

LUCIENE ALVES MOREIRA MARQUES

**ESTUDO IMUNOQUÍMICO DO VENENO DA LAGARTA
LONOMIA OBLIQUA E DESENVOLVIMENTO DE UM ELISA
("ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY")
PARA DETECÇÃO DO VENENO**



**Dissertação de Mestrado
Universidade Estadual de Campinas**

LUCIENE ALVES MOREIRA MARQUES

**ESTUDO IMUNOQUÍMICO DO VENENO DA LAGARTA
LONOMIA OBLIQUA E DESENVOLVIMENTO DE UM ELISA
(“ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY”)
PARA DETECÇÃO DO VENENO**

*Dissertação de Mestrado apresentada ao
Curso de Pós-Graduação da Faculdade
de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas, para obtenção do
título de Mestre em Farmacologia.*

ORIENTADOR: PROF. DR. STEPHEN HYSLOP

**Universidade Estadual de Campinas, Campinas (SP)
1999**

20 0000365



UNIDADE	OC
N.º CHAMADA:	1/Unicamp
V.	Ex.
TOMBO BC	39860
PROC.	278/00
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	11/04/00
N.º CPD	

CM-00133184-1

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

M348e

Marques, Luciene Alves Moreira

Estudo imunológico do veneno da lagarta *Lonomia obliqua* e desenvolvimento de um Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) para detecção do veneno / Luciene Alves Moreira Marques. Campinas, SP : [s.n.], 1999.

Orientador : Stephen Hyslop

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

1. Lepidóptero. 2. Imunoensaio. I. Stephen Hyslop. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.



Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Prof. Dr. Stephen Hyslop

Membros:

1. Prof. Dr. Stephen Hyslop

2. Prof. Dra. Ana Marisa Chudzinski Tavassi

3. Prof. Dr. Fábio Bucarechi

Handwritten signatures in blue ink are present next to the names of the members. A signature is written above the first name, and two signatures are written above the second and third names. A long blue line extends from the bottom of the third signature down towards the date field.

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

Data: /10/99

DEDICATÓRIA

À Deus, que fortaleceu-me os passos e guiou-me nesta difícil caminhada, tornando possível a realização dos meus objetivos;

À minha mãe Alzira, que não mediu esforços para que meus objetivos fossem alcançados;

Ao meu marido Amilton, pelo apoio, carinho e incentivo nos momentos mais difíceis;

... dedico este trabalho

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

*Ao Prof. Dr. Stephen Hyslop, pela orientação,
paciência, e amizade;*

*Ao técnico José Ilton dos Santos, pela
paciência, dedicação, e colaboração;*

... agradeço com carinho.

AGRADECIMENTOS GERAIS

- À Deus pelo seu infinito amor e por suas bênçãos derramadas;
- À CAPES (Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela oportunidade de crescimento e pelo apoio financeiro;
- À Profa. Dra. Maria Esperança Rabelo Junqueira, Tutora do Grupo PET/CAPES (Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas), pelo incentivo e amizade;
- Aos Profs. Glenan Singi, Mauro de Mello Caram (Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas) e Fátima de Souza (Universidade de Alfenas), por terem me iniciado na Pesquisa Científica;
- Ao Prof. Dr. Antônio Carlos Bento (Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas), pelo incentivo e apoio no início desta caminhada;
- Ao Dr. Irineu Lorini (EMBRAPA, Passo Fundo, RS) e à Profa. Lisete Lorini (Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS), pelo envio das lagartas *L. obliqua* usadas neste trabalho;
- Ao Prof. Dr. Keith Brown (Departamento de Zoologia, IB, UNICAMP) pela identificação taxonômica da lagarta *Automeris rectilinea*;
- À Profa. Dra. Maria Alice da Cruz-Höfling (Departamento de Histologia e Embriologia, IB, UNICAMP) pelas fotos de microscopia de varredura das cerdas de *L. obliqua*;
- À Dra. Fan Hui Wen (Hospital Vital Brazil, Instituto Butantan) pelo fornecimento do soro anti-lonômico;
- À Dra. Carmen Arocha-Piñango (Instituto Venezuelano de Investigaciones Científicas, Caracas, Venezuela) pelo fornecimento de hemolinfa de *L. achelous*;
- À minha amiga Valéria, que sempre me apoiou em todos os momentos da minha vida;
- Aos meus amigos Maira, Lara, Cristiane, Simone, Alcyr, Maura e Marta pelo apoio;
- A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho;

... muito obrigada.

