

PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS
CONTRA COMPONENTES DO VENENO DE *Lonomia*
obliqua E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DA
LIPOCALINA ISOLADA.

ANA CAROLINA TERRA MERCADANTE

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE - UENF
CAMPOS DOS GOYTACAZES, RJ.
FEVEREIRO DE 2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS
CONTRA COMPONENTES DO VENENO DE *Lonomia*
obliqua E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DA
LIPOCALINA ISOLADA.

ANA CAROLINA TERRA MERCADANTE

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE - UENF
CAMPOS DOS GOYTACAZES, RJ.
FEVEREIRO DE 2008

PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS
CONTRA COMPONENTES DO VENENO DE *Lonomia*
obliqua E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DA
LIPOCALINA ISOLADA.

ANA CAROLINA TERRA MERCADANTE

Tese submetida ao Centro de
Biotecnologia e Biociências da
Universidade Estadual do Norte
Fluminense – Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para
a obtenção do título de Mestre
em Biociências e Biotecnologia.

ORIENTADOR: Dr. MILTON MASAHIKO KANASHIRO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE - UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES, RJ.

FEVEREIRO DE 2008

PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS
CONTRA COMPONENTES DO VENENO DE *Lonomia*
obliqua E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DA
LIPOCALINA ISOLADA.

ANA CAROLINA TERRA MERCADANTE

Tese submetida ao Centro de
Biotecnologia e Biociências da
Universidade Estadual do Norte
Fluminense – Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para
a obtenção do título de Mestre
em Biociências e Biotecnologia.

Aprovada em ____ de _____ de 2008.

Comissão Examinadora:

Dr. Jonas Enrique Aguilar Perales / FIOCRUZ

Dr^a. Kátia Valevski Sales Fernandes / UENF

Dr. Jorge Hudson Petrestki / UENF

Dr. Milton Masahiko Kanashiro / UENF
(ORIENTADOR)

*Aos meus pais Cecília e Cláudio, cuja fé em mim
fez com que eu tivesse fé em mim mesma,
dedico esta tese...*

AGRADECIMENTOS

Não encontrei e jamais encontrarei palavras que descrevam suficientemente o quão grata me sinto por aqueles que colaboraram, ao longo desta etapa, para eu alcançar meus objetivos. Mesmo assim, primeiramente, gostaria de agradecer à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo importante apoio financeiro.

À Universidade Estadual Norte Fluminense, em especial ao Laboratório de Biologia do Reconhecer, pela utilização de suas dependências;

Ao Dr. Milton Kanashiro pela orientação, paciência, confiança, amizade e conhecimentos compartilhados. Muito obrigada!

À Cristiane que muito gentilmente aceitou revisar esta tese!

Aos meus pais, meus primeiros mestres, que me ensinaram as lições mais importantes da vida: me ensinaram a sonhar e a lutar por meus sonhos, mesmo que eles estivessem tão longe da minha realidade; me ensinaram que não sou pior ou melhor que ninguém; me ensinaram a calcar meus caminhos em bases concretas de dignidade e respeito ao próximo e a mim mesma; e o mais importante, me ensinaram, aliás, me fizeram vivenciar o sentido das palavras amor e família. A vocês que me ensinaram tudo isso, não por meio de broncas, mas sendo exemplos vivos, meu mais profundo obrigada. Obrigada pelas oportunidades que me proporcionaram e, acima de tudo, obrigada por me fazer ter orgulho da pessoa que me tornei. Amo vocês!

Ao Thiago por todo amor, carinho e apoio! Obrigada por me fazer sentir especial e por ter colorido ainda mais os meus dias! Te amo muito!

À “dinda” Inês, “minha mãe preta”, por todos os carinhos, mimos, cuidados, enfim, por me fazer sentir como uma terceira filha. E ao meu “dindo” Carlinhos, por tudo! Amo muito vocês dois!

À vovó Dulce pelo amor, pela preocupação e orações pelo meu sucesso. Ao vô Braz pelas histórias e carinho! À “dinda” Antônia por todo amor.

Aos meus “pipocuxos” Amanda, Alan, Luana, Júlia e Rodolfo. E a todos da minha enorme família!

À professora Thereza Kipnis por permitir que eu iniciasse minha vida científica em seu laboratório. Ao Dr. Jorge pela amizade e explicações Bioquímicas. E ao demais professores do LBR, obrigada!

Aos alunos e técnicos do LBR, em especial ao Franz, Marcela, Thiago, Aline, Inarei, Felipe, Marcelle, Simone, Claudinha e Verônica cujo apoio e amizade fizeram toda diferença na minha vida.

Aos meus amigos Priscila, Lia, Marília, Monique, Felipe e Tiago, pois mesmo que não estejamos todo o tempo juntos, nossos corações nunca se separam!

Às amigas Thaísa, Mariana, Shayany, Nathália e Paula pela amizade que nasceu e se fortaleceu ao longo desses quatro anos.

Finalmente, e mais importante, agradeço a DEUS simplesmente por ter me dado a vida e ter colocado nela as pessoas maravilhosas que mencionei!
OBRIGADA!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	xvi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. JUSTIFICATIVA.....	18
3. OBJETIVOS.....	19
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
5. RESULTADOS.....	28
6. DISCUSSÃO.....	40
7. CONCLUSÕES.....	46
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
9. ANEXOS.....	56

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: <i>Lonomia obliqua</i>	4
FIGURA 2: Modelo esquemático do sistema envolvido na produção e inoculação do veneno da <i>Lonomia obliqua</i>	7
FIGURA 3: Ultraestrutura do tegumento de <i>Lonomia obliqua</i>	7
FIGURA 4: Quadro clínico resultante do envenenamento por <i>Lonomia obliqua</i>	10
FIGURA 5: Modelo de ação das toxinas LOPAP, enzima ativadora de Fator X e Ionofibrase.....	14
FIGURA 6: Análise dos anticorpos purificados por SDS-PAGE 12%.....	28
FIGURA 7: Análise dos anticorpos purificados por <i>Western blotting</i>	29
FIGURA 8: Titulação pelo teste de ELISA dos anticorpos monoclonais purificados.....	30

FIGURA 9: Análise da especificidade dos anticorpos monoclonais por <i>Western blotting</i>	31
FIGURA 10: Análise do imunoprecipitado do veneno de <i>Lonomia obliqua</i> com anticorpos monoclonais por SDS-PAGE 12%.....	32
FIGURA 11: Seqüência de aminoácidos do componente imunoprecipitado pelo Mab 25DH9.....	32
FIGURA 12: Purificação parcial da Lipocalina.....	33
FIGURA 13: Análise do perfil eletroforético do conteúdo da banda extraída.....	34
FIGURA 14: Análise da banda extraída do gel nativo por <i>western blotting</i>	34
FIGURA 15: Seqüência de aminoácidos da Banda 2.....	35
FIGURA 16: Seqüência de aminoácidos da Banda 3.....	35
FIGURA 17: Purificação da lipocalina através da cromatografia de troca iônica.....	36

FIGURA 18: Análise da purificação da lipocalina por SDS-PAGE 15%.....	37
FIGURA 19: Análise da purificação da lipocalina por Dot Blot.....	37
FIGURA 20: Seqüência de aminoácidos do pico 5.....	38
FIGURA 21: Determinação da atividade serino-proteásica da lipocalina nativa.....	38

LISTA DE TABELAS

TABELA I - Isotipos dos anticorpos monoclonais	29
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

BBP – Proteína Ligadora de Bilina

DAB – Diaminobenzidina

D-MEM – Meio Eagle Modificado por Dulbecco's

ELISA – Ensaio Imunoenzimático

FbDP – Produtos da Degradação da Fibrina

FgDP – Produtos da Degradação do Fibrinogênio

FXIII – Fator XIII da Cascata de Coagulação Sangüínea

FXIIIa – Fator XIIIa da Cascata de Coagulação Sangüínea

HAT – Hipoxantina, Aminopterina e Timidina

Ig – Imunoglobulina

IL – Interleucina

i.p. – Intraperitoneal

LOPAP – *Lonomia* obliqua Prothrombin Activator

mAb – Anticorpo Monoclonal

NO – Óxido Nítrico

NP – Nitroforina

OPD – Ortofenildiamina

PBS – Tampão Salino Fosfato

PBST – Tampão Salino Fosfato com 0,05% de Tween 20

PEG – Polietilenoglicol

PLA2 – Fosfolipase A2

PMSF – Fenilmetil-sulfonil fluoreto;

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo duodecil sulfato de sódio

SFB – Soro Fetal Bovino

RPAI – Inibidores de Agregação do *Rhodnius prolixus*

t-PA – Ativador Tecidual de Plasmina

RESUMO

As lagartas da espécie *Lonomia obliqua* são conhecidas por produzirem proteínas tóxicas que estão associadas a uma severa síndrome hemorrágica em humanos, cujo quadro clínico é caracterizado por distúrbios da coagulação, insuficiência renal aguda, hematúria, sangramentos, dentre outros sintomas. O veneno é constituído por diversos princípios ativos, incluindo atividades pró-coagulantes e fibrinolíticas. Apesar da relevância social e científica desses envenenamentos e do conhecimento sobre a natureza dessas toxinas, as informações sobre as características moleculares do veneno ainda são escassas, o que limita o melhor entendimento das bases moleculares da síndrome hemorrágica e o desenvolvimento de um diagnóstico e de um tratamento mais adequado para os pacientes.

Este trabalho possui dois objetivos: a produção de anticorpos monoclonais contra componentes do veneno de *Lonomia obliqua* e a caracterização parcial da lipocalina isolada.

Inicialmente, foram produzidos hibridomas de acordo com o método proposto por Köhler e Milstein. Os hibridomas positivos foram selecionados por um ensaio de ELISA. Dentre estes, seis foram clonados e suas respectivas linhagens celulares estabelecidas. Líquido ascítico de cada clone foi produzido, purificado e testado por ELISA, *western blotting* e imunoprecipitação. A análise do componente imunoprecipitado pelo anticorpo monoclonal 25DH9 demonstrou que esta é uma molécula pertencente à família das lipocalinas.

Para melhor caracterizar a lipocalina, foi empregado um método de purificação constituído por duas etapas. A atividade serino proteásica da lipocalina purificada foi, então, determinada pela liberação de *p*-nitroanilina após a incubação com BApNA, na presença e na ausência de PMSF.

Em conjunto, os resultados mostraram que o mAb 25DH9 foi capaz de reconhecer o componente mais abundante de extrato de cerdas da *Lonomia obliqua*; o método de purificação empregado isolou de maneira eficiente a lipocalina e sua atividade serino proteásica foi confirmada. Além disso, o anticorpo

monoclonal 25DH9 e os demais anticorpos ainda não caracterizados, assim como a molécula identificada, podem ser ferramentas interessantes no desenvolvimento de *kits* diagnósticos, de um anti-veneno mais específico e no estudo do próprio sistema hemostático.

ABSTRACT

In Southern Brazil, accidental contact with caterpillars of the specie *Lonomia obliqua* leads to a severe hemorrhagic syndrome caused by the toxins produced by these animal. The clinical profile is mainly characterized by coagulation disorders, acute renal failure, hematuria and generalized hemorrhage. The venom is composed of several active principles, including procoagulant and fibrinolytic activities. Even though these accidents constitute a serious social problem in Brazil, little is known about the molecular basis of the envenomation and of the active principles composing the venom. More scientific information is necessary in order to allow a better understanding of this coagulation disorder and to develop proper diagnosis and treatment of the envenomed patients.

The objectives of this work are to produce monoclonal antibodies against *Lonomia obliqua* crude bristles extract and to partially analyze the lipocalin isolated by one of them.

The hybridomas were made in accordance with Köhler and Milstein method (1975). The positive hybridomas were select by ELISA. Six of them were cloned and the cell lines were established. Ascitic fluid of each clone were prepared, purified and tested by ELISA, western blotting and immunoprecipitation assay. The analysis of the component immunoprecipitated by the monoclonal antibody 25DH9 revealed that it belongs to the lipocalin family.

To better characterize the lipocalin, it was purified from the crude bristle extract in a two steps method. The serine protease activity of purified lipocalin was determined by the release of *p*-nitroaniline after the incubation with BApNA in presence and absence of PMSF.

All together, the results showed that the monoclonal antibody 25DH9 is capable to recognize the most abundant component of the venom; the purification method employed efficiently isolated the lipocalin and its serine protease activity was proved. Furthermore, the monoclonal antibody 25DH9 and the others yet not well characterized and the molecule identified may be of interest for the

development of diagnosis kits and of more specific anti-venom serum, as well as for studies of the hemostatic process itself.

1. INTRODUÇÃO:

1.1. Ordem Lepidoptera:

A ordem Lepidóptera (borboletas e mariposas) constitui uma das maiores dentro da classe Insecta contando com mais de 150.000 espécies. Como o próprio nome indica, são insetos que possuem asas recobertas de escamas na fase adulta (*Lepido* = escamas; *ptera* = asa) e corpo vermiforme na fase larval, onde determinadas espécies apresentam cerdas (Pesce & Delgado, 1971).

Morfologicamente, as lagartas de lepidópteros são caracterizadas por um corpo cilíndrico dividido em: cabeça, tórax e abdome. A cabeça é composta pelo aparelho bucal mastigador, onde se destacam mandíbulas fortes; os *stemmata* (estruturas para visão) e as antenas, além de inúmeras cerdas com funções diversas. O tórax é composto, além de outras estruturas, por três pares de pernas verdadeiras. O abdome contém 10 segmentos, dos quais o 9º e o 10º são diferenciados e contém, na maioria das lagartas, quatro pares de pernas falsas, munidas de ganchos que servem para fixação e locomoção (Moraes, 2003).

Internamente, as lagartas são compostas por um sistema digestivo completo, sistema nervoso ventral e coração dorsal. A circulação é feita pelo bombeamento da hemolinfa que percorre todo o inseto. A respiração é do tipo traqueal, com aberturas laterais chamadas espiráculos (Moraes, 2003).

Os lepidópteros se desenvolvem por holometabolia, ou desenvolvimento completo, que consiste em um ciclo biológico caracterizado pelas fases de: ovo – larva (lagarta) – pupa (crisálida) – adulto (imago) (Moraes, 2003).

A maioria dos espécimes desta ordem não é prejudicial ao homem. O aspecto negativo desses insetos está geralmente ligado aos prejuízos à agricultura, uma vez que durante as primeiras fases de seu desenvolvimento são fitofágicos (Pesce & Delgado, 1971).

A importância dos lepidópteros na saúde pública deve-se aos efeitos danosos causados pelo contato de humanos com as cerdas presentes em algumas espécies de lagartas e que contém toxinas. A esses acidentes dá-se o

nome de erucismo (*eruca* = larva). O perfil clínico resultante pode variar desde uma simples queimação no local do contato até um quadro de hemorragia intensa, dependendo da espécie envolvida e do estado físico da vítima (Pesce & Delgado, 1971).

No Brasil, já na época da colonização, o padre Anchieta citou, na “Carta de São Vicente” de 1560, o medo dos índios frente a algumas lagartas que causavam acidentes, produzindo inúmeras reações e dor intensa após o contato físico (Rotberg, 1971; Costa, 1994). Esses animais eram chamados de “tatá-raná”, nome que em Tupi-Guarani significa “como fogo” ou “semelhante ao fogo”; mais tarde este nome originou, na língua portuguesa, a palavra “taturana”. Em artigo intitulado “Estudo Biológico das Lagartas Urticantes ou Tatoranas” publicado nos Annaes Paulistas de Medicina e Cirurgia em 1914, Rodolpho von Lhering descreveu características morfológicas e histológicas de algumas lagartas brasileiras, bem como os efeitos causados pelos respectivos venenos sobre o organismo humano, citando inclusive os estudos realizados por Marcgrave e Piso, publicados nas duas edições da “Historia Naturalis Brasiliae”, de 1648 e 1658. Um dos casos relatados, ocorrido em 1912 (também citado por Rotberg, 1971 e por Costa, 1994), envolvia um paciente que, após o contato com uma colônia de 28 lagartas desconhecidas, passou a apresentar – além dos sintomas já conhecidos de acidentes com outras espécies – saliva sangüinolenta e hematúria, sintomas característicos de distúrbios no sistema hemostático, os quais duraram cerca de 3 dias. As lagartas que causaram esse acidente não foram, todavia, identificadas na época. Apesar do artigo de von Lhering ser uma obra de extrema utilidade para os estudos atuais, o conhecimento científico da época – bem como a metodologia disponível para ser utilizada – limitavam sobremaneira o aprofundamento dos estudos sobre a ação desses venenos no organismo humano.

