H. B.; MARQUES, M.G.B.; SILVA, K. R. L. M.; ROSSONI, M. G.; TORRES, J.B. Acidentes com lagartas do gênero *Lonomia* registrados no Centro de Informação Toxicológica do Rio Grande do Sul no período 1997 a 2005. In: RIO GRANDE DO SUL. Secretaria da Saúde. Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde. Centro de Informação Toxicológica. **Toxicovigilância – toxicologia clínica**: dados e indicadores selecionados Rio Grande do Sul, 2005. Porto Alegre: CIT/RS, 2006. p. 29-34.

AROCHA-PIÑANGO, C. L. Fibrinólisis producida por contacto con orugas. Comunicación preliminar. **Acta Científica Venezolana**, 18:136-139, 1967.

AROCHA-PIÑANGO, C. L.; LAYRISSE, M. Fibrinolysis produced by contact with a caterpillar. **The Lancet**, p. 810-812, 1969.

AROCHA-PINANGO, C. L.; DE BOSCH, N.B.; TORRES, A.; GOLDSTEIN, C.; NOUEL, A.; ARGUËLLO, A.; CARVAJAL, Z.; GUERRERO, B.; OJEDA, A.; RODRIGUEZ, A.; RODRIGUEZ, S. Six new cases of a caterpillar-induced bleeding syndrome. **Thrombosis and Haemostasis**, 67:402–407, 1992.

AROCHA-PIÑANGO, C. L.; MARVAL, E. E.; GUERRERO, B. *Lonomia* genus caterpillar toxins: biochemical aspects. **Biochimie**, 82:937-942, 2000.

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

BECKER, P. F. L. Patologia Geral. São Paulo: Sarvier, 1997, p.140-193.

BOHRER, C.; RECK, J.J.; FERNANDES, D.; SORDI, R.; GUIMARÃES, J.A.; ASSREUY, J.; TERMIGNONI, C. Kallikrein–kinin system activation by *Lonomia obliqua* caterpillar bristles: Involvement in edema and hypotension responses to envenomation. **Toxicon**, 49:663-669, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**: acidentes por lepidópteros. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2001.

CAMBORGI, G.P.; METCALF, E.F.; BARROS, E.J. Acute renal failure provoked by toxin from caterpillars of the species *Lonomia obliqua*. **Toxicon**, 47(1)68-74, 2006.

CHOIR, Goda et al. The relationship between inflammation and the coagulation system. **Swiss Medical Weekly**, Switzerland, v. 136, p. 139-144, 2006.

COBEA – COLÉGIO BRASILEIRO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. **Manual para técnicos em bioterismo**. 2 ed. São Paulo: H.A Rothschild, 1996. 259p.

CONTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L. **Robbins: patologia estrutural e funcional**. 6 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2000.

DAHLBÄCK, B. Blood coagulation. **The Lancet**, 355:1627-1632, 2000.

DA SILVA, W.D; CAMPOS, A.C.M.R.; GONCALVES, L.R.C.; SOUZA-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**, 34:1045–1049, 1996.

D'ANTÔNIO, A. M. **Biologia, nutrição quantitativa e danos de *Lonomia circumstans* Walker, 1855 (Lepidoptera, Attacidae) em cafeeiro**. Dissertação de mestrado. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, Universidade de São Paulo, 69p. 1983.

DE CASTRO BASTOS, L.; VEIGA, A.B.G.; GUIMARÃES, J.A.; TONUSSI, C.R. Nociceptive and edematogenic responses elicited by a crude bristle extract of *Lonomia obliqua* caterpillars. **Toxicon**, 43(3): 273–278, 2004.

DONATO, J. L.; MORENO, R. A.; HYSLOP, S.; DUARTE, A.; ANTUNES, E.; L.E.; BONNIEC, B. F., RENDU, F.; DE NUCCI, G. *Lonomia obliqua* caterpillar spicules trigger human blood coagulation via activation of factor X and prothrombin. **Thrombosis and Haemostasis**, 79:539–542, 1998.

DUARTE, A. C. CRUSIUS, P.S., PIRES, C.A.L., SCHILLING, M.A., FAN, H.W. Intercerebral haemorrhage after contact with *Lonomia caterpillars*. **The Lancet**, 348, p. 1033, 12 Oct. 1996.

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. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, 12 (4), 184–186, 1990.

ELSAYED, E.; BECKER, R. C. The impact of heparin compounds on cellular inflammatory responses: a construct for future investigation and pharmaceutical development. **Journal of Thrombosis and Thrombolysis**, New York, v. 15, n.1, p. 11-18, 2003.

ESMON, Charles T. Coagulation inhibitors in inflammation. **Biochemical Society Transactions**, London, v. 33, n. 2, p. 401-405, 2005.

ESMON, Charles T The interactions between inflammation and coagulation. **British Journal of Haematology**, Chichester, v. 131, p. 417-430, 2005.

FLORES, M.P.A.; FRITZEN, M.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. Effects of Losac (a factor X activator from *Lonomia obliqua* caterpillar) on HUVECs and sequencing. **J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis**, 10: 532. 2004.

FRAIHA, H.; BALLARINI, A.J.; LEÃO, R.N.Q.; COSTA, J.R.D.; DIAS, L.B. Síndrome hemorrágica por contato com larvas de mariposa (Lepidoptera, saturnidae). Instituto Evandro Chagas. 50 anos de contribuição às ciências biológicas e à medicina tropical, 2:811-20, 1986.

FRITZEN, M.; SCHATNER, M.; RIBEIRO, A.L.Q.; BATISTA, I.F.C.; VENTURA, J.; PREZOTO, B.C.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M.. *Lonomia obliqua* venom action on fibrinolytic system. **Thrombosis Research**, 112, 105–110, 2003.

KAMIGUTI, A. S.; MATSUNAGA, S.; SPIR, M.; SANO-MARTINS, I. S.; NAHAS, L. Alterations of the blood coagulation system after accidental human inoculation by B. Jararaca venom Brazilian. **J Med Biol Res**, 19:199-204, 1986.

KELEN, E. M.; PICARELLI, Z. P.; DUARTE, A. C. Hemorrhagic syndrome induced by contact with caterpillars of the genus *Lonomia* (Saturnidae, hemileucinae). **J Toxinol Toxin Rev**, 14(3):283-308, 1995.

KOWANKO, I. C.; GORDON, T. P.; ROZENBILDS, M. A. M. The subcutaneous air pouch model of synovium and the inflammatory response to heat aggregated gammaglobulin. **Inflammation Research**, 18(3):421-428, 1986.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227, 680–685, 1970.

LORINI, L. M. **Aspectos biológicos e morfológicos de *Lonomia obliqua* WALKER, 1855 (Lepidoptera: Saturniidae), em laboratório.** 1997. 71 p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências, PUCRS, Porto Alegre, 1997.

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

MONTENEGRO, M.R.; FECCHIO, D. Inflamações: conceitos gerais e inflamação aguda. In: MONTENEGRO MR, FRANCO M. Patologia: processos gerais 4° ed. São Paulo: Atheneu; p.109-28, 1992.

MORAES, R. H. P. **Identificação dos inimigos naturais de *Lonomia obliqua* WALKER, 1855 (Lepidoptera: Saturniidae), e possíveis fatores determinantes do aumento da sua população.** 67 p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2002.

PINTO, A. F. M. **Purificação e caracterização de uma enzima fibrin(ogen)olítica de *Lonomia obliqua*.** 2002. 71 p. Dissertação (Mestrado) – Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre.

PINTO, A. F. M., DOBROVOLSKI, R., VEIGA, A.B.G., GUIMARÃES, J.A. Lonofibrase, a novel α -fibrinogenase from *Lonomia obliqua* caterpillars. **Thrombosis Research**, 113(2):147-154, 2004.

PINTO, A. F. M. ; SILVA, K.R.L.M. ; GUIMARÃES, J. A. Proteases from *Lonomia obliqua* venomous secretions: Comparison of procoagulant, fibrin(oen)olytic and amidolytic activities. **Toxicon**, 47:113-121, 2006.

RAMOS, A.T.; GONÇALVES, R.R.; RIBEIRO, O.G., ROCHA-CAMPOS, A.C., SANT'ANNA, O.A. Effects of *Lonomia obliqua* (lepidoptera, saturniidae) toxin on clotting, inflammatory and antibody responsiveness in genetically selected lines of mice. **Toxicon**, 43:761-768, 2004.

REIS, C.V.; KELEN, E.M.A.; FARSKY, S.H.P.; PORTARO, F.C.V.; SAMPAIO, C.A.M.; FERNÁNDEZ, B.L.; CAMARGO, A.C.M.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M. A Ca^{++} activated serine protease (Lopap) could be responsible for the haemorrhagic syndrome caused by the caterpillar *Lonomia obliqua*. **Lancet** 9;353-1942, 1999.