“Se tua mente se contempla na luz do saber, deves sempre agradecer por tamanha benção. Ela sempre te guiará para o futuro, onde encontrarás a plenitude de viver, pois poderás ajudar os menos lúcidos a encontrar o caminho dessa luz”.

(Autor desconhecido)

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	iv
LISTA DE FIGURAS E TABELAS	v
RESUMO	vii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Acidentes com animais peçonhentos.....	2
1.2. Biologia dos lepidópteros	4
1.3. Toxinologia dos lepidópteros	4
1.3.1. Organização e estrutura geral do aparato venenífero	4
1.3.2. Composição e origem dos venenos de lepidópteros.....	6
1.3.2.1. Pêlos espículas	6
1.3.2.2. Pêlos espinhos	7
1.3.2.3. Venenos em tecidos	9
1.4. Envenenamento por lepidópteros	9
1.4.1. Epidemiologia	9
1.4.2. Sinais e Sintomas	10
1.4.2.1. Dermatite.....	10
1.4.2.2. Lesões oftálmicas.....	11
1.4.2.3. Danos aos aparelhos respiratório e gastrintestinal	11
1.4.3. Tratamento	12
1.4.3.1. Remoção mecânica das cerdas venenosas.....	12
1.4.3.2. Tratamento medicamentoso.....	12
1.5. O erucismo no Brasil	13
1.6. A lagarta <i>Lonomia obliqua</i>	15
1.6.1. Descrição e biologia.....	15
1.6.2. Toxinologia	16
1.6.2.1. Estrutura do aparato venenífero.....	16

1.6.2.2. Composição e ação do veneno.....	19
1.6.3. Envenenamento por <i>L. obliqua</i>	21
1.6.3.1. Epidemiologia	21
1.6.3.2. Sinais e Sintomas	22
1.6.3.3. Tratamento	23
1.7. O ELISA como método diagnóstico.....	23
1.7.1. Princípios do método	23
1.7.2. Tipos de ELISA.....	24
1.7.2.1. ELISA sanduíche direto	24
1.7.2.2. ELISA indireto.....	26
1.7.3. Aplicabilidade do ELISA na toxinologia	26
2. OBJETIVOS	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
3.1. Reagentes e venenos	32
3.2. Animais	32
3.3. Obtenção de saliva, hemolinfa e extrato das cerdas.....	32
3.4. Caracterização imunoquímica do veneno de <i>L. obliqua</i>	33
3.4.1. Imunodifusão dupla	33
3.4.2. Imunoelektroforese.....	34
3.4.3. Imunoblot	34
3.4.3.1. Eletroforese.....	34
3.4.3.2. Transferência e detecção de proteínas.....	35
3.5. Preparação do conjugado	35
3.5.1. Purificação de IgG do soro anti- <i>Lonomia</i>	35
3.5.2. Conjugação de IgG à peroxidase.....	36
3.6. ELISA sanduíche direto	36
3.6.1. Descrição geral.....	36
3.6.2. Otimização dos parâmetros do ELISA	37
3.6.2.1. Determinação da diluição ótima de conjugado IgG anti- <i>Lonomia</i> acoplada à peroxidase.....	37