No final da década de 60 surgiram as primeiras publicações relatando casos de envenenamento por contato com lagartas do gênero *Lonomia* na América do Sul, mais especificamente com a espécie *Lonomia achelous* na Venezuela (Arocha-Piñango, 1967), enquanto no Brasil os primeiros relatos datam do final da década de 80, envolvendo a espécie *Lonomia obliqua*, no sul do país (Duarte *et al.*, 1990). As vítimas, após contato com o animal,

apresentavam distúrbios na coagulação sangüínea semelhantes àqueles descritos no trabalho de von Lhering.

1.2. Espécie *Lonomia obliqua*:

Segundo Stehr (1987), a espécie *Lonomia obliqua* está classificada na ordem Lepidoptera, subordem Ditrysia, superfamília Bombycoidea, família Saturniidae.

Esta espécie possui um ciclo biológico de 185 dias em média, sendo altamente dependente do clima da região. Os insetos adultos (mariposas) vivem de 7 a 10 dias os quais não se alimentam e são destituídos de qualquer toxicidade. Ainda nesta fase, apresentam dimorfismo sexual: a mariposa fêmea é maior e de coloração pardo-rosado enquanto a mariposa macho é menor e mais amarelada, com tonalidades fortes. Em comum, possuem uma listra transversal sobre as asas que pode ser utilizada na identificação do inseto (Lorini, 1999).

A cópula ocorre geralmente à noite, devido ao hábito noturno desses insetos, e após o acasalamento, as mariposas fêmeas fazem a ovoposição sobre o tronco da árvore hospedeira. O período de incubação dos ovos pode variar de 17 a 30 dias. Após esse período, as larvas eclodem e entram no que se conhece como 1º instar. Nesse período se alimentam constantemente até atingirem o tamanho máximo desse período. Sempre antes de passarem para o próximo instar, cessam a alimentação e tornam-se imóveis por algum tempo para que haja a muda, ou seja, a formação do novo tegumento, agora maior e de coloração modificada (Moraes, 2003). As mudas vão-se realizando seqüencialmente até o 6º instar, onde, podem atingir cerca de sete centímetros de comprimento. Ao final deste, a lagarta entra na fase de pupa e permanece em dormência sob restos vegetais durante o inverno até os meses mais quentes, quando emergem as mariposas reiniciando o ciclo (Lorini, 1999).

Quanto à morfologia, as lagartas nos estágios finais são caracterizadas por um corpo revestido dorsal e lateralmente com cerdas ramificadas no seu ápice. Sua coloração é verde claro na base e preto no ápice, sendo em número de seis por segmento do corpo do inseto. A coloração do corpo é marrom, com

três listras longitudinais, sendo uma dorsal de coloração marrom-escuro e duas laterais de cor amarela. Em cada segmento há, ainda, uma mancha branca. A cabeça é saliente e de coloração marrom-clara, com um septo marrom-escuro na parte superior e peças bucais bastante salientes (Fraiha *et al.*, 1986; Duarte *et al.*, 1990).

Durante o período larval a *Lonomia obliqua* possui um hábito gregário, vivendo em colônias com mais de 50 indivíduos sobre o tronco de diversas árvores – como ipê, araticum, abacateiro, goiabeira, pessegueiro e amoreira – de cujas folhas se alimentam. À noite sobem aos galhos mais altos para se alimentarem e durante o dia permanecem agrupadas nas partes mais baixas e sombreadas dos troncos das árvores, o que facilita a ocorrência dos acidentes, os quais ocorrem quando uma pessoa encosta no tronco sem notar a presença das lagartas (Lorini, 1999).

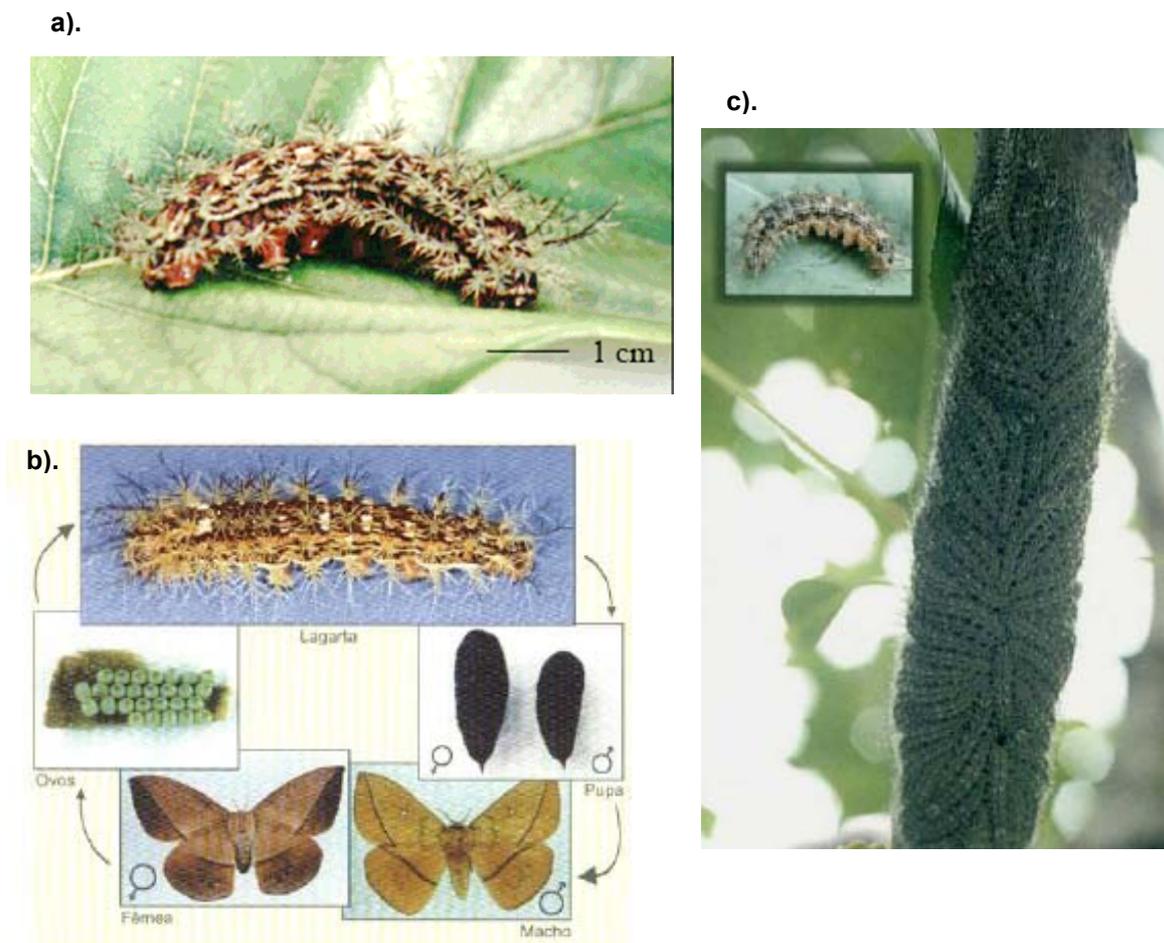


Figura 1. *Lonomia obliqua*. (a) Larva de sexto instar; (b) ciclo de vida (CIT/RS); (c) grupo de lagartas sobre o tronco de uma árvore (Lorini, 1999).

Diversos estudos consideram que o hábito gregário em insetos é uma resposta adicional para acentuar a existência de outras formas de defesa, geralmente morfológicas (espículas) ou químicas (toxinas de base protéica) apresentadas por estes organismos. O mimetismo é, também, um mecanismo de defesa adicional para essas espécies, uma vez que estas estão sujeitas a uma maior exposição física do que os animais de hábito isolado, aumentando assim o risco de se tornarem presas fáceis. A combinação destas defesas permite que uma espécie explore ambientes de risco ou de grande exposição, como por exemplo, a superfície de troncos e folhas (Bücherl, 1971; Vulinec, 1990).

A *Lonomia obliqua* demonstra possuir todos esses mecanismos, pois, além do mimetismo observado nas lagartas quando agrupadas, ainda possuem espículas e produzem uma secreção protéica capaz de interferir no sistema hemostático de mamíferos, levando a uma desordem hemorrágica severa, inclusive em humanos. A produção e a atividade deste veneno são dependentes do estágio em que o espécime se encontra (Cardoso, 1992; Marval *et al.*, 1999), sendo mais agressivo nos estágios finais (4-6) (Seibert *et al.*, 2004).

Acidentes envolvendo humanos eram considerados raros no Brasil até 1989, quando uma alta incidência de casos hemorrágicos, conseqüentes do contato com a *Lonomia obliqua*, foram registrados na região sul do país e tornaram-se um problema de saúde pública (Duarte *et al.*, 1996). No Rio Grande do Sul, por exemplo, as lagartas podem ser encontradas mesmo em áreas urbanas. Dados do Centro de Informação Toxicológica do Rio Grande do Sul mostram que, entre os anos de 1998 e 2002, ocorreram mais de 688 casos de envenenamento, incluindo uma morte, apenas neste estado (RS. SES. FEPPS., 2002).

É provável que a alta incidência de casos no sul do país deva-se ao desflorestamento da região, que compeliu esses insetos para a vizinhança de fazendas locais, combinado a diminuição no número dos predadores naturais (Diptera, Tachinidae e Hymenoptera) desta espécie, o que permitiu um aumento em sua população (Lorini, 1999).

Recentemente, no entanto, novos casos de acidentes envolvendo a *Lonomia obliqua* foram reportados em São Paulo (Fan *et al.*, 1998) e Rio de Janeiro (Corrêa *et al.*, 2004).

1.2.1. Maquinaria de Produção e Inoculação do Veneno:

Como dito anteriormente, estudos acerca da morfologia e histologia da *Lonomia obliqua* (Veiga *et al.*, 2001) demonstraram um tegumento complexo constituído por uma grande quantidade de cerdas altamente organizadas, além de outras especializações. Não há uma glândula secretora única e sim um epitélio secretor do qual cada cerda é formada, como uma invaginação do corpo. Determinadas regiões deste tecido contêm células diferenciadas. As dobras observadas em sua lâmina basal parecem ser uma forma de aumentar a absorção de substâncias primárias. Estas são processadas no interior das células diferenciadas, levando à produção do veneno. A secreção é acumulada na forma de grânulos no espaço extracelular entre a barreira epitelial e a cutícula. Os grânulos acumulados podem ser liberados dentro de um canal interno que percorre o interior da cerda (Figura 2).

O veneno é inoculado somente após o contato da pele do indivíduo com as cerdas do inseto. Uma vez que não apresenta poros, a ponta da cerda (tip) deve ser quebrada na articulação (Figura 3), permitindo que o veneno percorra o canal interno e atinja a pele da vítima. Eventualmente, a lagarta pode ser esmagada durante o acidente. Nestes casos, como a cutícula do inseto é quebrada, muitas secreções, incluindo a hemolinfa, penetram pela pele da vítima e entram na sua circulação (Veiga *et al.*, 2001).

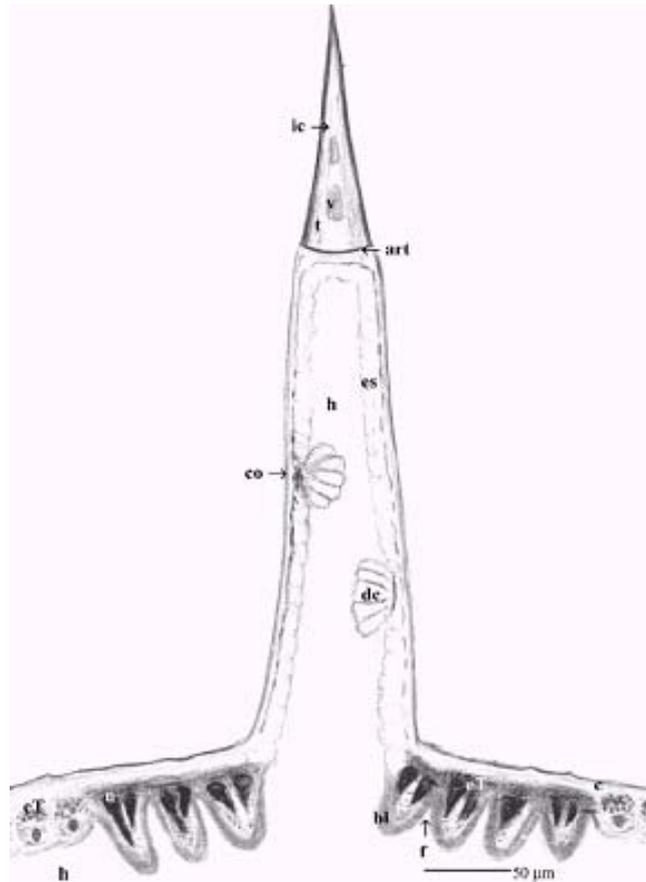


Figura 2: MODELO ESQUEMÁTICO DO SISTEMA ENVOLVIDO NA PRODUÇÃO E INOCULAÇÃO DO VENENO DA *Lonomia obliqua*. **h:** hemolinfa; **bl:** lâmina basal; **f:** dobras do epitélio; **eT:** epitélio na base do tegumento; **c:** cutícula; **n:** núcleo das células epiteliais; **dc:** grupo de células diferenciadas na cerda; **co:** grânulos coalescentes; **es:** epitélio da cerda; **art:** articulação; **ic:** canal interno da cerda (**t**) que contem o veneno (**v**). (Veiga *et al*, 2001)

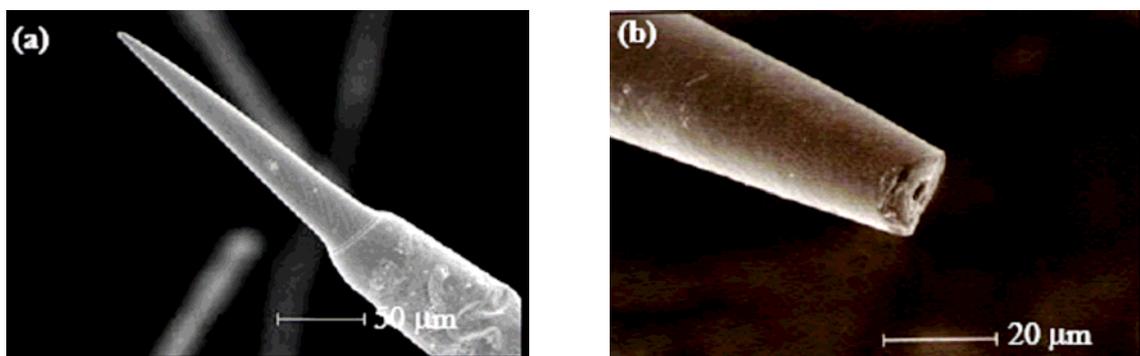


Figura 3. ULTRAESTRUTURA DO TEGUMENTO DE *LONOMIA obliqua*. Em (a), espícula íntegra; em (b), espícula quebrada na articulação, com canal interno exposto (Veiga *et al.*, 2001).

Baseando-se na morfologia das cerdas da *Lonomia obliqua*, vale salientar a diferença entre a ação defensiva destes insetos e o quadro de envenenamento causado por outros animais peçonhentos, tais como escorpiões, aranhas e serpentes. Nestes casos, as substâncias tóxicas, e também de natureza protéica, quando inoculadas nas vítimas, funcionam como mecanismo de apreensão das presas e, posteriormente, como adjuvantes na sua digestão. Há, portanto, nestes animais, uma relação morfológica e fisiológica entre o aparelho produtor do veneno e os aparelhos digestivo e salivar. Já na *Lonomia obliqua*, assim como nas vespas, abelhas e em alguns animais marinhos, a produção do veneno não está relacionada à obtenção do alimento ou à sua digestão, se prestando apenas à defesa do espécime. Assim, não há relação entre os sistemas digestivo / salivar e a produção do veneno (Bücherl, 1971; Marval *et al.*, 1999).

1.2.2. Lonomismo:

Lonomismo, nome dado à síndrome causada pelo envenenamento por *Lonomia obliqua*, possui sintomas clínicos muito similares àqueles observados após o envenenamento por *Lonomia achelous*, espécie encontrada na Venezuela e na região norte do Brasil (Arocha-Piñango & Guerrero, 2001). A severidade dos casos, em geral, é dependente do número de lagartas envolvidas no acidente, o estágio em que elas encontram-se, a extensão da área afetada na vítima e seu estado imunológico (Vulinec, 1990).