REIS, C.V.; PORTARO, F.C.; ANDRADE, S.A.; FRITZEN, M.; FERNANDES, B.L.; SAMPAIO, C.A. A prothrombin activator serine protease from the *Lonomia obliqua* caterpillar venom (Lopap) biochemical characterization. **Thrombosis Research**, 2001;102(5):427-36.

RIBEIRO, J.M., SCHNEIDER, M., GUIMARÃES, J.A., 1995. Purification and characterization of Prolixin S (Nitrothorin 2), the salivary anticoagulant of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. **Biochemical Journal** 308, 243–249.

ROCHA-CAMPOS, A.C.M.; GONCALVES, L.R., HIGASHI, H.G., YAMAGUSHI, I.K., FERNANDES, I., OLIVEIRA, J.E., RIBELA, M.T.C.P., SOUSA-E-SILVA, M.C.C., DIAS-DA-SILVA, W., Specific heterologous F(abV)₂ antibodies revert blood incoagulability resulting from envenoming by *Lonomia obliqua* caterpillars. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 64:283-9, 2001.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Imunologia**. São Paulo: Manole, 1997.

SALIBA, M.J.JR. Heparin in the treatment of burns: a review. **Burns**, 27: 349-58, 2001.

SEDGWICK, A.D.; MOORE, A.R.; AL-DUAIJ, A.Y.; EDWARDS, J. C. W.; WILLOUGHBY, D.A. The immune response to pertussis in the 6-day air pouch: a model of chronic synovitis. **Br J Exp Path**, 66(4): 455-65, 1985.

SPRINGER, T. A. Adhesion receptors of the immune system. **Nature**, 346:425-34, 1990.

STOOLMAN L.M., Adhesion molecules controlling lymphocyte migration , *Cell*, v .56, p.907-10, 1989.

- STREYER, L. Bioquímica. 3ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1992, p.203.
- TAKADA A, TAKADA Y, URANO T. The physiological aspects of fibrinolysis. **Thrombosis Research**, 76(1):1-31, 1994.
- TYRRELL, D. J.; KILFEATHER, S. ; PAGE, C. P. Therapeutic uses of heparin beyond its traditional role as an anticoagulant. **Trends in Pharmacological Sciences**,16: 198-204, 1995.
- VEIGA, A. B. G. ***Lonomia obliqua*: estrutura secretora e propriedades funcionais do seu veneno sobre a coagulação e a fibrinólise**. 2001. 92 p. Dissertação (Mestrado) – Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre.
- VEIGA, A. B. G.; BLOCHTEIN, B. ; GUIMARAES, J. A. Structures involved in Production, secretion and injection of venom produced by the caterpillar *Lonomia obliqua* (Lepidoptera, Saturniidae). **Toxicon**, 9 :1343-1351, 2001.
- VEIGA, A.B.G.; PINTO, A. F. M.; GUIMARÃES, J. A. Fibrinogenolytic and procoagulant activities in the hemorrhagic syndrome caused by *Lonomia obliqua* caterpillars. **Thrombosis Research**, 111:95-101, 2003.
- VEIGA, A. B. G.; RIBEIRO, J. M. C.; GUIMARÃES, J. A.; FRANCISCHETTI, I. M. B. A catalog for the transcripts from the venomous structures of the caterpillar *Lonomia obliqua*: identification of the proteins potentially involved in the coagulation disorder and hemorrhagic syndrome. **Gene**, 355:11-27, 2005.
- ZANNIN, M. **Avaliação dos parâmetros de coagulação e fibrinólise no plasma de pacientes acidentados por contato com lagartas *Lonomia obliqua***. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo . Inst. De Farmacologia. Curso de Pós-Graduação em Biologia Molecular. São Paulo, 2002.
- ZANNIN, M.; LOURENÇO, D. M.; MOTTA, G.; COSTA, L. R. D.; 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. **Thrombosis and Haemostasis**, 89(2):355-364, 2003.
- ZAR, J.H. Biostatistical analysis. 4ed. New Jersey: Prentice Hall, 1999, 123p.

8. CO-AUTORIA EM ARTIGO PUBLICADO

O artigo **“Proteases from *Lonomia obliqua* venomous secretions: Comparison of procoagulant, fibrin(ogen)olytic and amidolytic activities”** foi resultado do trabalho desenvolvido no laboratório de Bioquímica Farmacológica da UFRGS. Este artigo foi submetido à revista *Toxicon* em maio de 2005 e publicado em maio de 2006.

Proteases from *Lonomia obliqua* venomous secretions: Comparison of procoagulant, fibrin(ogen)olytic and amidolytic activities

Antônio F.M. Pinto, Kátia R.L.M. Silva, Jorge A. Guimarães *

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Centro de Biotecnologia, Av. Bento Gonçalves 9500, P.O. Box 15005,
Porto Alegre 91501-970, Brazil

Received 12 May 2005; revised 18 September 2005; accepted 8 October 2005

Abstract

The hemorrhagic syndrome caused by *Lonomia obliqua* caterpillars is an increasing problem in Southern Brazil. The clinical profile is characterized by both hemorrhagic and pro-coagulant symptoms, constituting a paradoxical action of the venom. The effects upon blood coagulation and fibrin(ogen)olysis have been shown to result from the combined action of several active principles found mostly in the bristle extract. The present study reports quali-quantitative differences among *L. obliqua* secretions: Cryosecretion, hemolymph, bristle extract and tegument extract. Cryosecretion and hemolymph displayed strong amidolytic activity upon several substrates, presented moderated procoagulant activity and high fibrinogen degrading ability. Bristle and tegument extracts presented low amidolytic activity, but bristle extract showed the most potent procoagulant activity and both extracts presented low fibrinogen degrading ability. The differential involvement of these secretions during the accidents with *L. obliqua* can elucidate the different symptoms presented after envenomation.

© 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: *Lonomia obliqua*; Coagulation; Fibrinolysis; Hemostasis; Bleeding disorder

Abbreviations E-64, trans-epoxysuccinyl-L-leucylamido(4-guanidino)-butane; EDTA, ethylene diamine tetraacetic acid; EGTA, ethylene glycol-bis((-aminoethyl ether) *N,N,N',N'*-tetraacetic acid; DL-BAPNA, benzoyl-DL-arginine-pNA; PMSE, phenylmethyl-sulfonyl fluoride; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis; S-2222, Bz-Ile-Glu-Gly-Arg-pNA; S-2238, H-D-Phe-Pip-Arg-pNA; S-2251, H-D-Val-Leu-Lys-pNA; S-2302, H-D-Pro-Phe-Arg-pNA; S-2366, pyroGlu-Pro-Arg-pNA; S-2444, pyroGlu-Gly-Arg-pNA; Tris, tris[hydroxymethyl] aminomethane.

* Corresponding author. Tel.: +55 51 3316 6068; fax: +55 51 3316 7309.

E-mail address: guimar@cbiot.ufrgs.br (J.A. Guimarães).

0041-0101/\$ - see front matter © 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.

doi:10.1016/j.toxicon.2005.10.004

1. Introduction

The Lepidoptera order includes moths and butterflies which have medical importance because they cause respiratory and cutaneous reactions following the contact with hairs of the adult and the spicules of the larvae. The potentially dangerous insects belong to Megalopygidae and Saturniidae families. In Brazil, lepidopteran accidents with cutaneous reactions produced in persons envenomed by these caterpillars have been registered since the beginning of the last century (Von Ihering, 1914). The symptoms produced following the envenomation accident depend on the species involved, the type of active principles present in the venom, the deepness of the contact with the insets and the individual reaction of the patient.

In South America, accidents with caterpillars of *Lonomia* genus (Lepidoptera, Saturniidae) have been frequently described, showing essentially a hemorrhagic clinical disorder in envenomed children and adult persons. In the north of South America (Northern Brazil, Venezuela and French Guyana), accidents were described with *Lonomia achelous* caterpillars (Arocha-Piñango e Layrisse, 1969; Fraiha Neto et al., 1985; Couppié et al., 1998). However, due to deforestation and replacement of the native forest by fruit tree plantation the most dangerous accidents are occurring in Southern Brazil. In these cases, *Lonomia obliqua* caterpillars are responsible for the accidents described since 1989 (Duarte et al., 1990). The envenomation produced by these caterpillars are getting dangerous proportions especially in the states of Rio Grande do Sul, Santa Catarina and Paraná (Donato et al., 1998; Abella et al., 1998). Accidents usually occur when the victim gets in contact with a whole caterpillar colony lying on the surface of tree trunks. In this case, not only the bristles but often the whole animal is smashed in the accident thus allowing that body secretions, including the hemolymph, penetrate the human skin and reach the blood stream. While some toxic principles are found in bristle extracts, others are present in the hemolymph and other venomous preparations of *Lonomia* specimens.