3.6.2.2. Diluição ótima de soro anti- <i>Lonomia</i>	38
3.6.2.3. Diluição ótima de antígeno.....	38
3.7. Cromatografia em Superdex 75.....	38
3.8. Cinética do extrato de cerdas de <i>L. obliqua</i>	39
4. RESULTADOS	40
4.1. Determinação do conteúdo proteico das amostras	41
4.2. Caracterização imunológica do veneno de <i>L. obliqua</i>	42
4.2.1. Imunodifusão dupla	42
4.2.2. Imunoeletroforese.....	42
4.2.3. Imunoblot.....	46
4.2.3.1. Eletroforese.....	46
4.2.3.2. Transferência e detecção de proteínas.....	46
4.3. Padronização do ELISA sanduíche direto	52
4.3.1. Preparação do conjugado IgG anti- <i>Lonomia</i> acoplada à peroxidase	52
4.3.2. Parâmetros do ensaio	52
4.3.3. Especificidade do ensaio.....	53
4.4. Cromatografia em Superdex 75.....	59
4.5. Cinética do extrato de cerdas de <i>L. obliqua</i>	59
5. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES GERAIS.....	62
6. SUMMARY.....	67
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70
8. ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO (em anexo)	

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

EACA:	ácido épsilon amino capróico
EDTA:	ácido etileno diamino tetra-acético
ELISA:	enzyme-linked immunosorbent assay
H ₂ O ₂ :	peróxido de hidrogênio
H ₂ SO ₄ :	ácido sulfúrico
HCl:	ácido clorídrico
HRPO:	peroxidase
i.d.:	intradérmico
i.v.:	intravenoso
OPD:	orto-fenilenodiamina
PBS:	tampão fosfato
PMSF:	fluoreto de fenilmetilsulfonila
s.c.:	subcutâneo
SDS:	dodecil sulfato de sódio
SL:	solução de lavagem
TEMED:	N,N,N'N'-tetrametiletlenodiamina
TI:	tampão de incubação
TL:	tampão de ligação

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

FIGURAS

Figura 1: Desenho esquemático de diferentes tipos de pêlos em lepidópteros.....	5
Figura 2: <i>Automeris</i> sp. (Saturnidae)*	8
Figura 3: Acidente com lagarta na mão e tronco. Eritema e edema na região de contato*	11
Figura 4: <i>Podalia</i> sp. (Megalopygidae)*	13
Figura 5: <i>Premolis semirufa</i> (Arctiidae)*	13
Figura 6: Lagarta de <i>Lonomia obliqua</i> (Saturnidae)*	14
Figura 7: Ovo, pupa e exemplares adultos, fêmea e macho de <i>Lonomia obliqua</i> *	15
Figura 8: Estrutura das cerdas da região posterior da lagarta <i>L. obliqua</i>	17
Figura 9: Estrutura das cerdas da região anterior da lagarta <i>L. obliqua</i>	18
Figura 10: Cascata da coagulação sanguínea e ação dos venenos de <i>L. obliqua</i> e <i>L. achelous</i>	20
Figura 11: Acidentes por <i>Lonomia</i> no Rio Grande do Sul*	21
Figura 12: Equimoses espontâneas e hematúria após o contato com <i>L. obliqua</i> *.....	22
Figura 13: Desenho esquemático do ELISA sanduíche direto e ELISA indireto.....	25
Figura 14: Imunodifusão do soro anti- <i>Lonomia</i> contra diversos venenos animais e do extrato de cerdas contra diversos antivenenos	43
Figura 15: Imunodifusão do soro anti- <i>Lonomia</i> contra os venenos de lagartas da família Saturnidae.....	44
Figura 16: Imunoeletroforese de extrato de cerdas, hemolinfa e saliva de espécies de saturnídeos	45
Figura 17: Eletroforese de extrato de cerdas, hemolinfa e saliva de espécies de saturnídeos	47