Os sintomas iniciais compreendem dor em queimação, hiperemia, inflamação e formação de edema no local do contato, enxaqueca, náusea e vômitos (Kelen *et al.*, 1995; Duarte *et al.*, 1996; Zannin *et al.*, 2003; Caovilla & Barros, 2004). Normalmente, seguem-se reações sistêmicas associadas a uma severa coagulopatia e a sangramentos disseminados. O diagnóstico proposto para os casos de envenenamento por *Lonomia obliqua* baseia-se na observação de hemorragias subcutâneas e generalizadas, incluindo sangramentos na pele, mucosas e vísceras, hematomas, hematuria, gengivorragia, equimosis, epistaxia e melena (Kelen *et al.*, 1995; Zannin *et al.*, 2003; Caovilla & Barros, 2004; Corrêa *et al.*, 2004). Tais sintomas ocorrem

durante as 12 primeiras horas após o acidente (Fan *et al.*, 1998; Zannin *et al.*, 2003). Complicações maiores, como sangramento intracerebral e, principalmente, falência renal aguda podem ocorrer levando a vítima à morte. A falência renal aguda é uma manifestação relativamente freqüente em pacientes envenenados por *Lonomia obliqua*, porém rara naqueles envenenados por *Lonomia achelous* (Duarte *et al.*, 1990; Burdmann *et al.*, 1996; Arocha-Piñango & Guerrero, 2003). Sua patogenia ainda não foi totalmente elucidada, no entanto, é provável que seja resultado da deposição de fibrina nos glomérulos e isquemia renal (Fan *et al.*, 1998) (Figura 4).

Um estudo realizado em 2003 (Zannin *et al.*, 2003) avaliou a coagulação e a fibrinólise em 105 pacientes que tiveram contato com a *Lonomia obliqua*. Em geral, os pacientes apresentaram um tempo prolongado de coagulação geral, com tempos elevados de protrombina (PT), tromboblastina parcial ativada (APTT) e trombina (TT).

Nas primeiras horas após o envenenamento observou-se uma alta produção dos marcadores da ativação da coagulação: a protrombina F1+2 e o complexo trombina – antitrombina, o que provavelmente resultou na geração de trombina nos pacientes envenenados. Níveis extremamente altos de dímeros D foram encontrados em todos os casos, indicando coagulação intravascular disseminada. Em contradição, neste mesmo período, foi observada uma diminuição significativa nos níveis de plasminogênio e α 2-antiplasmina. Tal redução, associada à alta concentração de dímeros D, indicam intensa fibrinólise.

Em seguida, observou-se um decréscimo na concentração do fibrinogênio na maioria dos pacientes, fato que foi diretamente associado aos episódios de sangramento. Uma diminuição significativa nos níveis dos fatores V, XIII e VIII, precalicreína (PK) e proteína C também foram observadas quando o fibrinogênio foi depletado.

Em conjunto, esses dados indicam que o envenenamento por *Lonomia obliqua* resulta em um círculo vicioso, onde há ativação do sistema de coagulação sangüínea ao mesmo tempo em que ocorre a fibrinólise. Assim, há um intenso consumo dos fatores coagulopáticos, tornando o sangue de vítima incoagulável.

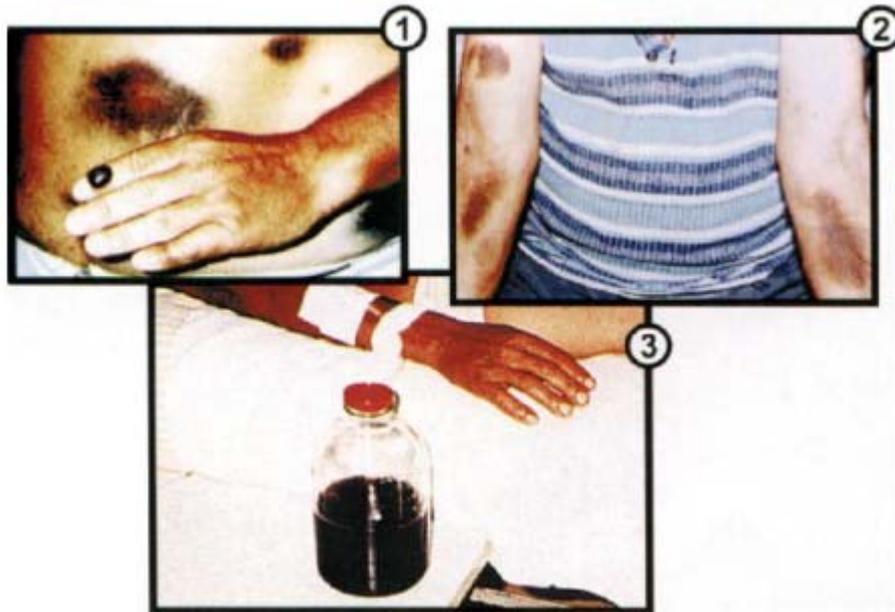


Figura 4. QUADRO CLÍNICO RESULTANTE DO ENVENENAMENTO POR *Lonomia obliqua*. Em (1) e (2), hematomas, hemorragias e bolhas de sangue decorrentes do contato físico com a lagarta; em (3), urina do paciente. (Abella *et al.*, 1998).

Quando os primeiros acidentes com *Lonomia obliqua* surgiram no Brasil o tratamento adotado foi o mesmo ao aplicado para o envenenamento por *Lonomia achelous* devido à similaridades nos quadros clínicos. Baseava-se, então, na administração de substâncias antifibrinolíticas (aprotinina e ácido - e - amino capróico) associada a transfusões de sangue total, plasma ou crioprecipitados. No entanto, o quadro de coagulação das vítimas brasileiras era acentuado após a administração destas drogas (Silva, *et al.*, 1996).

Estudos subseqüentes revelaram que o veneno de cada uma destas espécies era constituído por proteínas com especificidades distintas. Enquanto a hemorragia causada pelo veneno da *Lonomia achelous* era devido à ação de enzimas de degradação do fator XIII e de proteínas ativadoras da atividade fibrinolítica, aquela causada pelo veneno da *Lonomia obliqua* estava relacionada, principalmente, a uma coagulopatia destrutiva induzida por proteínas procoagulantes, como descrito anteriormente. Logo, a terapia utilizada foi direcionada de maneira específica para cada espécie envolvida (Fritzen *et al.*, 2003).

Nos últimos anos, o Instituto Butantan, São Paulo, Brasil, tem desenvolvido um soro antilonômico para o tratamento específico do envenenamento causado pelo contato com a *Lonomia obliqua* (Silva *et al.*, 1996; Rocha-Campos *et al.*, 2001). O anti-veneno é obtido pela imunização de cavalos com o extrato de cerdas da lagarta, o que leva à produção de anticorpos IgG específicos. O soro, composto por F(ab')₂ purificados, mostrou ser efetivo na reversão dos distúrbios hemostáticos, nos sangramentos observados em humanos e em modelos animais envenenados pela *Lonomia obliqua* (Silva *et al.*, 1996). Desde que o anti-veneno foi padronizado e começou a ser produzido em larga escala, o tratamento das vítimas é baseado na sua administração (Rocha-Campos *et al.*, 2001).

Em 2003, Zannin *et al* demonstrou que o diagnóstico precoce e o tratamento adequado, principalmente nas primeiras 12 horas, eram capazes de prevenir o quadro de coagulopatia severa na maioria dos casos. No entanto, por não existirem métodos de diagnóstico específico para acidentes com a *Lonomia obliqua*, ainda ocorre o tratamento inadequado das vítimas, principalmente, nos estados onde a ocorrência desta espécie é recente (Moraes, 2003).

1.2.3. Componentes do veneno de *Lonomia obliqua*:

O veneno da *Lonomia obliqua* tem sido intensivamente estudado a fim de identificar seus constituintes e o mecanismo de atuação de cada um deles na síndrome observada. No entanto, até recentemente, apenas três atividades haviam sido descritas: a). Uma atividade fibrinogênica, por ação de uma protease denominada lonofibrase (Pinto *et al.*, 2004); b). Uma atividade procoagulante, por ação de duas enzimas, uma ativadora de Fator X, a LOSAC (*Lonomia obliqua* Stuart-factor activator), e outra ativadora de protrombina, conhecida como LOPAP (*Lonomia obliqua* Prothrombin Activator Protease) (Reis *et al.*, 2001); e c). Uma atividade fosfolipásica, por ação de uma fosfolipase A2 símile, a lonomiatoxin (Arocha-Piñango *et al.*, 2000).

A necessidade por maiores informações acerca dos constituintes moleculares do veneno levou a construção de uma biblioteca de cDNA a partir

de extratos do tegumento e das cerdas da lagarta, tecidos potencialmente envolvidos no envenenamento (Veiga *et al.*, 2005). Dentre os grupos constituintes mais representativos, foram identificados serino proteases, inibidores de proteases, fosfolipases A2 e lipocalinas.

Serino Proteases de veneno de *Lonomia obliqua*:

Serino proteases podem ser encontradas em microrganismos, plantas e animais, estando envolvidas nos mais diversos processos fisiológicos. Especificamente no veneno da *Lonomia obliqua*, este grupo abrange a maioria dos constituintes já identificados, como a LOPAP, a LOSAC, enzima ativadora de Fator X Ca^{2+} - independente e a Lonofibrase (Veiga *et al.*, 2005).

LOPAP é o componente melhor estudado do veneno de *Lonomia obliqua*. É uma proteína tetramérica de 69 kDa que possui uma atividade ativadora de protrombina, independente dos constituintes do complexo protrombinase, embora íons de cálcio aumentem esta atividade (Reis *et al.*, 2001). A proteína purificada ativa a protrombina de maneira dose-dependente e seu mecanismo de ação é similar ao do fator Xa, gerando trombina, sendo esta capaz de ativar fibrinogênio purificado.

A infusão da LOPAP em ratos causa uma coagulopatia similar àquela observada no envenenamento humano (Reis *et al.*, 2004), indicando que esta pode ser a principal toxina responsável pelo severo quadro hemorrágico encontrado nos pacientes envenenados pela *Lonomia obliqua*.

Ao lado de sua atividade pró-coagulante, a LOPAP tem ação sobre a resposta de células endoteliais, estimulando um aumento na produção de interleucina 8 (IL8), ICAM-1 e E-selectina. Além disso, é capaz de induzir a produção de óxido nítrico e prostaciclina, ambos potentes vasodilatadores e inibidores da ativação plaquetária. A LOPAP afeta, ainda, a viabilidade das células endoteliais e possui um efeito inibitório sobre a morte celular, fato possivelmente relacionado à liberação de óxido nítrico (Chudzinski-Tavassi *et al.*, 2001; Fritzen *et al.*, 2005).

As atividades da LOPAP são inibidas pelo soro antilonômico e por inibidores de serino proteases como PMSF (Reis *et al.*, 1999; Reis *et al.*, 2001).

A LOSAC é constituída por uma única cadeia polipeptídica de 43 kDa, sendo o primeiro ativador de fator X purificado a partir de uma secreção de lepidópteros. Esta enzima é capaz de ativar o fator X, de maneira dose-dependente, porém independente de íons cálcio, formando, assim, o fator Xa, que integra o complexo protrombinase (Seibert *et al.*, 2003).

O sequenciamento parcial de sua estrutura demonstrou que a LOSAC não possui nenhuma similaridade com outros ativadores de fator X conhecidos (Chudzinski-Tavassi & Carrijo-Carvalho, 2006).

A lonofibrase possui uma massa molecular estimada em 35 KDa. É considerada uma típica enzima α -fibrinogenase, similar à encontrada no veneno de *Lonomia achelous* ou em alguns venenos ofídicos (Markland, 1997). A presença de uma enzima com este perfil de ação no veneno da *Lonomia obliqua* possivelmente aumenta o consumo dos componentes da coagulação sanguínea através da degradação seletiva do fibrinogênio, resultando, assim, na hemorragia grave observada (Pinto *et al.*, 2004).

Veiga *et al* (2005) propuseram um modelo (Figura 5) no qual integram os mecanismos de ação da enzima ativadora de Fator X, da LOPAP e da lonofibrase. Segundo este modelo, a enzima ativadora de Fator X e a LOPAP, através da ativação do fator X e da protrombina, respectivamente, levariam à geração de trombina e formação de fibrina (Donato *et al.*, 1998). A fibrina, após fazer uma ligação cruzada com fator XIIIa de maneira trombina-dependente, é, então, degradada pela plasmina formando, conseqüentemente, dímeros D. Além disso, a lonofibrase, ao agir sobre fibrinogênio e fibrina, gera FgDP (Produtos da Degradação do Fibrinogênio) e FbDP (Produtos da degradação da Fibrina). Tais fatos poderiam explicar parcialmente o consumo dos componentes da coagulação sangüínea assim como as altas concentrações de FgDP e FbDP no sangue das vítimas do envenenamento.

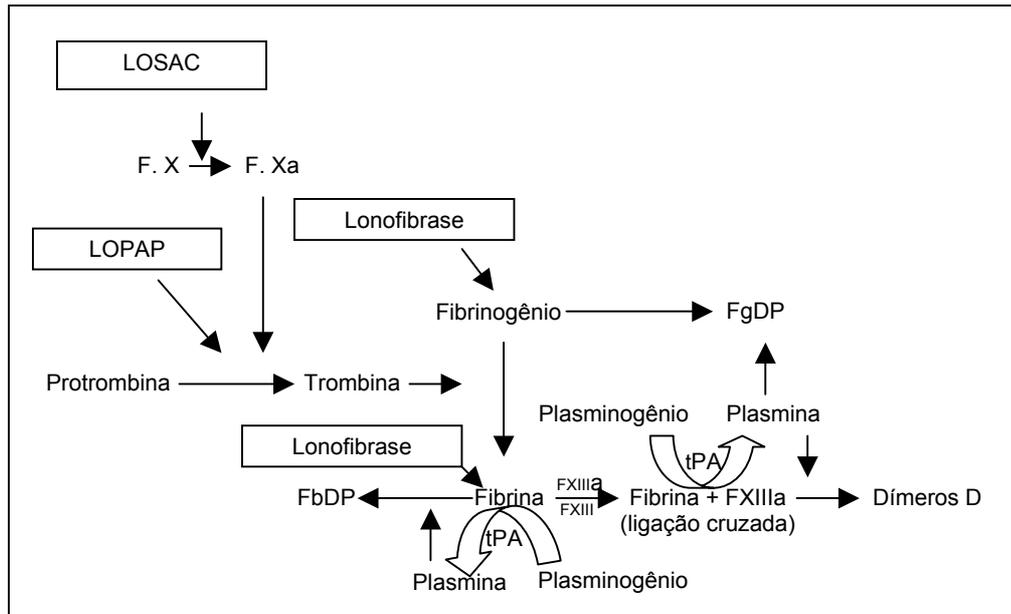
(Adaptado de Veiga *et al.*, 2005)

Figura 5: MODELO DE AÇÃO DAS TOXINAS LOPAP, ENZIMA ATIVADORA DE FATOR X E LONOFIBRASE.

Inibidores de Proteases:

Insetos e outros artrópodes são fontes ricas de inibidores de proteases, como os inibidores de serino proteases ou serpinas (Kanost *et al.*, 2004). As serpinas são normalmente encontradas na hemolinfa e sua função varia desde a proteção do organismo contra a infecção por patógenos ou parasitas até a regulação de processos fisiológicos (Kanost *et al.*, 2004). Em insetos hematófagos, também podem participar no processo de alimentação por inibir a trombina ou outros fatores de coagulação (Campos *et al.*, 2004). Os inibidores de proteases encontradas no veneno em questão podem ter efeitos parecidos com os descritos anteriormente, afetando, assim, fatores da coagulação sanguínea humana (Veiga *et al.*, 2005).

Fosfolipases A₂ (PLA₂):

Fosfolipases A₂ estão presentes em quase todos os venenos animais. A PLA₂ promove a hidrólise de fosfolipídios com a geração de ácidos graxos livres e lisofosfolipídios, resultando, indiretamente na hemólise. Ainda é capaz de inibir a coagulação sanguínea, ou pela interação direta com fatores do sistema hemostático ou pela degradação de fosfolipídios envolvidos nos complexos de coagulação. Além disso, possuem efeitos deletérios sobre a agregação plaquetária e efeitos neurotóxicos, cardiotoxicos e miotóxicos (Kini, 2003).

O representante melhor caracterizado deste grupo é a lonomiatoxin, uma fosfolipase A₂ símile de 20 KDa. Esta molécula parece estar envolvida na hemólise de eritrócitos humanos e murinos, assim como na hemólise intravascular em ratos, fatos observados por estudos *in vitro* com o extrato bruto de cerdas (Seibert *et al.*, 2004).

Lipocalinas:

As lipocalinas fazem parte de uma família de proteínas encontradas nos mais diversos reinos. São moléculas de tamanho pequeno, constituídas de resíduos com 160-180 aminoácidos. Entre si, as diferentes lipocalinas apresentam baixa homologia de seqüência, porém alta similaridade quanto à sua estrutura terciária. Esta corresponde a uma estrutura tipo barril β que consiste em oito folhas- β -antiparalelas dispostas de forma cilíndrica (Flower, 1995).

Realizam funções de estoque e transporte de compostos poucos solúveis ou quimicamente sensíveis, tais como vitaminas, esteróides e produtos metabólicos (Flower, 1995).