The envenomation is characterized by a hemorrhagic clinical profile installed within a 72 h period after the contact, presenting typical symptoms as intense equimosis, external bleeding and internal (including cerebral) hemorrhage, bloody salivation, intense hematuria and, in some cases, acute renal failure (Duarte et al., 1990). The above symptoms are predominantly hemorrhagic, but there are also pro-coagulant manifestations (Reis et al., 1999; Zamin et al., 2003), constituting a paradoxical action of the venom, probably due to the effects of distinct active principles of the venomous secretion. Similar effects have been described for *L. achelous* caterpillars (Arocha-Piñango et al., 1992; Guerrero et al., 1997a,b, 1999).

Most studies with *L. obliqua* were made using the bristle extract where a prothrombin activator (LOPAP), Factor X activator, phospholipase activity (Lonomiatoxin) and fibrinolytic activity were already identified (Donato et al., 1998; Reis et al., 1999; Seibert et al., 2003; Veiga et al., 2003). Recently, starting from another secreted material obtained upon a freezing procedure applied to *L. obliqua* caterpillars (cryosecretion), Lonofibrase, the first fibrin(ogen)olytic enzyme described in *L. obliqua*, was purified and characterized as an α -fibrinogenase (Pinto et al., 2004). The presence of these different proteins has been confirmed by an exhaustive transcriptome study of distinct *L. obliqua* secretions (Veiga et al., 2005 and <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/omes/>).

Histological and ultra-structural studies of *L. obliqua* caterpillars showed the presence of a secretory epithelium responsible for the venom production. This specialized epithelium underlies the entire tegument as well as

the spicules, except the distal region. The venom produced is stored in specialized cuticle regions and inside the spicules. Furthermore, no gland or glandular structure connected to spicule base was found (Veiga et al., 2001). To better characterize and comprehend the diversity of active principles with possible involvement in the paradoxical effects (procoagulant and hemorrhagic) presented by *L. obliqua* venom, additional experiments were performed as described here. We present the comparative results for amidolytic, procoagulant and fibrinogenolytic activities obtained with four different venomous extracts and secretions: bristle extract, the cryosecretion, hemolymph and tegument extract.

2. Material and methods

2.1. Caterpillars and venomous extracts and secretions

L. obliqua caterpillars were kindly provided by Centro de Informações Toxicológicas (CIT), Porto Alegre, Rio Grande do Sul and Secretaria Municipal de Saúde, Videira, Santa Catarina, Brazil. The insects were collected by local inhabitants directly from trees.

Four different secretions were used in this work. Bristle extract was obtained as described by daSilva et al. (1996). Briefly, bristles were cut at the caterpillars tegument insertion, homogenized in buffer (20 mM Tris, HCl, pH 7.5) and centrifuged at $9,600\times g$ for 20 min. The supernatant was stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until use. Hemolymph was obtained by cutting the caterpillars' head and the abdominal and anal prolegs. The fluid expelled was collected and centrifuged ($9600\times g$ for 20 min). The supernatant was stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until use. Tegument was collected after total dissection of the insects, cut in pieces, homogenized in the above buffer and centrifuged ($9600\times g$ for 20 min). The supernatant, named Tegument extract, was also stored. Cryosecretion was obtained as described in Pinto et al. (2004). Briefly, caterpillars were exposed to $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 24 h and then washed with buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.4). The secreted protein-rich fluid was collected and saved.

2.2. Reagents

Bovine fibrinogen, molecular markers, Tris buffer and benzoyl-DL-arginine *p*-nitroanilide (DL-BAPNA) were obtained from Sigma (St Louis, MO, USA). Substrates S-2238, S-2222, S-2366, S-2302, S-2444, S-2251 were obtained from Chromogenix (Milano, Italy). Thrombin was purified from human plasma by the method described by Ngai and Chang (1991). Citrated plasma was obtained from Hospital de Clínicas (UFRGS). All other chemicals were of the highest purity commercially available.

2.3. SDS-PAGE

Polyacrilamide gel electrophoresis was performed according to Laemmli (1970), using 4% stacking gel and 10% running gel in a BioRad system. Phosphorylase B (97 kDa), Bovine albumin (66 kDa), ovalbumin (45 kDa), carbonic anhydrase (30 kDa), SBTI (20.1 kDa) and α -lactalbumin (14.2 kDa) were used as molecular markers.

2.4. Western blot

L. obliqua secretions separated by SDS-PAGE were electrotransferred at 50 mA for 1 h onto nitrocellulose membranes, and thereafter membranes were blocked with PBS-casein 5% buffer (BLOTTO 5%) overnight. Membranes were incubated with anti-lononic serum (1:500) for 24 h at 4 °C. The anti-lononic anti-serum used is a horse polyclonal antibodies raised against a crude bristle extract used as antigen (daSilva et al., 1996). The same bristle extract was used both in SDS-PAGE and in Western blot for comparison of their protein pattern with that of the other secretions. Membranes were washed three times with BLOTTO 5% and incubated with alkaline phosphatase-labeled anti-horse IgG (1:10,000). The blot was developed according to manufacturer's recommendations (Sigma, USA) using a chromogenic substrate.

2.5. Amidolytic activity

Amidolytic activity of *L. obliqua* secretions upon synthetic chromogenic substrates was assayed as described (Pinto et al., 2004). Briefly, aliquots of the caterpillar's extracts were incubated in 20 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4. The reactions were initiated by adding DL-BAPNA or the more specific substrates S-2238 (thrombin); S-2222 (FXa); S-2366 (FXIa); S-2302 (kallikrein); S-2444 (urokinase) and S-2251 (plasmin) at 0.2 mM (final concentration) in a final volume of 100 μ L. Assays were monitored at 37 °C in a SpectraMax spectrophotometer (Molecular Devices, USA) equipped with thermostat and shaking systems.

The enzymatic activity was expressed in enzyme units per microgram of protein (U/ μ g), where one unity is the amount of secretion that produces one pmol of p-nitroaniline in one minute of reaction at 37 °C.

2.6. Effects of divalent cations

L. obliqua secretions were pre-incubated for 10 min at 37 °C with 5 mM salts of divalent cations: Ca²⁺, Mg²⁺, Ba²⁺, Zn²⁺, Mn²⁺, Cu²⁺ and Co²⁺. The enzymatic activity was determined as described above using the chromogenic substrates.

2.7. Effects of inhibitors

L. obliqua cryosecretion, hemolymph and bristle extract were pre-incubated with 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 5 mM Benzamide, 2.5 mM PMSF, 25 μ M Hg²⁺, 5 mM L-Cysteine, 10 μ M E-64 and 10 mM β -Mercaptoethanol at 37 °C for 20 min. The residual activity was determined using DL-BAPNA and S-2251, S-2444 and S-2222 as substrates for cryosecretion and hemolymph.

2.8. Coagulation assay

The effect of *L. obliqua* secretions upon coagulation was accessed using the recalcification time assay (Hongie, 1963) adapted for the SpectraMax Microplate Reader (Ribeiro et al., 1995). In a final volume of 150, 50 μ L of citrated bovine or human plasma was incubated with different amounts of *L. obliqua* samples in 20 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4. After 5 min at 37 °C, 10 μ L of 150 mM CaCl₂ was added and the reaction followed during 20 min at 37 °C and monitored at 650 nm. Since a potent procoagulant effect was seen in some secretions, a procoagulant index (PI₅₀) was used. PI₅₀ was defined as the amount of secretion (μ g of protein) capable to accelerate coagulation to half the clotting time of control samples.

2.9. Fibrinogen coagulation and fibrinogen degradation assays

Fibrinogen degradation produced by *L. obliqua* secretions was determined using two different methods: (a) fibrinogen coagulation assay in the SpectraMax Microplate Reader, as described above, in which plasma was replaced by fibrinogen and (b) fibrinogen degradation pattern as analyzed by SDS-PAGE. In both cases, the extracts were incubated for 15 min at 37 °C with 0.2 mg of fibrinogen in a final assay volume of 90 μ L (20 mM Tris-HCl, pH 7.4). The fibrinogen coagulation assay was initiated by adding 10 μ L (0.2 μ g) of thrombin solution and the reaction was followed at 37 °C and monitored at 650 nm. For SDS-PAGE analysis of fibrinogen degradation, the reactions were stopped adding the 90 μ L of denaturing solution, containing 8 M urea, 4% SDS and 4% β -mercaptoethanol (Datta et al., 1995).