Um número significativo de lipocalinas age na coloração de invertebrados, ligando-se a pigmentos encontrados nestes animais e formando complexos estáveis de lipocalina-pigmento (Kayser, 1985). Dentre os pigmentos mais comuns encontra-se a bilina. A função dessas “Proteínas Ligadoras de Bilina” permanece incerta; além de seu papel na estabilidade dos

pigmentos, foi sugerido que esses complexos podem agir em fotorrecepção e na proteção contra radicais livres foto-induzidos (Kayser, 1985). Dentre as lipocalinas que apresentam este perfil, as melhor estudadas são a insecticianina, proveniente da *Manduca sexta* (Riley *et al.*, 1984), e a Proteína Ligadora de Bilina (BBP), isolada da espécie *Pieris brassicae* (Huber, 1987). Ambas as moléculas encontram-se em tetrâmeros quando em solução e assumem a coloração azulada ao formarem complexos com a γ -biliverdina IX. Tanto suas seqüências quanto suas estruturas cristalográficas já foram determinadas, confirmando a hipótese de que são proteínas equivalentes provenientes de fontes diferentes (Riley *et al.*, 1984; Huber, 1987).

Outra fonte riquíssima de lipocalinas são os insetos hematófagos. Um exemplo é a espécie *Rhodnius prolixus*, conhecido popularmente como barbeiro, inseto vetor do *Trypanossoma cruzi*, responsável pela Doença de Chagas. Estudos utilizando a saliva deste inseto identificaram nove proteínas das quais sete são lipocalinas (Montfort *et al.*, 2000). Estas proteínas foram divididas em dois grupos para simplificar seu entendimento.

O primeiro grupo consiste em quatro lipocalinas que contêm o grupamento heme ligado à sua região hidrofóbica. São chamadas Nitroforinas (NP) e podem ser de diferentes tipos (NP1, NP2, NP3 e NP4). As funções melhor caracterizadas das nitroforinas são a de estoque e transporte de óxido nítrico (NO), o qual, ao ser liberado no local da picada, favorece o relaxamento muscular e a vasodilatação (Montfort *et al.*, 2000; Ribeiro *et al.*, 2004). Os quatro tipos de nitroforinas são também capazes de se ligar às moléculas de histamina, impedindo sua função de mediadora da inflamação em casos de lesão tecidual. Tanto o óxido nítrico quanto a histamina ligam-se especificamente ao grupamento heme presente nas nitroforinas. Vale salientar uma terceira atividade apresentada somente pela NP2 (ou Prolixina-S). Esta molécula é capaz de agir na via intrínseca da coagulação sangüínea da vítima, inibindo a conversão do fator X em fator Xa. O processo de conversão é naturalmente realizado pelo "Complexo fX Quinase", constituído pelos fatores IXa (fIXa), VIIIa (fVIIIa) e X (fX), reunidos em uma superfície fosfolipídica. O mecanismo exato pelo qual a NP2 exerce esta inibição ainda é incerto, porém foi proposto que tal molécula impede a ligação dos fatores IXa e VIIIa ao esqueleto fosfolipídico de maneira heme-independente (Gudderra *et al.*, 2005).

O segundo grupo de lipocalinas presentes na saliva do *Rhodnius prolixus* age na agregação plaquetária. Tais moléculas são denominadas Inibidores de Agregação do *Rhodnius prolixus* (ou RPAI) e podem ser de três tipos: RPAI1, RPAI2 e RPAI3. Não possuem um grupamento heme em sua estrutura e seu mecanismo de ação baseia-se na inibição da agregação plaquetária mediada por colágeno (Montfort *et al.*, 2000).

Os exemplos de lipocalinas citados anteriormente têm sua função baseada, principalmente, na capacidade destas proteínas em formarem complexos com outras moléculas. Apesar de raras, existe, porém, um grupo de lipocalinas que apresentam atividade enzimática. O representante melhor estudado deste grupo é a prostaglandina D2 Sintase. Esta enzima é responsável pela síntese de prostaglandina D2 no cérebro de mamíferos e é distinta físico e imunologicamente de outras moléculas sintetizadoras de prostaglandinas encontradas nos demais tecidos. A enzima purificada encontra-se na forma de monômero e possui uma massa molecular estimada em aproximadamente 27 KDa (Irikura *et al.*, 2003). Outros exemplos de lipocalinas com atividade enzimática são a violaxantina e a zeaxantina desoxidase, enzimas que catalisam interconversões carotenóides (Hieber *et al.*, 2000); a lipocalina lacrimal e a β -lactoglobulina, ambas com atividade nucleásica (Yusifov *et al.*, 2000).

A lipocalina encontrada no extrato bruto de cerdas da *Lonomia obliqua* já foi seqüenciada. No entanto, sua função ainda é incerta e gera controvérsias, assim como a função de inúmeras outras moléculas presentes neste veneno.

2. JUSTIFICATIVA:

O contato da pele de humanos com as cerdas da lagarta *Lonomia obliqua* resulta em uma síndrome caracterizada pelo consumo dos componentes do sistema de coagulação sangüínea e pela fibrinólise secundária, além de outros efeitos locais ou conseqüentes da perda da hemostasia. A pequena quantidade de veneno envolvida no processo de intoxicação, quando comparada com a intensidade e variedade dos efeitos causados, sugere que os componentes deste veneno podem atuar sobre os sistemas fisiológicos da vítima e os transformar em poderosos mecanismos amplificadores de ação farmacológica. Logo, o estudo destes componentes é extremamente importante no entendimento da síndrome do envenenamento como um todo.

Baseando-se nestes fatos, anticorpos monoclonais específicos representam ferramentas úteis não apenas no isolamento dos constituintes do veneno, como também podem ser utilizados em diversos estudos imunquímicos da fisiopatologia e no desenvolvimento de *kits* para imunodiagnóstico.

Além disso, o pouco conhecimento acerca da lipocalina presente neste veneno desperta grande interesse, principalmente por se tratar de um dos componentes majoritários do mesmo. Logo, a compreensão de sua função poderia ajudar na elucidação da síndrome decorrente do envenenamento e sugerir a possibilidade de utilização desta molécula para o diagnóstico específico.

3. OBJETIVO:

3.1. Objetivos Gerais:

1. Produzir anticorpos monoclonais contra componentes do veneno de *Lonomia obliqua*.
2. Caracterizar parcialmente a lipocalina isolada a partir do mesmo.

Objetivos Específicos:

- Produzir anticorpos monoclonais veneno-específico;
- Determinar os isotipos dos anticorpos produzidos;
- Isolar e identificar os componentes do veneno reconhecidos pelos anticorpos;
- Purificar a lipocalina a partir do extrato bruto de cerdas da *Lonomia obliqua*;
- Determinar a possível atividade enzimática da lipocalina isolada.

4. MATERIAL E MÉTODOS:

Veneno:

O extrato bruto das cerdas da lagarta *Lonomia obliqua*, usado no Instituto Butantan para a produção de soro anti-lonômico, foi gentilmente cedido por esta instituição.

Animais:

Foram utilizados um total de cinquenta camundongos BALB/c de ambos os sexos, de idade variável e pesando aproximadamente 20 g. Estes animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual Norte Fluminense. Todos os animais foram mantidos sob as mesmas condições e utilizados segundo as normas institucionais de boas práticas para a manipulação de animais em experimentação.

Produção de Anticorpos Monoclonais:

Imunização:

Foram injetados 20 μ L (1 mg/mL) do extrato bruto das cerdas associados a 100 μ L de hidróxido de alumínio e a 100 μ L de PBS¹ pela via intraperitoneal em cada camundongo BALB/c utilizado. Duas semanas após a primeira imunização, os animais receberam reforços semanais (sem alterações no conteúdo injetado) durante 40 dias.

Fusão:

Células provenientes do baço de camundongos imunizados foram fundidas com células de mieloma NSO utilizando-se polietilenoglicol (PEG) 4000 (Gibco BRL, EUA), segundo metodologia descrita por Köhler e Milstein (1975). Após a fusão, as células foram ressuspensas em meio DMEM-F12 (Gibco BRL, EUA) contendo soro fetal bovino (SFB) 10%, gentamicina (Gibco BRL, EUA) 20 $\mu\text{L}/\text{mL}$, β 2-mercaptoetanol 50 μM e agente seletivo HAT (Hipoxantina, Aminopterina e Timidina) 50X (Sigma Chemical Co, EUA). A suspensão celular foi semeada em placas de 96 poços (Corning, EUA) que continham previamente uma monocamada de células peritoniais de camundongos BALB/c, de modo que a concentração de células em cada poço fosse 2×10^5 células. As placas foram incubadas em estufa a 37°C com CO_2 a 5% e observadas diariamente ao microscópio óptico invertido (Axiovert 135M Zeiss, Alemanha) para acompanhar o crescimento de colônias de células.

Seleção dos Hibridomas Anti-Extrato Bruto de Cerdas da *Lonomia obliqua*:

Quando as colônias de hibridomas atingiram aproximadamente 300 células, os respectivos sobrenadantes foram centrifugados por 5 minutos a 500g e ensaiados através do teste de ELISA para a detecção de anticorpos anti-componentes do extrato bruto de cerdas da *Lonomia obliqua*.

Ensaio Imunoenzimático (ELISA) dos Sobrenadantes dos Hibridomas:

O teste ELISA foi realizado utilizando-se 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de extrato bruto das cerdas de *Lonomia obliqua* diluído em tampão carbonato/bicarbonato³ 0,05 M, pH 9,6 (60 $\mu\text{L}/\text{poço}$) para sensibilização das placas utilizadas e incubação durante a noite a 4°C. Após a adsorção do antígeno, as placas foram lavadas com PBST² e bloqueadas com gelatina a 1% (150 $\mu\text{L}/\text{poço}$) diluída em PBS por uma hora, a temperatura ambiente. Após o bloqueio e nova lavagem, foram

acrescentados 60 µL do sobrenadante da cultura de hibridomas por poço. A incubação das placas foi feita a 37°C por 45 minutos. Seguiram-se três lavagens com PBST e posterior adição de anticorpo anti-Ig total de camundongo marcado com peroxidase (Southern Biotechnology, EUA) diluído em 1:2000 (60 µL/poço) e uma nova incubação foi realizada a 37°C por 45 minutos. Esta reação foi revelada pela adição do substrato contendo peróxido de hidrogênio e ortofenildiamina – OPD – (Sigma Chemical Co, EUA) diluídos em tampão ácido⁶. A reação foi interrompida adicionando-se H₂SO₄ 3 N (50 µL/poço) e lida em espectrofotômetro de placas com comprimento de onda de 492 nm (Multiskan, Labsystems, Finlândia).

Clonagem dos Hibridomas:

Os hibridomas positivos segundo o teste ELISA foram clonados por diluição limitante. As células contidas em cada poço positivo foram contadas em câmara de Neubauer, diluídas à concentração de 20 células/mL e semeadas no volume de 100 µL/poço em placas de cultura de 96 poços. Essa placa já continha meio pré-condicionado preparado com fagócitos peritoniais de camundongos com 24 horas de antecedência. Cada clone foi subclonado pelo menos duas vezes antes de ser ampliado para coleta de sobrenadante, produção de líquido ascítico ou congelado em nitrogênio líquido.

Produção do Líquido Ascítico:

Após 7-10 dias da injeção de 0,5 mL de óleo mineral (Sigma Chemical Co, EUA) por via i.p., os camundongos BALB/c foram inoculados pela mesma via com 2x10⁶ células dos hibridomas em estudo. Os camundongos foram observados diariamente e cerca de 10 dias após a injeção das células, os líquidos ascíticos foram recolhidos. Estes foram centrifugados por 5 minutos a 500g e os respectivos sobrenadantes obtidos foram titulados por ELISA e congelados a -20°C.

Purificação dos Anticorpos Monoclonais:

A metodologia empregada foi a descrita por Steinbuch e Audran (1969) através de precipitação com ácido caprílico. O líquido ascítico foi diluído 1:3 em tampão acetato de sódio⁷ 60 mM, pH4,0 e a este foi acrescido, lentamente, 0,4 mL de ácido caprílico (Merck, Alemanha) para cada 10 mL de líquido ascítico sob agitação, a temperatura ambiente. A agitação foi mantida por 30 minutos, e a seguir, o material foi centrifugado a 5.000g. Após a centrifugação, o pH foi ajustado para 7,2 com Tris 3 M e a suspensão foi novamente centrifugada. O sobrenadante resultante foi concentrado com sulfato de amônio a 45% de saturação, centrifugado a 3.200g e dialisado contra PBS durante 48 h a 4°C. A concentração protéica foi determinada pelo método de Bradford (1976) e a pureza avaliada por SDS-PAGE 15%¹³.

Eletroforese em Gel de Poliacrilamida Contendo Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE):

Os géis de SDS-PAGE foram realizados em sistema descontínuo (Bio Rad Mini Protean II, USA), constituído de gel separador com 12%¹² ou 15%¹³ de acrilamida, gel de empilhamento com 4%¹¹ de acrilamida e tampão de corrida Tris-Glicina⁹ segundo a metodologia descrita por Laemmli (1970). A corrente elétrica utilizada de 100 V no início (para o devido empacotamento das proteínas) e de 150 V ao decorrer da corrida. Os géis foram corados com azul de Coomassie R250 (Gibco BRL, USA) 1% em solução metanol-acético¹⁴ por duas horas e descorados em solução metanol-acético¹⁵ até a visualização das bandas.

Determinação do Isotipo dos Anticorpos Monoclonais:

O isotipo dos anticorpos monoclonais obtidos foi determinado por um teste de ELISA, segundo descrito anteriormente, no qual foram utilizados anticorpos secundários específicos para os diferentes isotipos de

imunoglobulinas (anti-IgG1, anti-IgG2a, anti-IgG2b, anti-IgG3 e anti-IgM). Para o controle positivo, foi utilizado anticorpo secundário anti-Ig total de camundongo marcado com peroxidase.

Western blotting:

Ao término da corrida eletroforética (SDS-PAGE), as proteínas foram transferidas para a matriz de nitrocelulose com poros de 0,45 μm , de acordo com Towbin *et al* (1979), utilizando equipamento de transferência úmida da BioRad e tampão fosfato⁸. Após a transferência das proteínas, a membrana foi incubada com solução bloqueadora (leite desnatado a 5% em PBS) durante 1 h sob agitação a temperatura ambiente. Em seguida, a membrana foi incubada com os mAbs ou soro de camundongo imunizado e soro de camundongo não imunizado (estes últimos, controles positivo e negativo, respectivamente) por 2 h a temperatura ambiente. As membranas foram lavadas três vezes em PBST. Após a lavagem, anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Southern Biotechnology Associates, Inc.), diluído a 1:2000, foi adicionado e incubado por 1 h. A membrana foi lavada três vezes, nas mesmas condições descritas acima. A revelação da membrana foi realizada com uma solução de revelação¹⁶.

Imunoprecipitação:

Um volume de 96 μL (96 μg) de extrato bruto de cerdas da *Lonomia obliqua* foi misturado com 100 μg de cada mAb produzido e 30 μL de proteína G acoplada à sepharose (Gibco BRL, EUA). A esta mistura foram adicionados 360 μl de tampão Low Ripa⁵ e, em seguida incubada por uma noite, sob agitação a 4°C. Após esta incubação, a mistura foi lavada uma vez com tampão Low Ripa e mais três vezes com PBS para retirar o Triton. O sedimento foi ressuspensionado em tampão de amostra¹⁰, fervido por 5 minutos, aplicado no gel SDS-PAGE a 12% e posteriormente seqüenciado.

Purificação da Lipocalina:

Eletroforese em Gel de Poliacrilamida Não-Desnaturante (Native-PAGE):

Os géis de Poliacrilamida Não-Desnaturante foram realizados em sistema descontínuo (Bio Rad Mini Protean II, USA), constituído de gel separador com 17% de acrilamida, gel de empilhamento com 4% de acrilamida e tampão de corrida Tris-Glicina sem SDS, segundo uma modificação da metodologia descrita por Laemmli (1970). A corrente elétrica utilizada foi de 100 V no início (para o devido empacotamento das proteínas) e de 120 V no decorrer da corrida. Ao término desta, a banda contendo as proteínas foi recortada do gel, macerada em 200 µL tampão Tris-HCl 2,5 mM⁴, pH 8,3 e filtrada pelo sistema Centricon[®], com poros de 0,45 µm de diâmetro. Uma pequena parte das amostras foi submetida a um ensaio de SDS-PAGE 15% e as bandas resultantes foram seqüenciadas.

Cromatografia de Troca Iônica:

As amostras filtradas foram aplicadas à coluna de troca iônica DEAE-5-PW (75 x 7,5 mm) em sistema HPLC. As fases móveis utilizadas foram baseadas em dois tampões:

A - Tris-HCl 2,5 mM, pH8,3

B - Tris-HCl 2,5 mM, pH8,3, NaCl 1,5M, pH7,5

O material foi eluído com um fluxo de 0,5 mL/min. As amostras foram coletadas de acordo com os picos protéicos observados a uma absorbância de 280 nm.

Os picos coletados foram dialisados contra água destilada durante um intervalo de dois dias a 4°C. Em seguida, tais picos foram liofilizados até que o volume final de cada amostra fosse de 200 µL.

Determinação da Fração Correspondente à Lipocalina:

A determinação da fração correspondente à lipocalina foi realizada com base nas massas moleculares apresentado pelas amostras de cada pico em um gel SDS-PAGE 15% (como o descrito anteriormente). A amostra que apresentou o peso de aproximadamente 20 KDa foi considerada como a lipocalina. A confirmação deste dado foi obtida através de um *Dot Blot* realizado segundo o protocolo: 5 µL da amostra em questão foram aplicados à matriz de nitrocelulose com poros de 0,45 µm. Após a devida incorporação da amostra na membrana, esta foi incubada em solução bloqueadora (leite desnatado 5% em PBS) durante 1 h sob agitação a temperatura ambiente. Em seguida, a membrana foi incubada com o mAb 25DH9 ou soro de camundongo imunizado e soro de camundongo não imunizado (estes últimos, controles positivo e negativo, respectivamente) por 2 h a temperatura ambiente. A membrana foi lavada três vezes em PBST. Após a lavagem, anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Southern Biotechnology Associates, Inc.), diluído a 1:2000, foi adicionado e incubado por 1 h. A membrana foi lavada três vezes, nas mesmas condições descritas acima. A revelação da membrana foi realizada com uma solução de revelação¹⁶.

Análise da Purificação da Lipocalina:

A pureza da amostra foi analisada por meio do gel SDS-PAGE 15% mencionado acima e confirmada por meio do sequenciamento da mesma.

Determinação da Atividade Serino-Proteásica da Lipocalina:

O substrato N α -benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilina (DL-BApNA) (Sigma – Aldrich) foi utilizado na determinação da atividade serino-proteásica da lipocalina isolada. Nestes ensaios, 20 µL da lipocalina purificada foram incubados em tampão Tris-HCl⁴ em diferentes concentrações de DL-BApNA

(0,14 mM, 0,3 mM, 0,5 mM e 1 mM), na presença e na ausência de PMSF a 5 mM, por um período de 20 minutos a 37°C. A p-Nitroanilina liberada foi quantificada em comprimento de onda 405 nm em espectrofotômetro de placas (Multiskan, Labsystems, Finlândia).

Preparação das Amostras para o Sequenciamento por Espectrometria de Massas MALDI ToF-ToF:

As bandas a serem analisadas foram extraídas do gel, divididas em pedaços menores e armazenadas em eppendorfs previamente tratados seqüencialmente em metanol 100%, água destilada e metanol 100%. As amostras foram, então descoradas após três lavagens de 15 minutos cada em solução de acetonitrila 50% em bicarbonato de amônio 25mM, pH 8,0. Após a remoção do corante, as amostras foram desidratadas em dois banhos de 5 minutos cada com 200 µL de acetonitrila 100% e secadas em sistema Speed Vac por de 15 minutos. Em seguida, as amostras foram reduzidas em 100 µL de DTT 65 mM, por 30 minutos, à 56°C e posteriormente alquiladas com 100 µL de iodoacetamida 200 mM, por 30 minutos, à temperatura ambiente, no escuro. Após a remoção da solução de iodoacetamida, as amostras foram lavadas uma vez em 200 µL de bicarbonato de amônio 100 mM, por 10 minutos. As amostras foram novamente desidratadas em 200 µL de acetonitrila 100% por 5 minutos. A acetonitrila foi removida e as amostras foram re-hidratadas em 200 µL de solução de bicarbonato de amônio 100 mM por 10 minutos. Esta foi removida e as amostras submetidas a dois banhos com 200 µL de acetonitrila 100% para uma nova desidratação. As amostras foram secas em sistema Speed Vac e submetidas à digestão com tripsina a 20ng/ µL em tampão bicarbonato de amônio 40mM por 45 minutos no gelo. Em seguida, o excesso de tripsina foi retirado e as amostras incubadas em tampão bicarbonato de amônio 40mM *overnight* a 37 °C (16-24 h). Após a incubação, as amostras foram sonicadas no ultrassom por 10 minutos, vortexadas por 20 segundos e o sobrenadante separado do material sedimentado. O

sobrenadante, contendo, agora, os peptídeos a serem analisados, foi seco até um volume de 5 µL e congelado até o dia da análise.

Sequenciamento por Espectrometria de Massas MALDI ToF-ToF:

O sequenciamento dos componentes anteriormente mencionados foi realizado por espectrômetro de massas MALDI ToF-ToF em colaboração com o Dr. Jonas Perales, no Laboratório de Farmacodinâmica do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. A sua identificação foi realizada utilizando-se o sistema de pesquisa BLAST (ALTSCHUL et al., 1990) do Protein Data Bank (PDB), disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>>.

5. RESULTADOS:

Produção e Purificação de Anticorpos Monoclonais:

O *screening* das placas dos hibridomas produzidos a partir da fusão resultou em 50 híbridos reativos ao extrato bruto de cerdas da *Lonomia obliqua*. Dentre os vários clones positivos, aqueles que apresentavam maiores valores de densidade ótica nas leituras em espectrofotômetro de placas foram selecionados para a clonagem. Esta resultou nos seguintes clones estáveis: 26CE11, 26DF10, 26BH7, 26AC11, 26CF11 e 25DH9.

Após a ampliação das culturas dos hibridomas selecionados, líquidos ascíticos de cada um foram produzidos e purificados. A quantificação protéica foi realizada segundo o método de Bradford e a pureza testada através da realização de um SDS-PAGE 12% (Figura 6). Um gel similar ao da figura 6 foi, então, analisado por *Western blotting* a fim de identificar as cadeias leves e pesadas dos mAbs presentes nas purificações realizadas (Figura 7).

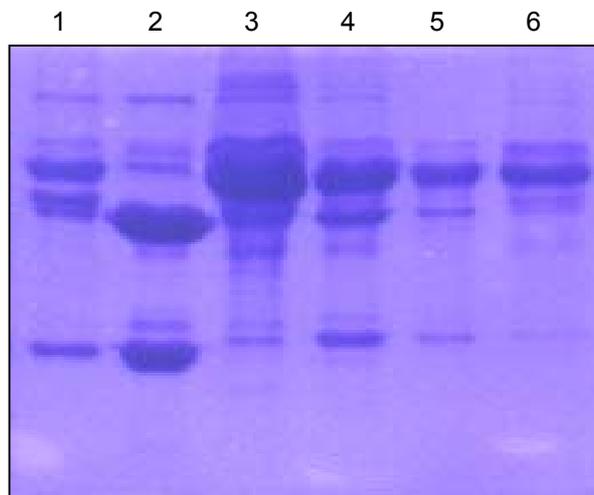


Figura 6: ANÁLISE DOS ANTICORPOS PURIFICADOS POR SDS-PAGE 12% COM 25 μ g DE CADA AMOSTRA. Raia 1 - clone 25DH9; raia 2 - clone 26BH7; raia 3 - clone 26DF10; raia 4 - clone 26AC11; raia 5 - clone 26CF11; raia 6 - clone 26CE11.

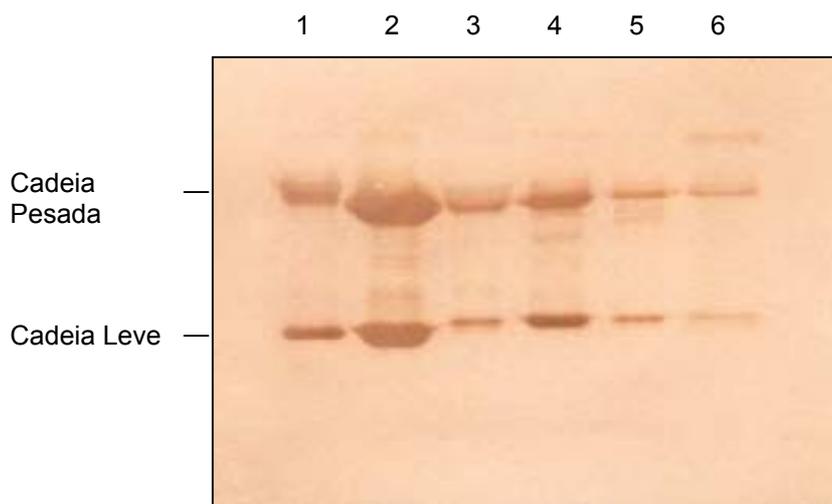


Figura 7: ANÁLISE DOS ANTICORPOS PURIFICADOS POR *Western blotting*. Este foi realizado a partir de um gel SDS-PAGE 12% com 25 µg de cada amostra. As cadeias pesada e leve foram identificadas com anticorpo anti-Ig total de camundongo. Raia 1 - clone 25DH9; raia 2 - clone 26BH7; raia 3 - clone 26DF10; raia 4 - clone 26AC11; raia 5 - clone 26CF11; raia 6 - clone 26CE11.

Caracterização Isotípica dos Anticorpos Monoclonais Produzidos:

A isotipagem dos anticorpos monoclonais foi determinada por meio do ensaio ELISA, no qual foram utilizados anticorpos secundários específicos para cada isotipo testado. Este revelou que a maioria dos anticorpos monoclonais produzidos eram da classe IgG 1 (Tabela 1).

Tabela 1: Isotipos dos anticorpos monoclonais produzidos:

Hibridoma	Isotipo
25DH9	IgG1
26BH7	IgG1
26DF10	IgG1
26AC11	IgG1
26CF11	IgG1
26CE11	IgM

Análise da Titulação e Especificidade dos Anticorpos Monoclonais Produzidos:

Para avaliar o título de cada um dos mAbs por componentes do extrato bruto de cerdas da *Lonomia obliqua*, foi realizado um ensaio de ELISA (Figura 8), com a concentração protéica inicial de cada amostra padronizada em 1 mg/mL. Nesta figura, podemos observar que o clone 26CF11 apresentou a maior titulação em comparação com os demais clones.

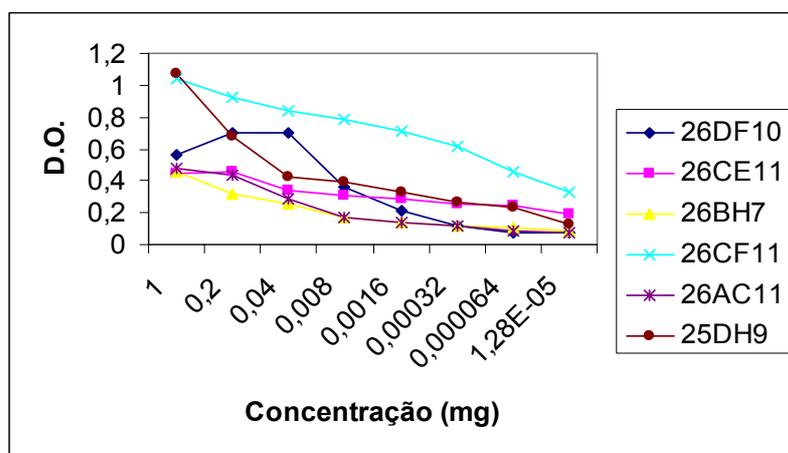


Figura 8: TITULAÇÃO DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS PURIFICADOS PELO TESTE DE ELISA. A placa de ELISA foi sensibilizada com veneno total de *L. obliqua* (10 µg/mL). A concentração protéica inicial foi de 1 mg/mL para cada amostra de anticorpo monoclonal. A reação foi detectada com anticorpo secundário anti-Ig total de camundongo marcado com peroxidase e a leitura da placa realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda a 490 nm.

A análise da especificidade dos mAbs foi verificada por *Western blotting* a partir de um SDS-PAGE 15%. Na figura 9 pode-se observar que apenas os anticorpos monoclonais 25DH9, 26BH7 e 26CF11 foram capazes de reconhecer bandas distintas do extrato bruto de cerdas.

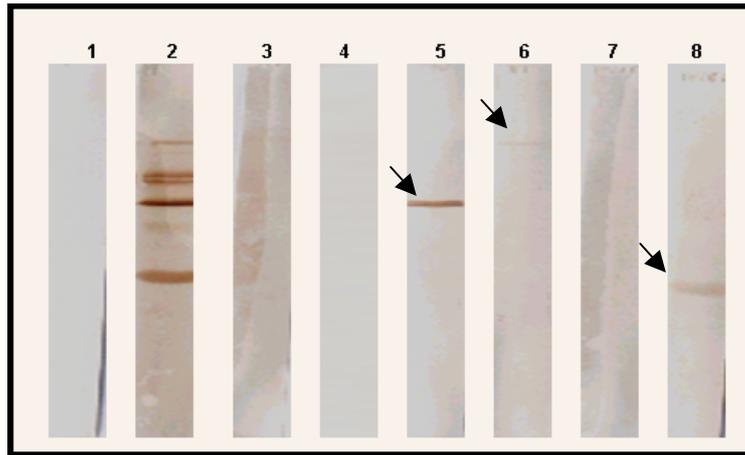


Figura 9: ANÁLISE DA ESPECIFICIDADE DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS POR TESTE *Western blotting*. Veneno total de *Lonomia obliqua* foi submetido a uma corrida eletroforética em SDS-PAGE a 15% e transferido para folha de nitrocelulose. Tiras de nitrocelulose contendo o antígeno foram incubadas com cada um dos anticorpos monoclonais e a reação foi detectada com anticorpo secundário anti-Ig total de camundongo marcado com peroxidase. Raia 1 - controle negativo (soro de camundongo não – imunizado); raia 2 - controle positivo (soro pré-fusão); raia 3 - clone 26DF10; raia 4 - clone 26CE11; raia 5 - clone 26BH7; raia 6 - clone 26CF11; raia 7 - clone 26AC11; raia 8 - clone 25DH9.

Baseando-se nos resultados observados na figura 9, no qual três mAbs não foram capazes de reconhecer o antígeno desnaturado de veneno de *Lonomia obliqua*, foi realizado, então, um ensaio de imunoprecipitação para identificar os componentes nativos do veneno reconhecidos por eles. O material resultante da imunoprecipitação foi analisado por um SDS-PAGE 12% (figura 10). Podemos observar nesta figura que os clones 25DH9, 26AC11 e 26BH7 foram capazes de imunoprecipitar bandas do veneno de *Lonomia obliqua*. Observamos ainda, que o anticorpo monoclonal 25DH9 parece reconhecer o componente majoritário do extrato bruto de cerdas. Assim, a banda imunoprecipitada pelo mAb 25DH9 foi retirada do gel e enviada ao Dr. Jonas Perales do Laboratório de Farmacodinâmica da FIOCRUZ para análise por espectrômetro de massas.

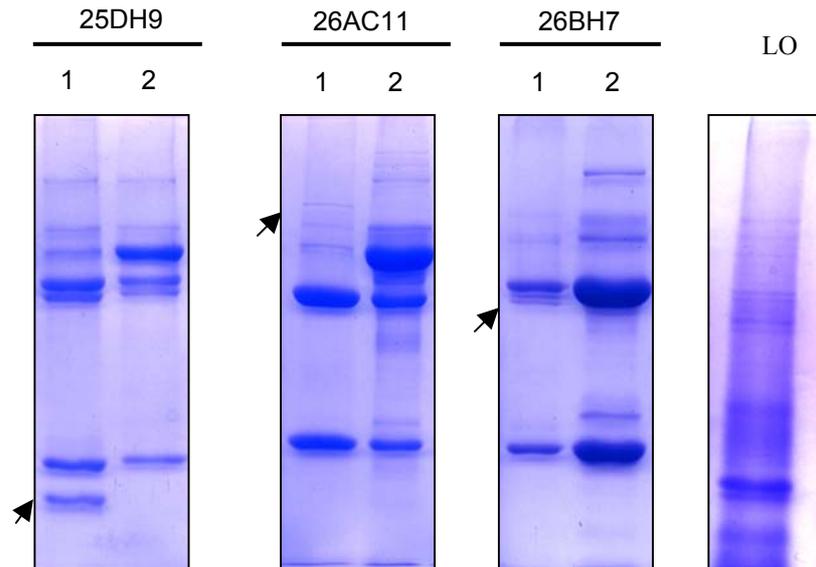


Figura 10: ANÁLISE DO IMUNOPRECIPITADO DO VENENO DE *Lonomia obliqua* COM ANTICORPOS MONOCLONAIS POR SDS-PAGE 12%. 1. Anticorpo monoclonal incubado com extrato de cerdas de *Lonomia obliqua*; 2. Anticorpo monoclonal. As setas indicam as bandas imunoprecipitadas. LO – Extrato bruto de cerdas da *Lonomia obliqua*.