3. Results

3.1. Electrophoretic pattern of *L. obliqua* secretions

L. obliqua secretions, when analyzed in SDS-PAGE, presented distinct electrophoretic patterns (Fig. 1). Hemolymph and bristle extract showed greater variety of proteins in their electrophoretic patterns. On the other hand, cryosecretion and tegument extracts presented diffused protein patterns. However, in all extracts most proteins

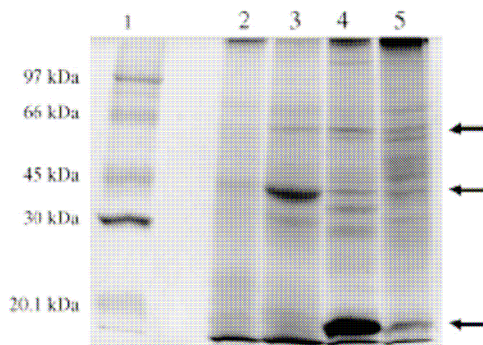


Fig. 1. Polyacrilamide gel electrophoresis. The four *L. obliqua* Secretions (20 µg) were subjected to electrophoresis in 10% running gel. (1) Molecular Markers, (2) Cryosecretion, (3) Hemolymph, (4) Bristle extract, (5) Tegument extract. Arrows indicated bands of 65, 40 and 15 kDa, shared in all extracts.

were found below the range of 80 kDa. Besides a specific pattern presented by each extract, some protein bands (ca proteins corresponding to 65, 40 and 15 kDa.) shared the same pattern mobility in all extracts.

3.2. Immunostaining of *L. obliqua* secretions

As expected from the similarities among the extracts shown in SDS-PAGE, anti-Ionomic antibodies were capable to recognize proteins in all extracts (Fig. 2). Cryosecretion was the less stained extract while hemolymph presented more proteins stained when compared to other samples. Bristle and tegument extracts presented a high degree of similarity in the Western blot. In all samples there was extensive protein recognition in the Mr range between 66

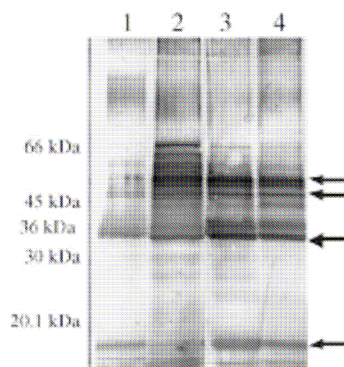


Fig. 2. Immunostaining of *L. obliqua* secretions. The four *L. obliqua* secretions (20 µg) were subjected to electrophoresis in 10% running gel, transferred to a nitrocellulose membrane and immunostained with antilonomic antibodies. Proteins were immunostained with alkaline phosphatase-labeled secondary antibody. (1) Cryosecretion, (2) Hemolymph, (3) Bristle extract, (4) Tegument extract. Arrows indicated bands of 52, 46, 32 and 15 kDa, shared in all extracts.

and 30 kDa. In this range, three proteins (approximately 52, 46 and 35 kDa) were recognized in all extracts. A protein band localized at a low molecular mass region (approximately 15 kDa) was also stained in all extracts.

3.3. Amidolytic activity

DL-BAPNA and tri-peptide chromogenic substrates designed for proteases acting on the hemostasis cascade were tested as substrates. As shown in Table 1, the extracts presented two distinct behaviors: cryosecretion and hemolymph showed high amidolytic activity upon all substrates whereas bristle and tegument extracts showed much lower amidolytic activity for the chromogenic substrates tested. With all extracts DL-BAPNA was the poorest substrate. Except for DL-BAPNA, S-2238 and S-2251, the cryosecretion and hemolymph showed similar level of activities as expressed in U/µg of protein. Among the substrates, S-2444 (Urokinase substrate) was the better hydrolyzed by both samples. On the other hand, bristle and tegument extracts showed higher activity upon S-2222 (FXa substrate), but even so in a much lower level than that expressed by the two other extracts.

Table 1 summarizes the results of amidolytic activity of *L. obliqua* extracts upon synthetic chromogenic substrates.

3.4. Inhibitory studies

As shown in Table 2, benzamidine was the most effective inhibitor among all compounds tested. Upon cryosecretion and hemolymph, benzamidine (5 mM) produced an inhibitory effect ranging from 74 to 99% of the amidolytic activity of the tested substrates. With the bristle extract benzamidine produced a partial inhibition (44.8%) upon its best substrate (S-2222). PMSF (2.5 mM) produced only partial inhibitory effect of the amidolytic activity upon specific substrates of cryosecretion and hemolymph extracts (70–80% inhibition in cryosecretion, 63–81% inhibition in hemolymph and 58% in the bristle extract).

Both cryosecretion and hemolymph assayed with DL-BAPNA were greatly susceptible to Hg²⁺ at low concentrations (25 µM). Contrarily, Hg²⁺ produced only a partial inhibition in the amidolytic activity upon specific substrates. E-64 produced poor or no inhibitory effect for all extracts. EDTA and EGTA produced either a slight activation or no inhibition of the amidolytic activity of cryosecretion and hemolymph. This activation was more pronounced with DL-BAPNA as substrate. On the other and, when tested with bristle extract, both EDTA and EGTA inhibited 95 and 73%, respectively, of the activities upon S-2222.

3.5. Effect of divalent cations

As seen with the inhibitory effect of different compounds, both cryosecretion and hemolymph showed

Table 1
Amidolytic activity of *Lonomia obliqua* secretions upon synthetic chromogenic substrates

Substrate	Enzyme	Amidolytic activity			
		Cryosecretion	Hemolymph	Bristle	Tegument
DL-BAPNA	Serine proteases	3.34	13.43	0.16	0
S-2238	Thrombin	12.930	43.24	2.47	1.43
S-2222	FXa	25.88	22.68	7.68	2.82
S-2366	FXIa	15.82	21.90	1.54	0.89
S-2302	Kallikrein	31.89	22.81	2.12	1.53
S-2444	Urokinase	79.23	67.27	1.88	1.63
S-2251	Plasmin	48.53	25.44	1.14	1.21

L. obliqua secretions (10 µg) were preincubated in 20 mM Tris–HCl buffer, pH 7.4, for 20 min. After incubation, reactions were initiated adding 0.2 mM of the indicated chromogenic substrate (Section 2). Amidolytic activity is expressed in units per microgram (U/µg), where one unit is the amount of protein that produced 1 pmol of *p*-nitroanilin in 1 min of reaction at 37 °C.

Table 2
Effect of inhibitors on the amidolytic activity of *Lonomia obliqua* secretions

Inhibitor	Concentration	Relative activity upon indicated substrates (%)								
		Cryosecretion				Hemolymph				Bristle
		DL-BAPNA	S-2251	S-2444	S-2222	DL-BAPNA	S-2251	S-2444	S-2222	S-2222
NONE	–	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
EDTA	5 mM	187.0	111.4	102.7	108.6	135.9	105.9	96.7	96.7	5.1
EGTA	5 mM	136.2	107.6	115.4	114.1	117.2	106.8	113.9	106.5	27.1
Benzamidin	5 mM	3.4	7.2	11.7	25.8	1.4	7.1	10.7	12.8	44.8
PMSF	2.5 mM	27.4	80.6	75.4	70.1	38.8	81.1	69.2	63.4	41.5
Hg ²⁺	25 µM	5.5	65.1	66.0	52.6	1.3	35.9	40.8	57.0	65.0
E-64	10 µM	66.6	92.0	100.0	87.0	55.8	70.9	84.1	65.1	102.2
L-Cystein	5 mM	95.3	NT ^a	NT	NT	102.0	NT	NT	NT	NT
β-Mercaptoethanol	10 mM	89.6	108.3	98.1	92.3	94.4	113.2	98.5	97.6	75.6

L. obliqua secretions (10 µg) were preincubated in 20 mM Tris–HCl buffer, pH 7.4, for 20 min with protease inhibitors, Reaction were initiated adding 0.2 mM of the indicated chromogenic substrate. Amidolytic activity was determined as described in Section 2. Values represent mean of three experiments.

^a NT, not tested.

similar sensibility to the effect of divalent cations in their amidolytic activity when tested upon BAPNA (Table 3). Compared to control (dialyzed samples), Ca²⁺, Mg²⁺, Ba²⁺ and Mn²⁺ increased the activity, while Co²⁺ showed an intermediate activation. Zn²⁺ produced no effect whereas Cu²⁺ inhibited the enzymatic activity of both extracts. On the other hand, the bristle extract presented a different pattern concerning the influence of divalent cations. Contrarily to the other secretions, Mg²⁺, Ba²⁺ and Mn²⁺ showed no effect (concentration of 5 mM) upon the bristle extract which showed inhibition by Co²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺ (relative activity of 0.58, 0.23 and 0.15, respectively) and a slight activation of 1.27 fold by Ca²⁺ (Table 3).

3.6. Procoagulant activity

As depicted in Table 4 all *L. obliqua* secretions displayed a dose-dependent procoagulant activity, though presenting

different potency levels. Bristle extract showed the strongest procoagulant activity, with a PI₅₀ value of 0.6 µg. Hemolymph and the cryosecretion presented intermediate values of PI₅₀ (34 and 50 µg, respectively), while the tegument extract showed the lowest PI₅₀, 81 µg.

3.7. Fibrinogenolytic activity

When pre-incubated with *L. obliqua* secretions fibrinogen was no longer clotted by thrombin thus indicating that all extracts displayed fibrinogenolytic activity (Fig. 3). The cryosecretion as well as hemolymph showed high fibrinogenolytic activity being both capable to produce almost complete blockage of fibrinogen clotting (10 and 20 µg, respectively) upon further incubation with thrombin. These results were confirmed using electrophoretic analysis (SDS-PAGE) of the incubations (Fig. 3A and B, inserts). It shows that the fibrinogen chains disappeared completely upon

Table 3
Effect of divalent cations on amidolytic activity of *Lonomia obliqua* secretions

Divalent cation	Concentration (nM)	Relative activity		
		Cryosecretion	Hemolymph	Bristle
None	5	1	1	1
Ca ⁺²	5	4.62	2.13	1.27
Mg ⁺²	5	4.73	1.99	0.98
Ba ⁺²	5	3.75	2.00	0.97
Zn ⁺²	5	0.99	1.09	0.23
Mn ⁺²	5	5.07	2.31	0.97
Cu ⁺²	5	0.25	0.01	0.15
Co ⁺²	5	2.79	1.69	0.58

L. obliqua secretions (10 µg) were preincubated in 20 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, for 20 min with divalent cations. BAPNA (cryosecretion and hemolymph) or S-2222 (bristle extract). Amidolytic activity was determined as described in Section 2. Values represent mean of three experiments.

incubation with 0.25 µg of cryosecretion for 15 min. Similarly, 1 µg hemolymph was capable to degrade all fibrinogen chains after 15 min of incubation. In both cases several fibrinogen fragments of low molecular mass were produced (Fig. 3C and D, inserts). On the other hand, the bristle and the tegument extracts presented much lower activity in both the fibrinogen clotting assay and SDS-PAGE analysis.

4. Discussion

L. obliqua's venom was previously reported as possessing mainly procoagulant activity which could be due to the presence of two procoagulant enzymes identified in the bristle extract of the caterpillar: a Factor X activator and a calcium-dependent prothrombin activator (Donato et al., 1998; Reis et al., 2001). However, further studies showed that the presence of calcium ion does not significantly

increase the procoagulant activity of bristle extract (Veiga et al., 2003). More recently, it was reported for the first time, the presence of an anticoagulant activity caused by lonofibrase, a fibrin(ogen)olytic enzyme found in another caterpillar's secretion. Lonofibrase degrades preferentially fibrinogen A α chain, with smaller efficiency in B β chain hydrolysis (Pinto et al., 2004). In the present study, we demonstrated the presence of several other potentially important active principles in *L. obliqua* secretions.

The electrophoretic pattern of the four extracts showed several similarities among protein bands with some unique and distinct characteristics for each material (Fig. 1). Similarly, most proteins bands in all samples were recognized in the immunoblotting, especially those in the Mr range of 66–30 kDa. Concerning to the 15 kDa band found in all caterpillars secretions, it is suggested that it may correspond to lipocalin, a small extracellular protein able to bind plant pigments and other hydrophobic molecules and to intermediate cell-surface and protein-protein interactions, being thus involved in the mechanism of the well known mimetic behavior presented by these animals (Veiga et al., 2005). The primary antibody used for immunostaining, raised against the bristle extract (daSilva et al., 1996), was able to cross-react with distinct proteins in all extract samples. Since a crude bristle extract was used for raising the anti-lonomic serum, the recognition of several bands in all extracts strongly suggests that the hemorrhagic profile resulting from this envenomation may result from the participation of active principles from several secretions. In fact, we have previously studied the structures involved in the production, secretion and injection of the venom (Veiga et al., 2001). Microscopic and histochemical studies of *L. obliqua*'s secretory system demonstrated the absence of a typical glandular tissue. Instead, a very complex tegument with several cuticular specializations was found. This specialized epithelium is present throughout the caterpillar's tegument, being responsible for the venom production. Then, the caterpillar venom components produced by epithelial cells circulate in hemolymph and are stored in the external tegument and spines, being possibly the basis for the greater protein pattern similarity shown by the extracts. Furthermore, the presence of channel networks in the cuticle and breakaway bristles was also found (Veiga et al., 2001), indicating that this structure could offer an adequate system to make the venom easily available to be injected in the victims during the accident. When caterpillars are exposed to freezing conditions, a procedure we used to obtain cryosecretion, the stored proteins were released constituting this specific material, which also shows the mentioned protein similarity.

Differential enzymatic activity upon different chromogenic substrates specific for identification of blood coagulation-related proteases suggests the presence of distinct enzymes displaying amidolytic activities in *L. obliqua* secretions. This was confirmed by inhibition of the enzymes by protease inhibitors of different classes.

Table 4
Procoagulant activity of *Lonomia obliqua* secretions

<i>Lonomia obliqua</i> sample	PI ₅₀ ^a
Cryosecretion	50
Hemolymph	34
Bristle	0.6
Tegument	81

^a *L. obliqua* secretions were incubated with citrated plasma in 20 mM Tris-HCl buffer, PH 7.4, for 5 min. After incubation, reactions were initiated adding 10 µL of 150 mM CaCl₂ and monitored at 650 nm. PI₅₀ is expressed as the amount of extract in micrograms capable to reduce in one half the plasma coagulation time.