A análise por espectrômetro de massas da banda reconhecida pelo mAb 25DH9 resultou em uma seqüência de aminoácidos que pode ser vista na figura 11. Esta seqüência foi submetida à análise pelo programa BLAST no banco de dados do NCBI. A análise realizada demonstrou que o componente do veneno reconhecido pelo mAb 25DH9 possui uma grande homologia com as enzimas ativadoras de protrombina e pertence a uma família de proteínas denominadas lipocalinas. Esta proteína do veneno de *Lonomia* já teve o seu gene seqüenciado por Veiga *et al* (2005) e por Reis *et al* (2006).

1	MKFFGLFLAI	LASTAADVVI	DGACPDMKAV	SKFDMNAYQG	TWYEIKKFPV
51	ANEANGDCGS	VEYTPDNGLL	KVRAGHVEDD	IEKFVVGVLV	KNAGTSDAEL
101	TLSVVVGDYV	RVAPLWIVST	DYDNYAIGYS	CKDYKKSQNH	RVNIWILSRT
151	KTLTETSKST	VNKFLKEHKS	EFDQSKFVET	DFSEKACFFK	KSHVYTVVPG
201	A				

Figura 11: SEQÜÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DO COMPONENTE IMUNOPRECIPITADO PELO mAb 25DH9. Encontram-se destacadas em vermelho as seqüências obtidas no processo de sequenciamento e que são iguais a seqüências depositadas no banco de dados. Identificação no PDB: gi|56462328 - lipocalin 1 [*Lonomia obliqua*]. (Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>>).

Purificação da Lipocalina:

A purificação da lipocalina a partir do extrato bruto de cerdas foi realizada em duas etapas. Na primeira etapa, o extrato foi submetido a um gel nativo contendo 17% de acrilamida (Figura 12). Nesta figura, pode-se observar que o gel corado com azul de coomassie apresenta uma banda majoritária indicada pela seta. No gel nativo não corado essa banda apresenta-se com uma coloração esverdeada (dado não mostrado). Esta característica foi utilizada para orientar a excisão desta banda do gel nos ensaios subseqüentes.

A banda extraída do gel foi macerada em 200 μ L tampão Tris-HCl 2,5 mM⁵, pH 8,3 e filtrada em sistema Centricon[®], poro 0,45 μ m. Uma pequena parte dessa amostra foi submetida a um gel SDS-PAGE 15% (Figura 13) e a um ensaio de *Western blotting* (Figura 14) para confirmar a presença da lipocalina.

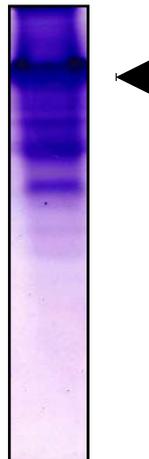


Figura 12: PURIFICAÇÃO PARCIAL DA LIPOCALINA. Vinte microlitros do extrato bruto de cerdas da *Lonomia obliqua* foram submetidos a um gel nativo com 17% de acrilamida. A banda majoritária (destacada) foi extraída.

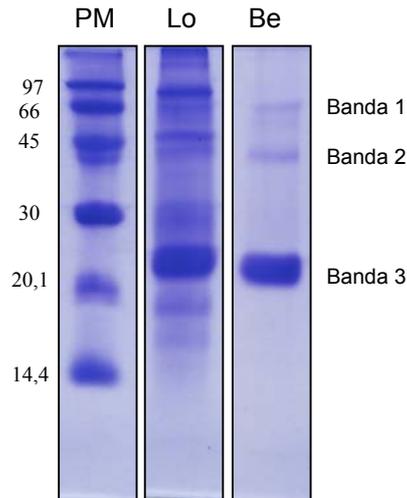


Figura 13: ANÁLISE DO PERFIL ELETROFORÉTICO DO CONTEÚDO DA BANDA EXTRAÍDA. PM – Peso Molecular (kDa); Lo – Veneno de *Lonomia obliqua* total; Be – Banda extraída do gel não-desnaturante com 17% de acrilamida e macerada em 2,5mM de Tris HCl, pH 8,3.

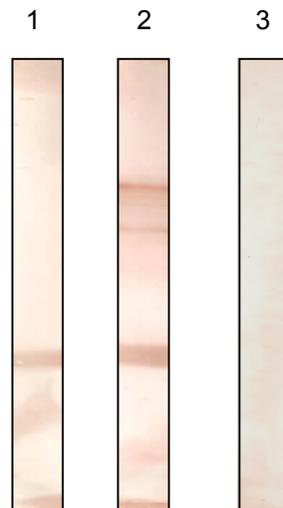


Figura 14: ANÁLISE DA BANDA EXTRAÍDA DO GEL NATIVO POR *Western blotting*. A banda excisada do gel não-desnaturante foi macerada em Tris/HCl 2,5 mM pH 8,3. Trinta microlitros da amostra macerada foi submetida a SDS-PAGE 15% e transferida a uma membrana de nitrocelulose. Tiras de nitrocelulose contendo o antígeno foram incubadas com anticorpos. Raia 1- Anticorpo monoclonal 25DH9, específico para a Lipocalina presente no veneno de *Lonomia obliqua*. Raia 2- Controle positivo, soro policlonal antiveneno total de *Lonomia obliqua*. Raia 3- Controle negativo, soro de camundongo normal.

A análise das figuras 13 e 14 mostra que a banda extraída do gel nativo 17% é constituída por, pelo menos, outras duas proteínas (bandas 1 e 2) além da lipocalina (banda 3). A fim de identificar tais proteínas e confirmar que a lipocalina é o único constituinte da banda majoritária observada na figura 13, as bandas foram recortadas e enviadas ao Dr. Jonas Perales do Laboratório de Farmacodinâmica da FIOCRUZ para análise por espectrômetro de massas (Figuras 15 e 16).

1	RPLRPGAIGF	PNENVTKAVF	TDLNRELKSV	KGVTLKIANK	IYIANGFELN
51	DQFAVVSQDV	FNSEVQKLDL	AQNKVAAKTI	NTWVEDHTNN	RIKDLVDPNS
101	LDDYTRAVLV	NALYFKGSWK	NKFDKESTID	RPFHVDNTKT	IQVPTMHRSG
151	QYSYGESREL	NAKIIEMPYE	GDETSLVIVL	PNTVDGIHNL	LEKLDKPKVL
201	SRAEKDMHEI	DVDVYVPKFK	IETTTDLKKV	LQNMNIKKLF	NGSEARLDYL
251	LKKS DALYVS	EAVQKAFIEV	NEEGAEAAAA	NAFGISYLSA	VITQPRSFVA
301	DHPFIFMLKE	GRKILFFGTM	MS		

Figura 15: SEQÜÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DA BANDA 2 (referente à figura 13). Encontram-se destacadas em vermelho as seqüências obtidas no processo de sequenciamento e que são iguais a seqüências depositadas no banco de dados. Identificação no PDB: gi|56462296 - serine protease inhibitor 4 [Lonomia obliqua]. (Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>>).

1	XMKFFGLFLA	ILASTAADVV	IDGACPDMSA	VSKFDMNAYQ	GTWYEIKKFP
51	VANEANGDCG	SVEYTPDNGL	LKVRAGHVED	DIEKFVVGVL	LKNAGTSDAE
101	LTLVSVVVDY	VRVAPLWIVS	TDYDNYAIGY	SCKDYKKSQ	HRVNIWILSR
151	TKTLNESSKS	TVNKFLKEHS	KEFDQSKFVE	TDFSEKAC	

Figura 16: SEQÜÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DA BANDA 3 (referente à figura 13). Encontram-se destacadas em vermelho as seqüências obtidas no processo de sequenciamento e que são iguais a seqüências depositadas no banco de dados. Identificação no PDB: gi|56462328 - lipocalin 1 [Lonomia obliqua]. (Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>>).

Não foi possível determinar a seqüência da proteína presente na banda 1. No entanto, a análise das seqüências das bandas 2 e 3 mostrou tratarem-se de uma serpina (banda 2), já identificada por Veiga *et al* (2005) e da lipocalina (banda 3), propriamente, comprovando, então, a presença desta molécula na banda majoritária aparente no gel nativo com 17% de poliácridamida.

A segunda etapa de purificação da lipocalina corresponde à submissão da banda majoritária extraída do gel nativo 17% (Figura 12), macerada e filtrada, como descrito anteriormente, à uma cromatografia de troca iônica (Figura 17).

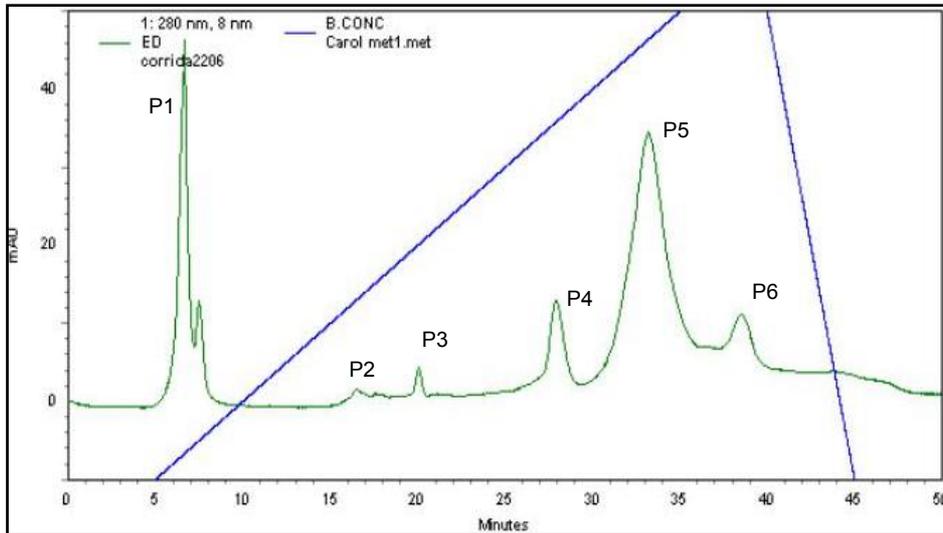


Figura 17: PURIFICAÇÃO DA LIPOCALINA ATRAVÉS DA CROMATOLOGRAFIA DE TROCA IÔNICA. Após a realização de um gel não-desnaturante com 17% de acrilamida com o veneno total de *Lonomia obliqua*, a banda majoritária foi extraída, macerada em 2,5 mM de Tris HCl, pH 8,3, filtrada em sistema Centricon[®], poro de 0,45 μ m e submetida a uma cromatografia de troca iônica.

As amostras foram coletadas de acordo com os picos protéicos observados a uma absorvância de 280 nm. Os picos coletados foram dialisados contra água destilada durante um intervalo de dois dias. Em seguida, tais picos foram liofilizados até o volume final de 200 μ L e, então, amostras de cada um foram submetidas a um gel SDS-PAGE 15% (Figura 18) para a identificação do pico correspondente à lipocalina e análise da purificação

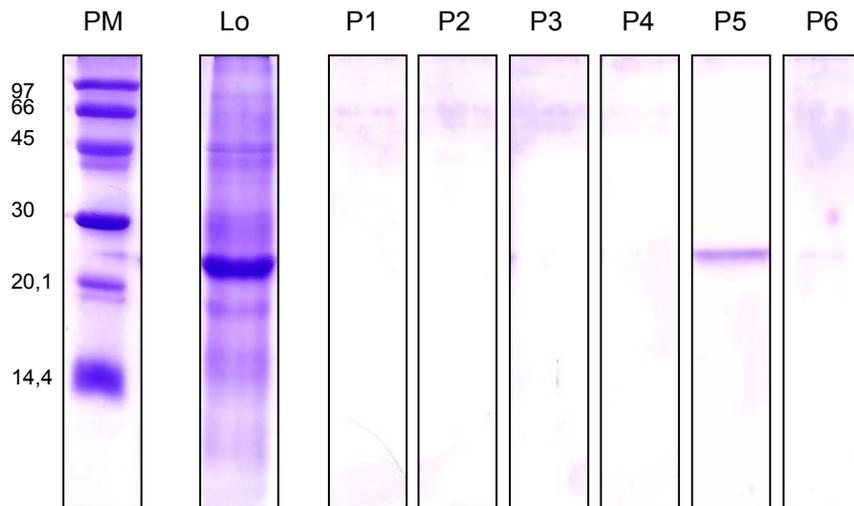


Figura 18: ANÁLISE DA PURIFICAÇÃO DA LIPOCALINA POR SDS-PAGE 15% com 30 μ L de cada amostra. PM – Peso Molecular (kDa); Lo – Veneno de *Lonomia obliqua*; P1 – Primeiro pico eluído; P2 – segundo pico eluído; P3 – terceiro pico eluído; P4 – quarto pico eluído; P5 – quinto pico eluído; P6 - sexto pico eluído.

Como observado na figura 19, o pico 5 apresenta uma proteína de aproximadamente 20 kDa. Para confirmar que se trata da lipocalina, foram realizados um ensaio de *Dot Blot* (Figura 19) e o seqüenciamento (Figura 20) de uma amostra desse pico.

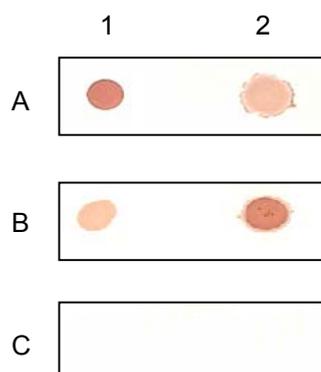


Figura 19: ANÁLISE DA PURIFICAÇÃO DA LIPOCALINA POR *DOT BLOT*. Este foi realizado com 5 μ L de: 1. Amostra do pico 5; 2. Extrato bruto de cerdas da *Lonomia obliqua*; A – Foi utilizado como anticorpo primário o mAb 25DH9, específico para lipocalina ; B – Foi utilizado como anticorpo primário o soro de camundongo imunizado com o extrato bruto de cerdas da *Lonomia obliqua*, como controle positivo do ensaio. ; C – Foi utilizado como anticorpo primário o soro de camundongo não-imunizado, como controle negativo do ensaio.

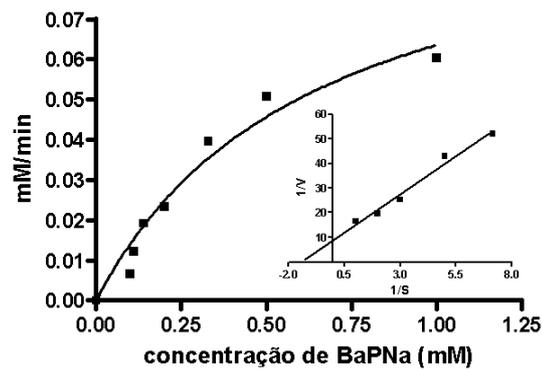
1	XMKFFGLFLA	ILASTAADVV	IDGACPDMKA	VSKFDMNAYQ	GTWYEIKKFP
51	VANEANGDCG	SVEYTPDNGL	LKVRAGHVED	DIEKFVVGVL	LKNAGTSDAE
101	LTLVVVVDY	VRVAPLWIVS	TDYDNYAIGY	SCKDYKKSNO	HRVNIWILSR
151	TKTLNESSKS	TVNKFLKEHS	KEFDQSKFVE	TDFSEKAC	

Figura 20: SEQÜÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DO PICO 5. Encontram-se destacadas em vermelho as seqüências obtidas no processo de sequenciamento e que são iguais a seqüências depositadas no banco de dados. Identificação no PDB: gi|56462328 - lipocalin 1 [*Lonomia obliqua*]. (Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>>).

Em conjunto, as figuras 19 e 20 demonstram que o pico 5 corresponde à lipocalina identificada na banda 3 da figura 13 e que a metodologia empregada foi eficiente no processo de purificação desta molécula.

Determinação da Atividade Serino-Proteásica da Lipocalina:

Uma vez confirmada a eficiência do processo de purificação realizado, a lipocalina nativa pura foi, então, submetida a um ensaio a fim de confirmar sua atividade serino-proteásica (Figura 21). Para tanto, o substrato utilizado foi o N α -benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilina (DL-BApNa).



$$K_M = 0,104 \pm 0,02 \text{ mM}$$

$$V_{\text{Max}} = 0,643 \pm 0,19 \text{ mM/min}$$

Figura 21: DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE SERINO-PROTEÁSICA DA LIPOCALINA NATIVA. Vinte microlitros da lipocalina purificada foram incubados em tampão Tris-HCl⁴ em diferentes concentrações de DL-BAPNA (0,1mM, 0,14 mM, 0,2mM, 0,3 mM, 0,5 mM, 1 mM, e 1,5 mM), por um período de 20 minutos a 37°C. A p-Nitroanilina liberada foi quantificada em comprimento de onda de 405 nm. As barras correspondem ao desvio-padrão de três experimentos independentes.