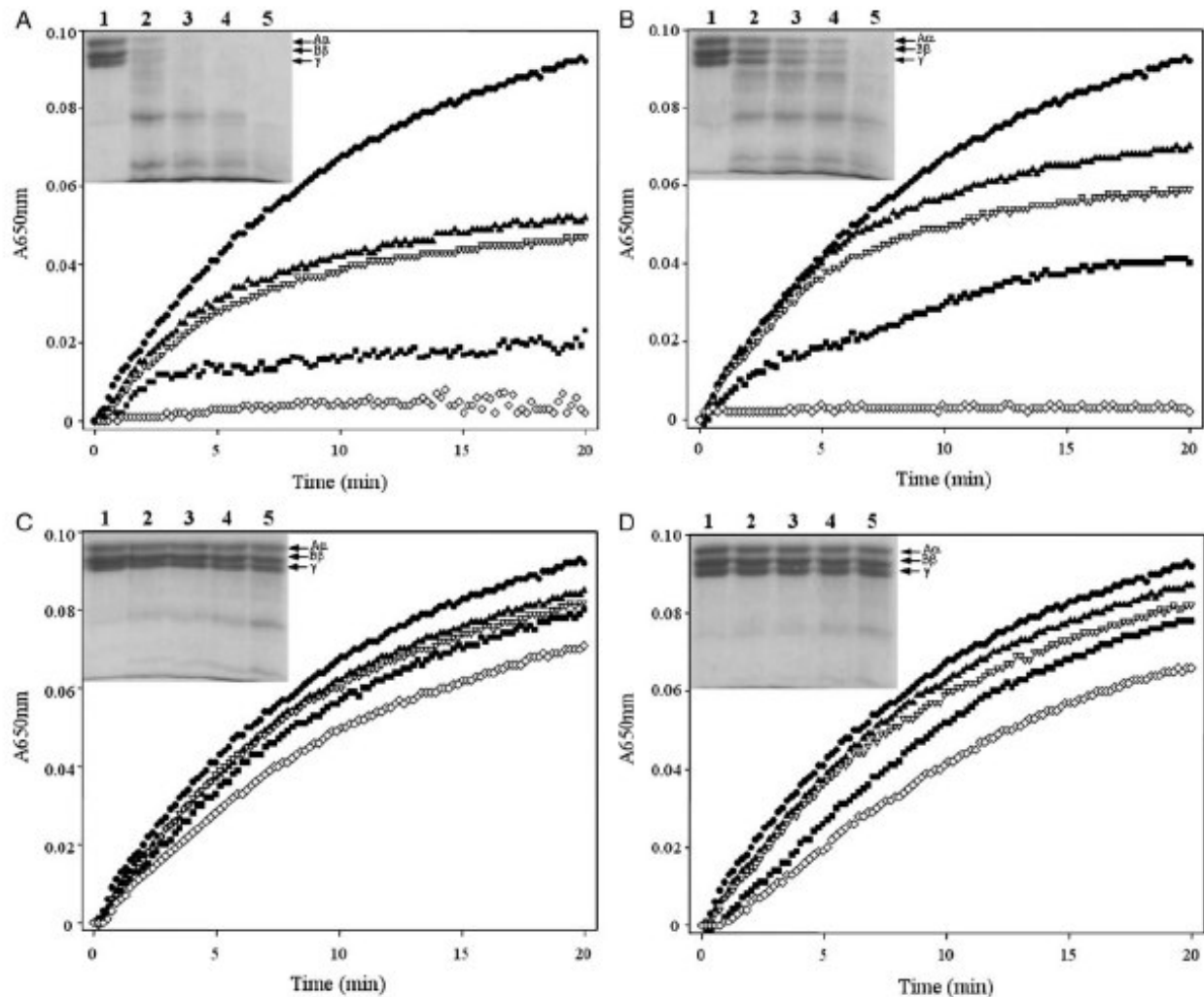


Fig. 3. Fibrin(ogen)olytic Activity. Fibrinogen (FBG) (0.2 mg) was incubated different amounts of *L. obliqua* secretions. After 15 min of incubation, 0.2 μ g thrombin was added and the reaction followed at 650 nm. Control (●), 2.5 mg (▲), 5 mg (▽), 10 mg (■) and 20 mg (◇). Insert: reactions in the same conditions were analyzed in SDS-PAGE. (1) 20 μ g FBG; (2–5) 20 μ g FBG with 0.125, 0.25, 0.5 and 1 μ g of extracts, respectively. (A) Cryosecretion; (B) Hemolymph; (C) Bristle extract and (D) Tegument extract. α_2 , β and γ FBG chains are indicated.

Concerning the enzyme diversity, the data indicate the presence of a high amidolytic activity on both cryosecretion and hemolymph, acting upon the specific substrates of thrombin, FXa, FXIa, kallikrein, urokinase and plasmin. These data suggest the presence of proteases with different secondary specificity or even wide specificity upon these substrates (Pinto et al., 2000). Inhibitory studies indicate the existence of two main groups of proteases in cryosecretion and hemolymph secretions: (a) serine proteases, strongly inhibited by benzamidine and (b) cysteine proteases, susceptible to both E-64 and Hg^{+2} . The presence of a protease from these two groups in *L. obliqua* secretions was confirmed by high-throughput sequencing studies, in which sequences matching with serine protease-like and cathepsin-like enzymes were identified (Veiga et al., 2005). The bristle

extract may contain a third group of metal-dependent protease susceptible to EDTA and EGTA. However, surprisingly no metalloprotease sequence was identified in the *L. obliqua* libraries (Veiga et al., 2005).

Despite of the presence of two previously reported enzymes in the bristle extract (Donato et al., 1998; Reis et al., 2001), it presents very low amidolytic activity upon the chromogenic substrates tested, except for S-2222, a FXa specific substrate, for which a moderate activity was found. This activity is probably due mainly to the calcium-dependent prothrombin activator present in this secretion (Reis et al., 1999). Nevertheless, the amidolytic activity was just slightly activated in the presence of 5 mM Ca^{2+} (Table 3), in accordance with previously reported data that showed the calcium independence of prothrombin activation

(Veiga et al., 2003). However, as expected for the prothrombin activator, the amidolytic activity was completely inhibited by EDTA and partially inhibited by benzamidine (Reis et al., 2001). The tegument extract shows similar behavior, presenting minimal amidolytic activity.

As shown in Table 4, all *L. obliqua* secretions presented procoagulant activity as depicted in the reduced clotting time. The strongest activity presented by the bristle extract is mainly due to the presence of two enzymes previously described: a prothrombin activator (LOPAP) and a Factor X (FX) activator (Donato et al., 1998). It seems then that the dissimilar procoagulant potency of the extracts tested is due, probably, to differential quantitative distribution of the proteases in the caterpillar's secretions. The absence of a prothrombin activator LOPAP in cryosecretion was confirmed in previous studies (data not shown). Thus, the procoagulant activity presented by this secretion seems to be due to FX activation. A similar behavior in hemolymph can be explained in the same way. The lower activity in tegument extract is probably due to low concentration of these enzymes in the high protein content of this material.

As previously reported, *L. obliqua* presents lonofibrase, a strong fibrin(ogen)olytic activity described in the cryosecretion (Pinto et al., 2004). However, it was now found that other caterpillar's secretions also display similar activity. As expected, cryosecretion showed higher fibrin(ogen)olytic activity, followed by hemolymph. Fibrinogen chains were fully degraded by the extracts, forming low molecular-weight unclottable fibrinogen fragments (Fig. 3A and B, Inserts). Despite having higher amidolytic activity, the fibrin(ogen)olytic activity of hemolymph was weaker than that of the cryosecretion. Due to its similar origin, probably lonofibrase is involved in the fibrin(ogen)olytic activity of hemolymph and other secretions. Concerning the bristle extract, a weak fibrin(ogen)olytic activity was found. However, fibrinogen fragments could be identified in tested conditions by using incubation time of 1 and 24 h, where fibrinogen degradation is clearly visible (Veiga et al., 2003). Furthermore, this activity is more visible using a high proportion of venom:fibrinogen (Fritzen et al., 2003). Possibly, the amount of the enzyme responsible for this activity in the whole extract is very low or it has a slow fibrinogen degrading kinetic.

The present study reports quali-quantitative differences among four *L. obliqua* secretions. These differences are mainly in the protease content. Cryosecretion and hemolymph display strong amidolytic activity upon several substrates tested, presented moderated procoagulant activity and high fibrinogen degrading ability. Bristle and tegument extracts presented low amidolytic activity, but bristle extract showed the most potent procoagulant activity and both extracts presented low fibrinogen degrading ability. It is concluded that the differential involvement of each one of these secretions during the contact with one caterpillar or the whole colony can differentiate the outcome and wide variety

of the clinical syndrome caused by *L. obliqua* envenomation.

Acknowledgements

We would like to thank the Centro de Informações Toxicológica (CIT-RS) for donation of caterpillars and support of information concerning envenomation. This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

References

- Abella, H.B., Torres, J.B., Marques, M.G.B., Duarte, A.C., Barros, E., 1998. Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por *Lonomia*. CIT (Centro de Informação Toxicológica), Porto Alegre.
- Arocha-Piñango, C.L., Layrisse, M., 1969. Fibrinolysis produced by contact with a caterpillar. *The Lancet* 1, 810–812.
- Arocha-Piñango, C.L., De Bosch, N.B., Torres, A., Goldstein, C., Nouel, A., Argüello, A., Carvajal, Z., Guerrero, B., Ojeda, A., Rodríguez, A., Rodríguez, S., 1992. Six new cases of a caterpillar-induced bleeding syndrome. *Thrombosis and Haemostasis* 67, 402–407.
- Coupié, P., Marty, C., Sainte-Marie, D., Pradinaud, R., 1998. Chenilles venimeuses de Guyane Française: 5 observations. *Annales de Dermatologie et de Vénérologie* 125, 489–491.
- daSilva, W.D., Campos, A.C.M.R., Gonçalves, L.R.C., Souza-e-Silva, M.C.C., Higashi, H.G., Yamagushi, I.K., Kelen, E.M.A., 1996. Development of an antivenom against toxins of *Lonomia obliqua* caterpillars. *Toxicon* 34, 1045–1049.
- Datta, G., Dong, A., Witt, J., Tu, A.T., 1995. Biochemical characterization of Basilase, a fibrinolytic enzyme from *Crotalus basiliscus basiliscus*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 317, 365–373.
- Donato, J.L., Moreno, R.A., Hyslop, S., Duarte, A., Antunes, E., Le Bonniec, B.F., Rendu, F., De Nucci, G., 1998. *Lonomia obliqua* caterpillar spicules trigger human blood coagulation via activation of factor X and prothrombin. *Thrombosis and Haemostasis* 79, 539–542.
- Duarte, A.C., Caovilla, J., Lorini, I., Lorini, D., Mantovani, G., Sumida, J., Manfre, P.C., Silveira, R.C., Dr Moura, S.P., 1990. Insuficiência renal aguda por acidentes com lagartas. *Jornal Brasileiro de Nefrologia* 12 (4), 184–186.
- Fraiha Neto, H., Amaral, I.M., Ballarini, A.J., 1985. *Lonomia achelous* (Cramer) (Lepidoptera, Saturniidae), o 'tapuru da seringueira', agente do acidente hemorrágico por contato com larvas de mariposa no território Federal do Amapá. Resumo do XX Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, São Paulo, p. 24.
- Fritzen, M., Schattner, M., Ribeiro, A.L.Q., Batista, I.F.C., Ventura, J., Prezoto, B.C., Chudzinski-Tavassi, A.M., 2003. *Lonomia obliqua* venom action on fibrinolytic system. *Thrombosis Research* 112, 105–110.

- Guerrero, B.A.G., Arocha-Piñango, C.L., Gil, A., 1997a. *Lonomia achelous* caterpillar venom (LACV) selectively inactivates blood clotting factor XIII. *Thrombosis Research* 87, 83–93.
- Guerrero, B.A.G., Arocha-Piñango, C.L., Gil, A., 1997b. Degradation of human factor XIII by Lonomin V, a purified fraction of *Lonomia achelous* caterpillar venom. *Thrombosis Research* 87, 171–181.
- Guerrero, B.A.G., Perales, J., Gil, A., Arocha-Piñango, C.L., 1999. Effect on platelet FXIII and partial characterization of Lonomin V, a proteolytic enzyme from *Lonomia achelous* caterpillars. *Thrombosis Research* 93, 243–252.
- Hougie, C., 1963. *Fundamentals of Blood Coagulation and Clinical Medicine*. McGraw-Hill, New York, pp. 25–48.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Ngai, P.K., Chang, J.Y., 1991. A novel one-step purification of human α -thrombin after direct activation of crude prothrombin enriched from plasma. *Biochemical Journal* 280, 805–808.
- Pinto, A.F.M., Veiga, A.B.G., Blochtein, B., Guimarães, J.A., 2000. Proteases from different secretions are involved on the paradoxical (pro-coagulant and hemorrhagic) envenomation caused by *Lonomia obliqua* caterpillars. In: Ménez, A. et al. (Org.), *Toxins from Animals, Plants and Microbes. Program and Abstracts Book—XIIIth World Congress of the International Society on Toxinology-IST*, Paris, p. 178.
- Pinto, A.F.M., Dobrovolski, R., Veiga, A.B.G., Guimarães, J.A., 2004. Lonofibræ, a novel α -fibrinogenase from *Lonomia obliqua* caterpillars. *Thrombosis Research* 113, 147–154.
- 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., 1999. A Ca^{++} activated serine protease (LOPAP) could be responsible for the haemorrhagic syndrome caused by the caterpillar *Lonomia obliqua*. *The Lancet* 353, 1942.
- 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., 2001. A prothrombin activator serine protease from the *Lonomia obliqua* caterpillar venom (Lopap) biochemical characterization. *Thrombosis Research* 102, 427–436.
- Ribeiro, J.M., Schneider, M., Guimarães, J.A., 1995. Purification and characterization of Prolixin S (Nitrothorin 2), the salivary anticoagulant of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. *Biochemical Journal* 308, 243–249.
- Seibert, C.S., Shinohara, E.M.G., Sano-Martins, I.S., 2003. In vitro hemolytic activity of *Lonomia obliqua* caterpillar bristle extract on human and Wistar rat erythrocytes. *Toxicon* 41, 831–839.
- Veiga, A.B.G., Blochtein, B., Guimarães, J.A., 2001. Structures involved in production, secretion and injection of the venom produced by the caterpillar *Lonomia obliqua* (Lepidoptera, Saturniidae). *Toxicon* 39, 1343–1351.
- Veiga, A.B.G., Pinto, A.F.M., Guimarães, J.A., 2003. Fibrinolytic and procoagulant activities in the hemorrhagic syndrome caused by *Lonomia obliqua* caterpillars. *Thrombosis Research* 111, 95–101.
- Veiga, A.B.G., Ribeiro, J.M., Guimarães, J.A., Francischetti, I.M.B., 2005. A catalog for the transcripts from the venomous structure of the caterpillar *Lonomia obliqua*: identification of the proteins potentially involved in the coagulation disorder and hemorrhagic syndrome. *Gene* 355, 11–27.
- Von Ihering, R., 1914. Estudo biológico das lagartas urticantes ou tatoranas. *Annaes Paulistas de Medicina e Cirurgia* 3, 129–139.
- Zannin, M., Lourenço, D.M., Motta, G., Costa, L.R.D., Grando, M., Gamborgi, G.P., Noguti, M.A., Chudzinski-Tavassi, A.M., 2003. Blood coagulation and fibrinolytic factors in 105 patients with hemorrhagic syndrome caused by accidental contact with *Lonomia obliqua* caterpillar in Santa Catarina, Southern Brazil. *Thrombosis and Haemostasis* 89, 355–364.

KÁTIA ROSANA LIMA DE MOURA DA SILVA

Curriculum Vitae
Março, 2007

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Kátia Rosana Lima de Moura da Silva

Filiação: Artur Araíde de Moura e Ana Maria Lima de Moura

Endereço profissional: Secretaria Estadual da Saúde - Fundação Estadual de Produção e Pesquisa Em Saúde, Centro de Informação Toxicológica, Núcleo de Toxinas Naturais.
Rua Domingos Crescêncio, 132 - 8ª andar
Bairro Santana - 90650090 - Porto Alegre, RS - Brasil
Telefone: () 32171751 Fax: () 32179067
URL da Homepage: <http://www.cit.rs.gov.br>

Endereço residencial: Av. Américo Caetano de Souza, 95 Bairro Jardim Krahe
Viamão/RS (51) 3485-8983 99673397

2. FORMAÇÃO ACADÊMICA

Mestrado em Biologia Celular e Molecular.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil.

Especialização em Toxicologia Aplicada. (390h). Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Brasil. Ano de finalização: 1995.

Graduação em Ciências Biológicas. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Brasil.

3. ESTÁGIO REALIZADOS

1990 – 1992 Museu de Ciências Naturais, Núcleo de Vegetais Inferiores. Estudo Taxonômico de algas Diatomáceas.

1987 - 1987 Instituto de Pesquisas Biológicas, Divisão de Bromatologia - Microscopia de Alimentos.

4. ATIVIDADE PROFISSIONAL

Secretaria Estadual da Saúde

2000 – atual: Bióloga do Centro de Informação Toxicológica do Rio Grande do Sul
Atua na identificação e conservação de animais peçonhentos e plantas tóxicas. Elabora e ministra palestras/cursos sobre identificação de animais peçonhentos, sinais clínicos decorrente do envenenamento causado por estes animais, bem como a prevenção destes acidentes.

2005 – atual: Extração de veneno das serpentes do gênero *Bothrops* e *Crotalus* do criatório do Núcleo de Toxinas Naturais do CIT/RS.

Ensino

1992 – 2000: Disciplinas de ciências e biologia no Colégio Stella Maris e escolas das Prefeituras Municipais de Viamão e Gravataí.

5. PARTICIPAÇÃO EM PROJETOS

2000-2002: Levantamento das regiões de risco de acidentes com lagartas urticantes do gênero *Lonomia* na Estado do Rio Grande do Sul. O projeto teve como objetivos reconhecer e mapear de forma sistemática municípios com identificação de lagartas urticantes do gênero *Lonomia*, capacitando profissionais atuantes junto as prefeituras municipais do Rio Grande do Sul na identificação destas lagartas.

2004 –2005: Extração de veneno de serpentes peçonhentas do Rio Grande do Sul. O objetivo deste projeto foi o de desenvolver e padronizar a técnica de extração e acondicionamento de veneno de serpentes peçonhentas do Rio Grande o Sul.

6. ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS

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

CALLEGARO, V. L. M. ; SILVA, K. R. L. M. ; SALOMONI, S. E. . Flórua Diatomológica de Ambientes Lênticos e Lóticos no Parque Florestal Estadual do Turvo, Rio Grande do Sul, Brasil. Iheringia, Porto Alegre, v. 43, p. 89, 1993.

7. ELABORAÇÃO DE MANUAL TÉCNICO

ABELLA, H. B. ; MARQUES, M. G. B. ; BOFF, G. J. ; GAVIOLI, I. L. ; ROSSONI, M. G. ; TORRES, J. B. ; SILVA, K. R. L. M. ; RAMOS, C. L. J. ; SILVA, C. A. M. ; LESSA, C. S. . **MANUAL DE IDENTIFICAÇÃO E TRATAMENTO DE INTOXICAÇÕES POR PLANTAS.** 2002.

8. CAPÍTULOS DE LIVROS PUBLICADOS

ABELLA, Hudson Barreto ; MARQUES, M. G. B. ; SILVA, Katia Rosana Moura da; ROSSONI, Maria Gorete ; TORRES, João Batista . Acidentes com lagartas do gênero *Lonomia* registrados no Centro de Informação Toxicológica do Rio Grande do Sul no período de 1997 a 2005. In: Alberto Nicolella. (Org.). Toxicovigilância - Toxicologia Clínica--Dados e indicadores selecionados-RS/2005. 1ed ed. Porto Alegre: , 2006, v. 1, p. 29-34.

9. RESUMOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSOS

DALLEGRAVE, E. ; SILVA, Kátia Rosana Lima de Moura da ; MARQUES, Maria da Graça Boucinha ; ABELLA, Hudson Barreto ; MENTZ, Márcia Bohrer ; MACIEL, Renata P . Manejo parasitológico de serpentes do criatório do Núcleo de Toxinas Naturais do Centro de Informação Toxicológica do Rio Grande do Sul. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE TOXICOLOGIA, 2005, Recife. Revista Brasileira de Toxicologia. São Paulo : Sociedade Brasileira de Toxicologia, 2005. v. 18.