De acordo com a figura 22, a lipocalina purificada foi capaz de hidrolisar o substrato BAPNA. Os parâmetros cinéticos obtidos com este substrato foram: $K_{m\text{aparente}}$ de 0,104 (\pm 0,02) mM e a velocidade máxima (aparente – $Vel_{\text{máx.}}$) da reação foi de 0,643 (\pm 0,19) mM/min. A incubação prévia com PMSF a 5 mM inibiu completamente a atividade antes observada.

DISCUSSÃO:

Muitas toxinas que afetam a hemostase são produzidas por animais peçonhentos como serpentes e aranhas, os quais utilizam estes compostos para facilitar a captura e digestão de suas presas (Aird, 2002). Algumas larvas de lepidópteros, notavelmente aquelas pertencentes à família Saturniidae, também são capazes de produzir secreções venenosas que causam distúrbios no sistema hemostático. No entanto, diferentemente dos venenos ofídicos ou aracnídeos, o veneno dessas larvas são utilizados unicamente na defesa contra predadores (Kelen *et al.*, 1995).

Especificamente, a lagarta da espécie *Lonomia obliqua* é capaz de produzir um veneno que provoca um drástico consumo dos fatores da coagulação, levando à uma síndrome hemorrágica disseminada na vítima. A necessidade por maiores informações acerca da constituição protéica deste veneno levou à construção de uma biblioteca de cDNA a partir de tecidos potencialmente envolvidos no envenenamento (Veiga *et al.*, 2005). Embora o trabalho tenha identificado inúmeras moléculas, o mecanismo de ação do veneno ainda não foi totalmente esclarecido e provoca discordâncias entre alguns autores sobre os verdadeiros componentes responsáveis pelo envenenamento.

Muitos estudos, inclusive os mais recentes, atribuem papel central ao ativador de protrombina como o principal – senão único – princípio ativo responsável pelos vários sintomas da síndrome hemorrágica por *Lonomia obliqua* (Reis *et al.*, 1999; Fritzen *et al.*, 2005). Já no modelo proposto por Veiga *et al* (2005), todas as toxinas agem de forma sinérgica no sistema hemostático. Desta forma, moléculas que ativam fator X e protrombina levam à formação de trombrina ativada. E esta seria responsável, dentre outros efeitos, por induzir a agregação plaquetária e a formação de fibrina, além, de induzir fibrinólise compensatória por um mecanismo que envolve a liberação do ativador tecidual de plasmina (t-PA) por células endoteliais (Williams, 1998). Ao lado dessas ações procoagulantes, acredita-se que a presença da lonofibrase contribui indiretamente para o consumo de fibrinogênio por ativar o sistema fibrinolítico. Assim, ações inicialmente antagônicas parecem contribuir para

tornar o sangue da vítima do envenenamento por lagartas dessa espécie, totalmente incoagulável.

Outros componentes como a PLA₂, serpinas e lipocalinas, além de componentes do sistema imunológico, principalmente aqueles pertencentes à resposta humoral contra o envenenamento, também podem participar nos sintomas manifestados pela maioria dos pacientes, incluindo hemólise e falência renal aguda (Kelen *et al.*, 1995). Com a finalidade de melhor caracterizar os componentes do veneno e identificar aqueles que possuem atividade farmacológica, foram produzidos anticorpos monoclonais específicos ao extrato bruto de cerdas de *Lonomia obliqua*.

Após a fusão realizada, seis hibridomas, positivos segundo o ensaio imunoenzimático, foram selecionados de acordo com suas respectivas densidades óticas. Após a ampliação de suas culturas, líquidos ascíticos da cada um foram produzidos e purificados. A análise da purificação foi realizada através de um SDS-PAGE 12% e *Western blotting*. Os dados obtidos com estes ensaios demonstraram que as amostras possuem diferentes graus de contaminantes e concentrações protéicas.

A fim de testar a afinidade de cada um dos mAbs por componentes do extrato bruto de cerdas da *Lonomia obliqua*, foi realizada uma titulação pela qual se observou um bom título de todos os mAbs, porém com diferente grau de intensidade para cada amostra. Esta diferença, provavelmente, se deve aos distintos graus de pureza dos monoclonais. Contrastando com os dados da titulação, a análise da especificidade dos mAbs por *Western blotting* demonstrou que apenas os anticorpos monoclonais 25DH9, 26BH7 e 26CF11 foram capazes de reconhecer uma banda resultante da separação das proteínas do extrato bruto de cerdas em SDS-PAGE 15%.

Objetivando a identificação dos componentes do veneno em seu estado nativo foi realizada uma imunoprecipitação. Através deste experimento, observou-se que apenas os anticorpos monoclonais 25DH9, 26BH7 e 26AC11 são capazes de imunoprecipitar algum componente. A análise deste resultado demonstrou, ainda, que o componente reconhecido pelo 25DH9 poderia ser o constituinte majoritário do veneno. Assim, este componente foi isolado e seqüenciado.

A análise parcial da seqüência encontrada mostrou tratar-se de uma molécula pertencente à família das lipocalinas. Sua porção N-terminal (46 resíduos) apresenta 55% de homologia com a bombirina isolada da espécie *Bombyx mori* e 51% de homologia com a Insecticianina isolada da hemolinfa da espécie *Manduca sexta*, ambas lipocalinas.

A família das lipocalinas é formada por um extenso grupo de proteínas que exibem enorme variação estrutural e funcional. São tipicamente pequenas proteínas extracelulares de aproximadamente 20 KDa que possuem em comum o fato de se ligarem a receptores específicos na superfície celular e de formar complexos com outras macromoléculas pouco solúveis (Flower, 1995).

Dentre as funções atribuídas às lipocalinas encontram-se a de transporte de retinol, transporte de feromônios, regulação da resposta imune e mediação da homeostasia celular (Flower, 1996; Flower *et al.*, 2000; Gutierrez *et al.*, 2000). Especificamente em insetos, são conhecidas por formarem complexos com pigmentos, como a bilina; e por serem carreadoras de óxido nítrico, em insetos hematófagos. Todas essas funções estão relacionadas à propriedade de formarem complexos.

Embora em menor número, há exemplos de lipocalinas descritas por possuir atividade enzimática, tais como: prostaglandina D sintase (Irikura *et al.*, 2003), molécula responsável pela biossíntese de prostaglandina D; violaxantina depoxidase e zeaxantina epoxidase (Hieber *et al.*, 2000), catalisadoras da interconversão de carotenóides; e finalmente a lipocalina lacrimal e as β -lactoglobulina (Yusifov *et al.*, 2000), ambas com atividade endonucleásica.

A função da lipocalina presente no extrato bruto de cerdas da *Lonomia obliqua* ainda é incerta e desperta discordâncias entre alguns autores. Um estudo realizado por Reis *et al* (2006) afirma que a lipocalina encontrada no veneno é, na verdade, a unidade monomérica formadora da LOPAP (*Lonomia obliqua* Prothrombin Activator Protease), molécula de 69 kDa que possui atividade serino-proteásica. O grupo chegou a esta conclusão através da construção de uma biblioteca de DNA complementar (cDNA) a partir do RNA mensageiro (RNAm) das cerdas da lagarta e posterior clonagem do cDNA referente à LOPAP. A análise da seqüência encontrada demonstrou tratar-se de uma molécula com 21 kDa, a qual denominaram LOPAP recombinante (rLOPAP), e que possui entre 20 e 59% de homologia com membros da família

das lipocalinas. De acordo com o estudo, tal como a LOPAP nativa, a rLOPAP possui atividade serino-proteásica símile, sendo capaz de agir sobre a protrombina humana.

Veiga *et al* (2005) também construíram uma biblioteca de cDNA a partir do RNAm das cerdas da *Lonomia obliqua*, na qual identificaram que o grupo de seqüências (*cluster*) mais abundante codifica para uma molécula pertencente à família das lipocalinas. A seqüência encontrada por este grupo foi a mesma obtida por Reis *et al* (2001) para a LOPAP (e, portanto, a mesma seqüência da rLOPAP – Reis *et al.*, 2006 -). Buscando elucidar a função da lipocalina presente no veneno da *Lonomia obliqua* e verificar um possível papel dessa proteína no envenenamento, foi realizada a clonagem do cDNA codificante e a expressão dessa proteína (Veiga *et al.*, 2005 – dissertação de doutorado e dados submetidos). Os resultados obtidos mostram que a proteína recombinante é uma lipocalina típica; é desprovida de atividade pró-coagulante e não parece ter qualquer outra atividade direta sobre a coagulação sangüínea. Ainda segundo este trabalho, a lipocalina é capaz de ligar o grupamento heme e, na presença de um agente redutor como o ascorbato, participa da conversão acoplada (atividade tipo heme-oxigenase) do heme levando à formação de biliverdina. De acordo com Veiga *et al* (2005 – dissertação de doutorado e dados submetidos) a purificação da LOPAP por Reis *et al* (2001) não foi eficiente, havendo contaminação do material com a lipocalina presente no extrato de cerdas empregado no estudo e, portanto, a seqüência da LOPAP estaria incorreta.

A fim de esclarecer as questões acerca da função de lipocalina presente no veneno da *Lonomia obliqua*, o extrato bruto de cerdas foi submetido a um gel nativo com 17% de poliacrilamida. A análise da banda majoritária presente neste gel revelou que a lipocalina é o componente mais abundante, porém não o único. Além desta molécula, há ainda, pelo menos outros dois componentes: uma molécula de queratina e uma molécula inibidora de serino-protease (serpina).

A molécula de queratina encontrada parece ser um resquício das cerdas ainda presentes no extrato. Quanto à serpina, embora sua seqüência já tenha sido descrita por Veiga *et al* (2005), sua função ainda não foi determinada. Considerando o fato de que o sistema de coagulação de mamíferos é

composto por várias serino proteases ativadas de maneira seqüencial, a serpina encontrada pode participar da síndrome observada após o envenenamento através da inibição dos fatores da coagulação sanguínea da vítima. No entanto, o fato desta molécula migrar juntamente com a lipocalina quando o extrato bruto de cerdas da *Lonomia obliqua* é submetido à eletroforese em condição não desnaturante, pode indicar que a serpina representa, ainda, um mecanismo de regulação endógena da lipocalina.

Uma vez comprovada a presença da lipocalina na banda majoritária do gel nativo (descrito anteriormente), esta banda foi extraída, macerada em tampão Tris e submetida a uma cromatografia de troca iônica, na segunda etapa do processo de purificação. O sequenciamento do pico correspondente à lipocalina comprovou juntamente com um gel SDS-PAGE 15% e um ensaio de *Dot Blot*, a pureza da amostra e a eficiência do processo de purificação empregado.

A lipocalina purificada foi, então, incubada com diferentes concentrações de N α -benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilina (DL-BAPNa) para determinar sua atividade serino proteásica. De acordo com os resultados obtidos, pode-se observar que a lipocalina foi capaz de hidrolisar o substrato de maneira eficiente. Alguns parâmetros cinéticos desta reação foram obtidos, tais como o $K_{m\text{aparente}}$ de 0,104 (\pm 0,02) mM e a velocidade máxima (aparente – $Vel_{m\text{áx.}}$) da reação cujo valor foi de 0,643 (\pm 0,19) mM/min. A incubação prévia da lipocalina com 5 mM de PMSF inibiu completamente a atividade antes observada, comprovando a natureza (serino) proteásica apresentada por esta molécula.

Os dados obtidos corroboram parcialmente com trabalhos já publicados. Tal como descrito, a lipocalina isolada neste estudo possui a mesma seqüência e atividade proteásica daquela descrita por Reis *et al* (2001, 2006). Em seu trabalho de 2001, Reis *et al* purificaram e descreveram a forma tetramérica de 69 KDa da lipocalina (LOPAP) após a utilização de métodos bioquímicos muito mais estridentes do que aqueles empregados neste estudo. A lipocalina isolada por nós, no entanto, encontra-se na forma monomérica, conforme descrita posteriormente por este mesmo grupo (Reis *et al.*, 2006) para a LOPAP recombinante.

Quanto ao trabalho de Veiga *et al* (2005, tese de doutorado) este estudo contradiz a afirmação de que a lipocalina é desprovida de atividade proteásica. Entretanto, durante o processo de purificação da lipocalina utilizado neste trabalho, observamos que na eletroforese do extrato bruto de cerdas, utilizando gel nativo, a banda majoritária extraída do gel apresenta uma coloração esverdeada. Este fato indica que a lipocalina possivelmente está associada a componentes do pigmento da lagarta. A análise dos nossos dados em conjunto com os resultados de Reis *et al* (2001, 2006) e Veiga *et al* (2005, tese de doutorado), sugere que a lipocalina presente no veneno da *Lonomia obliqua* pode estar relacionada às duas funções. Ou seja, a lipocalina atuaria no processo da fisiopatologia do envenenamento causada por esta lagarta, bem como participaria do processo de conversão do grupamento heme em γ -biliverdina IX.

Em resumo, este trabalho demonstrou que os anticorpos monoclonais produzidos podem servir como ferramentas úteis no isolamento e estudo dos componentes do veneno da *Lonomia obliqua*. Demonstrou também que é possível purificar de maneira eficiente a lipocalina nativa a partir do extrato bruto de cerdas da *Lonomia obliqua*, diminuindo o número de moléculas submetidas a uma técnica cromatográfica. E, finalmente, suscitou a hipótese desta molécula estar relacionada à síndrome do envenenamento e na pigmentação da lagarta.

Tanto os anticorpos monoclonais produzidos quanto a lipocalina isolada podem, ainda, ser úteis no desenvolvimento de *kits* para imunodiagnóstico.

7. CONCLUSÕES:

⇒ Os epítomos reconhecidos pelos mAb 25DH9, 26CF11 e 26BH7 são lineares enquanto os demais monoclonais sugerem reconhecer epítomos conformacionais.

⇒ O componente imunoprecipitado pelo mAb 25DH9 pertence à família das lipocalinas.

⇒ O método de purificação proposto foi eficiente no isolamento da Lipocalina nativa a partir do extrato bruto de cerdas da *Lonomia obliqua*.

⇒ A lipocalina nativa presente no extrato bruto de cerdas da *Lonomia obliqua* possui atividade proteásica.

⇒ A lipocalina possivelmente apresenta duas atividades distintas, sendo capaz tanto de participar da pigmentação da *Lonomia obliqua* quanto da síndrome hemorrágica desencadeada após o envenenamento por esta lagarta.

⇒ Foi purificada, também a partir do extrato bruto de cerdas da *Lonomia obliqua*, um inibidor de serino protease.

BIBLIOGRAFIA:

ABELLA HB, TORRES JB, MARQUES MGB, DUARTE AC, BARROS E. Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Lonomia. Porto Alegre: CIT (Centro de Informação Toxicológica), 1998.

AIRD, SD. Ophidian envenomation and the role of the purines. *Toxicon* 40,335-393, 2002.

AROCHA-PIÑANGO, CL. Fibrinolisis producida por contacto con orugas comunicacion preliminar. *Acta Cient. Venezolana* 18: 136-139, 1967.

AROCHA-PIÑANGO, CL, MARVAL, E, GUERRERO, B. *Lonomia* genus caterpillar toxins: Biochemical aspects. *Biochimie* 82: 937-942, 2000.

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

AROCHA-PIÑANGO, CL, GUERRERO, B. Hemorrhagic syndrome induced by caterpillars. Clinical and experimental studies. Review. *Invest. Clin.*, 44: 155-163, 2003.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analyt. Biochem.* 72: 248-254, 1976.

BÜCHERL, W. Introduction. In: BÜCHERL W. & BUCKLEY EE. Venemous animals and their venoms. New York, Academic Press, p. XIX-XXII, 1971.

BURDMANN, EA, ANTUNES, I, SALDANHA, LB, ABDULKADER, RC. Severe acute renal failure induced by the venom of *Lonomia* caterpillars. *Clin. Nephrol.* 46: 337-339, 1996.

CAMPOS, IT., TANAKA-AZEVEDO, AM., TANAKA, AS. Identification and characterization of a novel factor XIIIa inhibitor in the hematophagous insect, *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *FEBS Lett.* 19: 512-516, 2004.

CAOVILLA, JJ, BARROS, EJ. Efficacy of two different doses of antilonomic serum in the resolution of hemorrhagic syndrome resulting from envenoming by *Lonomia obliqua* caterpillars: a randomized controlled trial. *Toxicon* 43: 811-818, 2004.

CARDOSO, JLC. Acidentes por Lepidópteros – II Lepidópteros Brasileiros de Importância Médica. In: Plantas Venenosos e Animais Peçonhentos. Savier, São Paulo: 233-236, 1992.

CHUDZINSKI-TAVASSI, AM., SCHATNER, M., FRITZEN, M., POZNER, RG., REIS, CV., LOURENÇO, D., LAZZARI, MA., Effects of Lopap on human endothelial cells and platelets. *Haemostasis* 31: 257-265. 2001.

CHUDZINSKI-TAVASSI, AM., CARRIJO-CARVALHO, LC., Biochemical and Biological properties of *Lonomia obliqua* bristle extract. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.* 12: 156-171. 2006.

CORRÊA, MS, SIQUEIRA-BATISTA, R, GOMES, AP, FRANCO-BARBOSA, A, VERZOLA, ACA, OLIVEIRA, FRQ, SQUEFF, FA, MOTTA-LEAL-FILHO, JM, TAVARES, RQ, DE AMORIM, DS, DE MARIA-MOREIRA, NL, SANTOS, SS. Eurucismo por *Lonomia* spp em Teresópolis, RJ, Brasil. Relato de um caso provável e revisão da literatura. *Ver. Soc. Bras. Méd. Trop.* 37: 418-421. 2004.

COSTA, RM. Acidentes por Lagartas Venenosas. In: Barraviera, B. (coord.) *Venenos animais: uma visão integrada*. Rio de Janeiro, Ed. de Publicações Científicas. p. 327-338, 1994.

DONATO, JL, MORENO, RA, HYSLOP, S, DUARTE, A, ANTUNES, E, LE BONNIE, BF, RENDU, F, DE NUCCI, G. *Lonomia obliqua* caterpillar spicules

trigger human blood coagulation via activation of factor X and prothrombin. *Thromb. Haemost.* 79: 539-542. 1998.

DUARTE, AC, CAOVILO, J, LORINI, I, LORINI, D, MANTOVANI, G, SUMIDA, J, MANFRE, PC, SILVEIRA, RC, MOURA, SP. Insuficiência renal aguda por acidentes com lagartas. *Jornal Brasileiro de Nefrologia* 12: 184-186, 1990.

DUARTE, AC, CRUSIUS, PS, PIRES, CAL, SCHILLING, MA, FAN, HW. Intracerebral hemorrhage after contact with *Lonomia* caterpillars. *Lancet* 348: 1033, 1996.

FAN, HW, CARDOSO, JLC, OLMOS, RD, ALMEIDA, FJ, VIANA, RP, MARTINEZ, APP. Hemorrhagic syndrome and acute renal failure in pregnant woman after contact with *Lonomia* caterpillars: a case report. *Rev. Inst. Med Trop.* São Paulo 40: 119-120, 1998.

FLOWER, DR. Multiple molecular recognition properties of the lipocalin protein family. *J. Mol. Recognit.* 8: 185-195, 1995

FLOWER, DR. The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem. J.* 318: 1-14, 1996.

FLOWER, DR., NORTH, AC., SANSOM, CE. The lipocalin protein family: structural and sequence overview. *Biochim Biophys Acta* 1482: 9-24, 2000.

FRAIHA, H, BALLARINI, A, LEÃO, RNQ, COSTA, JRD, DIAS, LB. Síndrome hemorrágica por contato com larvas de mariposas (Lepidóptera, Saturniidae). In: Instituto Evandro Chagas – 50 anos de Contribuição às Ciências Biológicas e à Medicina Tropical. Fundação Serviços de Saúde Pública. 2:811, 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.

FRITZEN, M, FLORES, MP, REIS, CV, CHUDZINSKI-TAVASSI, AM. A prothrombin activator (Lopap) modulating inflammation, coagulation and cell survival mechanisms. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 333: 517-523, 2005.

GUDDERRA, NP, RIBEIRO, JMC, ANDERSEN, JF. Structural determinants of factor IX(a) binding in nitrophorin 2, a lipocalin inhibitor of the intrinsic coagulation pathway. *The Journal of Biological Chemistry* 280: 25022-25028, 2005.

GUTIERREZ, G, GANFORNINA, MD, SANCHEZ, D. Evolution of the lipocalin family as inferred from a protein sequence phylogeny. *Biochim. Biophys. Acta*. 1482: 35-45, 2000.

HIEBER, AD, BUGOS, RC, YAMAMOTO, HY. Plant lipocalins: violaxanthin deoxidase and zeaxanthin epoxidase. *Biochim. Biophys. Acta* 1482: 84-91, 2000.

HUBER, R. Molecular structure of the bilin binding protein (BBP) from *Pieris brassicae* after refinement at 2.0 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 198: 499-513, 1987

IRIKURA, D, KUMASAKA, T, YAMAMOTO, M, AGO, H, MIYANO, M, KUBATA, KB, SAKAI, H, HAYIAISHI, O, URADE, Y. Cloning, expression, crystallization and preliminary X-ray analysis of recombinant mouse lipocalin-type prostaglandin D synthase, a somnogen-producing enzyme. *J. Biochem.* 133: 29-32, 2003.

KANOST, MR, JIANG, H, YU, XQ. Innate immune responses of a lepidopteran insect, *Manduca sexta*. *Immunol. Rev.* 198: 97-105, 2004.

KELEN, EMA, PICARELLI, ZP, DUARTE, AC. Hemorrhagic syndrome induced by contact with caterpillars of the genus *Lonomia* (Saturniidae Hemileucinae). *J. Toxicol., Toxin Rev.* 14: 283– 308, 1995.

KINI, RM. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A2 enzymes. *Toxicon* 42: 827-840, 2003.

KÖHLER, G, MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256: 495-497, 1975.

LAEMMLI, UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-685, 1970.

LORINI, LM. A taturana - Aspectos Biológicos e Morfológicos da *Lonomia obliqua*. EDIUPF, Passo Fundo, RS: 67-69, 1999.

MARKLAND JR, FS. Snake venoms. *Drugs* 54: 1-10, 1997.

MARVAL, E, GUERRERO, B, AROCHA-PIÑANGO, CL. The action of *Lonomia achelous* caterpillar venom on some blood coagulation and fibrinolysis parameters of the rabbit. *Toxicon* 37: 1491-1504, 1999.

MONTFORT, WR, WEICHSEL, A, ANDERSEN, JF. Nitrophorins and related antihemostatic lipocalins from *Rhodnius prolixus* and other blood-sucking arthropods. *Biochem. Biophys. Acta* 1482: 110-118, 2000.

MORAES, RHP. Lepidópteros de Importância Médica. In: Animais Peçonhentos do Brasil. Savier/FAPESP, 1º edição, São Paulo: 211-219, 2003.

PESCE, H, DELGADO, A. Poisoning from adult moths and caterpillars. In: Buckley, E.E. *Venomous Animals and their Venoms*. Academic Press, New York 3: 120-156, 1971.

PINTO, AFM, DOBROVOLSKI, R, VEIGA, ABG, GUIMARÃES, JA. Lonofibrase, a novel α -fibrinogenase from *Lonomia obliqua* caterpillars. *Thromb. Res.* 113: 147-154, 2004.

REIS, CV, KELEN, EM, FARSKY, SH, PORTARO, FC, SAMPAIO, CA, FERNANDES, BL, CAMARGO, AC, CHUDZINSKI-TAVASSI, AM. A Ca^{++} activated serine protease (Lopap) could be responsible for the haemorrhagic syndrome caused by the caterpillar *Lonomia obliqua*. *Lancet*, 42: 353-360. 1999.

REIS, CV, PORTARO, FCV, ANDRADE, AS, FRITZEN, M, FERNANDES, BL, SAMPAIO, CAM, CAMARGO, ACM, CHUDZINSKI-TAVASSI, AM. A prothrombin activator serine protease from the *Lonomia obliqua* caterpillar venom (Lopap). *Thromb. Res.* 102: 427-436, 2001.

REIS, CV, FARSKY, SH, FERNANDEZ, BL, SANTORO, ML, OLIVA, ML, MARIANO, M, CHUDZINSKI-TAVASSI, AM. *In vivo* characterization of Lopap, a prothrombin activator serine protease from the *Lonomia obliqua* caterpillar venom. *Thromb. Res.*, 102: 437-443. 2004.

REIS, CV, ANDRADE, SA, RAMOS, OHPR, RAMOS, CRR, HO, PL, BATISTA, IFC, CHUDZINSKI-TAVASSI, AM. Lopap, a prothrombin activator from *Lonomia obliqua* belonging to the lipocalin family: recombinant production, biochemical characterization and structure-function insights. *Biochemical Journal Immediate Publication*. (Manuscripto BJ20060325, publicado em 31 de maio de 2006).

RIBEIRO, JM, ANDERSEN, J, SILVA-NETO, MA, PHAM, VM, GARFIELD, MK, VALENZUELA, JG. Exploring the sialome of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 34: 61-79, 2004.

RILEY, CT, BARBEAU, BK, KEIM, PS, KCZDY, FJ, HEINRIKSON, RL, LAW, JH. The covalent protein structure of insecticyanin, a blue biliprotein from the hemolymph of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Journal of Biological Chemistry* 259, 13159-13165, 1984.

ROCHA-CAMPOS, AC, GONÇALVES, LR, HIGASHI, HG, YAMAGUSHI, IK, FERNANDEZ, I, OLIVEIRA, JE, RIBELA, MT, SOUSA-E-SILVA, MC, SILVA, WD DA. Specific heterologous F(ab')₂ antibodies revert blood incoagulability resulting from envenoming by *Lonomia obliqua* caterpillars. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 64: 283-289, 2001.

ROTHBERG, A. Lepidopterism in Brazil. In: Bücherl, W., Buckley, E.E. *Venomous Animals and their Venoms*, vol. 3. New York, Academic Press. p. 157-168, 1971.

ROSE, SES. FEPPS. Centro de Informação Toxicológica do Rio Grande do Sul. Relatório de Atendimento, 1998-2002. In: Nicoletta A, Ferreira E, Abella H, Lessa, C. Relatório de Atendimento. Porto Alegre: CIT/RS. pp 16, 2002.

SEIBERT, CS, OLIVEIRA, MR, GONÇALVES, LR, SANTORO, ML, SANOMARTINS, IS. *In vitro* hemolytic activity of *Lonomia obliqua* caterpillar bristle extract on human and wistar rat erythrocytes. *Toxicon*, 41: 831-839. 2003.

SEIBERT, CS, OLIVEIRA, MRL, GONÇALVES, LRC, SANTORO, ML, SANOMARTINS, IS. Intravascular hemolysis induced by *Lonomia obliqua* caterpillar bristle extract: an experimental model of envenomation in rats. *Toxicon* 44: 793-799, 2004.

SILVA, W D DA, CAMPOS, ACMR, GONÇALVES, LRC., SOUSA & SILVA, MCC, HIGASHI, HG, YAMAGUSHI, IK, KELEN, EMA. Development of an antivenom against toxins of *Lonomia obliqua* caterpillars. *Toxicon* 34: 1045-1049, 1996.

STEHR, FW. Order Lepidoptera. *In*: Sther FW, editor. *Immature Insects*. Dubuque, Yowa: Kendal/Hunt, pp 288 – 596, 1987.

TOWBIN, H, STAEHELIN, T, GORDON, J. Eletrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1979.

VEIGA, ABG, BLOCHTEIN, B, GUIMARÃES, JA. Structures involved in production, secretion and injection of the venom produced by the caterpillar *Lonomia obliqua* (Lepidoptera, Saturniidae). *Toxicon* 39: 1343-1351, 2001.

VEIGA, ABG, RIBEIRO, JMC, GUIMARÃES, JA, FRANCISCHETTI, IMB. 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, 2005.

VEIGA, ABG, RIBEIRO, JMC, FRANCISCHETTI, IMB, GUIMARÃES, JA, ANDERSEN, JF. *In situ* conversion of heme to biliverdin IX γ by an insect bilinbinding protein. Dados submetidos ao *The Journal of Biological Chemistry*, 2005.

VEIGA, ABG. Caracterização molecular dos componentes do veneno de *Lonomia obliqua*: genes expressos e princípios ativos envolvidos nos distúrbios da coagulação e da fibrinólise. Tese de Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS. 2005.

VULINEC, K. Collective security: aggregation by insects as a defense. *In*: Evans, D.L., Schmidt, J.O. (Eds.). *Insect Defenses - Adaptive Mechanisms and Strategies of Prey and Predators*. State University of New York, New York, pp. 251-288. 1990.

YUSIFOV, TN, ABDURAGIMOV, AR, GASIMOV, OK, GLASGOW, BJ.
Endonuclease activity in lipocalins. *Biochem. J.* 347: 815-819, 2000.

ZANNIN, M. Blood coagulation and fibrinolytic factors in 105 patients with hemorrhagic syndrome caused by accidental contact with *Lonomia obliqua* caterpillar in Santa Catarina, Southern Brazil. *Thromb. Haemost.* 89: 355-364, 2003.

ANEXOS:

Soluções e Tampões:

1. Tampão salina fosfato (PBS):

NaCl	4 g
Na ₂ HPO ₄	1,5 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
KCl	0,045 g
Água destilada	500 mL
Ajustar o pH para 7.2	

2. Tampão salina fosfato com Tween 20 (PBST):

NaCl	4 g
Na ₂ HPO ₄	1,5 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
KCl	0,045 g
Água destilada	500 mL
Tween 20	0.05%
Ajustar o pH para 7,2	

3. Tampão carbonato/bicarbonato 0.05M:

NaHCO ₃	0,735 g
Na ₂ CO ₃	0,4 g
Água destilada	250 mL

O pH deve ficar em torno de 9,6, não fazer o ajuste de pH.

4. Tampão Tris:

Tris base	6,06 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,147 g
Água destilada	1000 mL

Ajustar o pH para 8,2 adicionando HCl.

5. Tampão low ripa:

NaCl	0,87 g
EDTA.2H ₂ O (2 mM)	0,074 g
Triton X 100 (0.5%)	0,5 mL
Tris-HCl (20 mM)	0,24 g
PMSF (1 mM)	0,017 g
Água destilada	100 mL

6. Tampão ácido:

Na ₂ HPO ₄ 0,2M	3,5 mL
C ₆ H ₈ O ₇ · H ₂ O 0,1M	3,25 mL
H ₂ O ₂	5 µL
OPD	5 mg
Água destilada	5,7 mL

O OPD deve ser adicionado imediatamente antes do uso.

7. Tampão acetato de sódio 60mM, pH 4.0:

Acetato de sódio	0,816 g
Água destilada	200 mL

Utilizar ácido acético glacial para ajustar o pH a 4,0.

8. Tampão fosfato (20X):

Na ₂ HPO ₄ (14.196 g em 100 mL de dH ₂ O	77,4 mL
Na ₂ H ₂ PO ₄ (11,998 g em 100 mL de dH ₂ O)	22,6 mL.

9. Tampão Tris-Glicina:

Tris base	15 g/L
Glicina	72 g/L
SDS	5 g/L
Água destilada	1 L

O pH deve ficar em torno de 8,3, não ajustar o pH.

10. Tampão de amostra 4X:

Tris-HCl 0,5M, pH 6,8	1 mL
Glicerol	0,8 mL
SDS 10%	1,6 mL
Azul de bromofenol	0.4 mL
β -mercaptoetanol	0,4 mL
Água destilada	3,8 mL

Fracionar em alíquotas de 0,5 mL e congelar.

11. Gel de empilhamento a 4%:

Tris-HCl 250 mM, pH6,8	0,5 mL
Acrilamida/bisacrilamida (29.7% + 0.3%)	0,67 mL
SDS 10%	0,04 mL
APS 10%	0,04 mL
TEMED	0,004 mL
Água destilada	2,7 mL

12. Gel separador a 12%:

Tris-HCl 1,5 M, pH8,8	2,5 mL
Acrilamida/bisacrilamida (29,7% + 0,3%)	4,0 mL
SDS 10%	0,1 mL
APS 10%	0,1 mL
TEMED	0,004 mL
Água destilada	3,3 mL

13. Gel separador a 15%:

Tris-HCl 1,5 M, pH8,8	2,5 mL
Acrilamida/bisacrilamida (29,7% + 0,3%)	5,0 mL
SDS 10%	0,1 mL
APS 10%	0,1 mL
TEMED	0,004 mL
Água destilada	2,3 L

14. Solução de coloração:

Comassie Blue R-250	0,5 g
Metanol (40% v/v)	400 mL
Ácido acético glacial (7% v/v)	70 mL
Água destilada	1000 mL

15. Solução descorante:

Metanol (5% v/v)	50 mL
Ácido acético glacial (7% v/v)	70 mL
Água destilada	1000 mL

16. Solução de Revelação (com DAB):

DAB	5 mg
Tris-HCl 2M (pH 7,5)	100 µL
Imidazol 0,1 M	300 µL
H ₂ O ₂	5 µL
Água destilada	4,9 mL

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)