MACIEL, Renata Perez ; DALLEGRAVE, E. ; MARQUES, Maria da Graça Boucinha ; ABELLA, Hudson Barreto ; MENTZ, Márcia Bohrer ; SILVA, Kátia Rosana Lima de Moura da. Avaliação de endoparasitos em serpentes do criatório do Núcleo de Toxinas Naturais do Centro de Informação Toxicológica do Rio Grande do Sul. In: VI SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA PUCRS, 2005, Porto Alegre. ANAIS DO VI SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA PUCRS, 2005.

DALLEGRAVE, E. ; MENTZ, Márcia Bohrer ; SILVA, Kátia Rosana Lima de Moura da ; MARQUES, Maria da Graça Boucinha ; MACIEL, Renata Perez ; FORTES, Fabian ; ABELLA, Hudson Barreto . Eficácia da ivermectina no controle de nematódeos de serpentes do criatório do Núcleo de Toxinas Naturais do Centro de Informação Toxicológica do Rio Grande do Sul. (NTN-CIT/RS). In: XIX CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA, 2005, Porto Alegre. XIX CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA, 2005.

SILVA, Kátia Rosana Lima de Moura da ; MARQUES, Maria da Graça Boucinha ; DALLEGRAVE, E. ; MACIEL, Renata Perez ; MENTZ, Márcia Bohrer ; ABELLA, Hudson Barreto . Eficácia do fembendazol no controle de nematódeos de serpentes do criatório do Núcleo de Toxinas Naturais do Centro de Informação Toxicológica do Rio Grande do Sul. (NTN-CIT/RS). In: XIX CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA, 2005, Porto Alegre. ANAIS DO XIX CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA, 2005

MENTZ, Márcia Bohrer ; DALLEGRAVE, E. ; SILVA, Kátia Rosana Lima de Moura da ; MARQUES, Naria da Graça Boucinha ; MACIEL, Renata Perez ; ABELLA, Hudson Barreto . Ocorrência de endoparasitos em serpentes do criatório do Núcleo de Toxinas Naturais do Centro de Informação Toxicológica do Rio Grande do Sul. In: XIX CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA, 2005, Porto Alegre. ANAIS DO XIX CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA, 2005.

SILVA, K. R. L. M. ; MARQUES, M. G. B. ; ROSSONI, M. G. ; BOFF, G. S. ; ABELLA, H. B. . Identificação correta dos animais peçonhentos X conduta clínica adequada. In: 3º Encontro Nacional de Acidentes com Animais Peçonhentos, 2004, Porto Alegre, 2004

ROSSONI, M. G. ; SILVA, K. R. L. M. ; MARQUES, M. G. B. ; BOFF, G. J. ; ABELLA, H. B. . Importância da correta identificação no manejo dos acidentes causados por animais peçonhentos. In: 3º Encontro Nacional de Acidentes com Animais Peçonhentos, 2004, Porto Alegre, 2004.

ABELLA, H. B. ; SILVA, K. R. L. M. ; MARQUES, M. G. B. ; ROSSONI, M. G. ; BOFF, G. J. . Mapeamento de *Lonomia* sp no Rio Grande do Sul. In: 3º Encontro Nacional de Acidentes com Animais Peçonhentos, 2004, Porto Alegre, 2004.

TORRES, J. B. ; MARQUES, M. G. B. ; SILVA, K. R. L. M. ; ROSA, A. S. . Primeiro relato de acidente com *Tityus uruguayensis* no Rio Grande do Sul. In: 3º Encontro Nacional de Acidentes com Animais Peçonhentos, 2004, Porto Alegre. Anais do 3º Encontro Nacional de Acidentes com Animais Peçonhentos, 2004.

TORRES, J. B. ; MARQUES, M. G. B. ; ROSA, A. S. ; SILVA, K. R. L. M. . Primeiro caso de acidente com *Tityus uruguayensis* no Rio Grande do Sul. In: 24ª Semana Científica do HCPA, 2004, Porto Alegre. Livro de Resumos da 24ª Semana Científica do HCPA, 2004.

DALLEGRAVE, E. ; NICOLELLA, Alberto ; LISBOA, Aneli de ; RAMOS, Carla Obino Job ; LESSA, Carlos Alberto Spalding ; SILVA, Carlos Augusto Mello da ; NARESSI, Daniela Pazini ; BOFF, Glória Sueli Jancowski ; ABELLA, Hudson Barreto ; GAVIOLI, Izabela Lucchese ; SILVA, Kátia Rosana Lima de Moura da ; MARQUES, Maria da Graça Boucinha ; MEDEIROS, Maria Salete C ; CONY, Stella Maria . PROGRAMA DE EDUCAÇÃO CONTINUADA EM TOXICOLOGIA PARA ESCOLAS

PÚBLICAS DE ENSINO FUNDAMENTAL EM PORTO ALEGRE NA ÁREA DE ANIMAIS PEÇONHENTOS. 2004. (Apresentação de Trabalho/Comunicação).

SILVA, K. R. L. M. ; VEIGA, A. B. G. ; PINTO, A. F. M. ; GUIMARÃES, J. A. . Caracterização diferencial de proteínas do veneno de *Lonomia obliqua*. In: XVIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de biologia Experimental - FeSbe, 2003, Pinhais, 2003.

ABELLA, H. B. ; SILVA, K. R. L. M. ; NEVES, M. G. B. ; RAMOS, C. L. J. ; BOFF, G. S. J. ; ROSSONI, M. G. . Levantamento das regiões de risco de acidente com lagartas urticantes do gênero *Lonomia* no Estado do Rio Grande do Sul. . In: XII Congresso Brasileiro de Toxicologia, 2003, Londrina. Revista Brasileira de Toxicologia. São Paulo : Sociedade Brasileira de Toxicologia, 2003. v. 16. p. 271-271.

ROSSONI, M. G. ; SILVA, K. R. L. M. ; MARQUES, M. G. B. ; ABELLA, H. B. ; BOFF, G. S. J. ; RAMOS, C. L. J. . Plantas de uso medicinal, responsáveis por casos de intoxicação atendidos no CIT/RS entre 1998-2000. In: 6º Encontro Regional de Biólogos da Região sul, 2002, Porto Alegre, 2002.

ABELLA, H. B. ; SILVA, K. R. L. M. ; MARQUES, M. G. B. ; RAMOS, C. L. J. ; BOFF, G. S. ; ROSSONI, M. G. . Levantamento das regiões de risco de acidentes com larvas urticantes do gênero *Lonomia* no estado do Rio Grande do Sul. In: 1ª Jornada Científica da FEPPS, 2002, Porto Alegre, 2002.

SILVA, K. R. L. M. ; BOFF, G. S. J. ; MARQUES, M. G. B. ; RAMOS, C. L. J. ; ABELLA, H. B. . Identificações da Seção de Toxinas Naturais do Centro de Informação Toxicológica do Rio Grande do Sul no período de 1990 à 1999. In: 1º Congresso Panamericano de Centros de Informação e Controle Toxicológico; 1º Congresso Brasileiro de Toxicologia Clínica, 2001, Porto Alegre, 2001.

RAMOS, C. L. J. ; MARQUES, M. G. B. ; BOFF, G. S. J. ; SILVA, K. R. L. M. ; ABELLA, H. B. . Ocorrência de Acidentes por Lagartas do gênero *Lonomia* nas cidades do Estado do Rio Grande do Sul. In: 1º Congresso Panamericano de Centros de Informação e Controle Toxicológico; 1º Congresso Brasileiro de Toxicologia Clínica, 2001, Porto Alegre. Anais do 1º Congresso Panamericano de Centros de Informação e Controle Toxicológico, 2001.

ROSSONI, M. G. ; SILVA, K. R. L. M. ; RAMOS, C. L. J. ; MARQUES, M. G. B. ; ABELLA, H. B. . Plantas Tóxicas Nativas responsáveis por casos de intoxicação atendidos no CIT/RS, no período de 1999-2000. In: XII Congresso Brasileiro de Toxicologia; VII Encontro Nacional de Professores de Toxicologia: III Encontro Nacional de Toxicologistas Forenses: Reunião Nacional dos Centros de Informações Toxicológicas, 2001, Porto Alegre. Anais do XII Congresso Brasileiro de Toxicologia, 2001.

CALLEGARO, V. L. M. ; SILVA, K. R. L. M. ; SALOMONI, S. E. . Flora Diatomológica em ambientes lênticos e lóticos no Parque Florestal Estadual do Turvo, Rio Grande do Sul, Brasil. In: V Reunião Brasileira de Ficologia, 1991, Rio de Janeiro. Annais da V Reunião Brasileira de Ficologia, 1991.