Figura 18: Imunoblot de extrato de cerdas e hemolinfa de <i>L. obliqua</i> , hemolinfa de <i>L. achelous</i> e hemolinfa de <i>A. rectilinea</i>	48
Figura 19: Imunoblot de extrato de cerdas, hemolinfa e saliva de <i>L. obliqua</i> , e de extrato de cerdas, hemolinfa e saliva de <i>A. rectilinea</i>	49
Figura 20: Imunoblot de extrato de cerdas de <i>L. obliqua</i> , <i>Bothrops jararaca</i> , <i>Crotalus durissus terrificus</i> , <i>Bothrops jararacussu</i> e <i>Bothrops neuwiedi</i>	50
Figura 21: Imunoblot de extrato de cerdas de <i>L. obliqua</i> e venenos de <i>Phoneutria nigriventer</i> e <i>Tityus serrulatus</i>	51
Figura 22: Purificação de IgG do soro anti- <i>Lonomia</i> e cinética enzimática do conjugado	54
Figura 23: Determinação dos parâmetros do ELISA sanduíche direto.....	55
Figura 24: Influência de soro e plasma humanos no ELISA direto e indireto.....	56
Figura 25: Reatividade cruzada do soro anti- <i>Lonomia</i> com diferentes venenos	57
Figura 26: Reatividade cruzada do extrato de cerdas e antivenenos comerciais	58
Figura 27: Cromatografia do extrato de cerdas, hemolinfa e saliva de <i>L. obliqua</i> e imunoreatividade das frações	60
Figura 28: Cinética do extrato de cerdas de <i>L. obliqua</i> em ratos (vias i.v., s.c. e i.d.).....	61

TABELAS

Tabela 1: Lepidópteros implicados em acidentes humanos e sua distribuição.....	3
Tabela 2: A sensibilidade de alguns ensaios de ELISA para quantificação de venenos animais	27
Tabela 3: Determinação do conteúdo proteico das amostras por vários métodos	41

* **Reconhecimento:** As figuras 2, 3, 4, 5, 6 e 12 foram retiradas do capítulo V – Acidentes por Lepidópteros do *Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos* (Ministério da Saúde, 1998) e as figuras 7 e 11 foram retiradas do Manual de Diagnóstico e Tratamento de acidentes por *Lonomia* (CIT, 1998).

Resumo

RESUMO

O envenenamento humano por lagartas de mariposas saturnídeas *L. obliqua*, leva a distúrbios hemostáticos, sendo o óbito, em geral, decorrente de insuficiência renal aguda ou de hemorragia maciça em órgãos nobres. Pouco se sabe sobre a composição bioquímica e imunológica do veneno destas lagartas. Esta dissertação descreve um estudo imunológico do veneno desta espécie, incluindo o desenvolvimento de um “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay” (ELISA) para detecção do veneno de *L. obliqua*.

As imunoreatividades do extrato de cerdas, hemolinfa e saliva de *L. obliqua* frente ao soro anti-*Lonomia* foram comparadas por imunodifusão de Ouchterlony, imunoelektroforese e imunoblot após SDS-PAGE. A reatividade do antiveneno com outros venenos animais também foi investigada. Na imunodifusão, o extrato de cerdas e hemolinfa mostraram várias linhas de imunoprecipitação, algumas das quais com completa identidade. A hemolinfa de *L. achelous* também reagiu com o antiveneno, mas em menor extensão, e mostrou algumas linhas de identidade parcial com a hemolinfa de *L. obliqua*. Com exceção do extrato de cerdas e hemolinfa da lagarta da mariposa saturnídea *A. rectilinea*, que mostrou fracas linhas de imunoprecipitação de não-identidade com o extrato de cerdas e hemolinfa de *L. obliqua*, não houve reação entre o soro anti-*Lonomia* e outros venenos animais testados. A imunoelektroforese essencialmente confirmou a imunoreatividade observada na imunodifusão. O Imunoblot mostrou que o perfil do extrato de cerdas foi semelhante ao da hemolinfa, particularmente na região de 45-205 kDa. O extrato de cerdas de *A. rectilinea* e as hemolinfas de *A. rectilinea* e *L. achelous* mostraram várias bandas semelhantes àquelas vistas com cerdas e hemolinfa de *L. obliqua*. Não houve reatividade com as salivas de *A. rectilinea* e *L. obliqua* nestes ensaios. Houve uma reatividade muito fraca (não específica) com os venenos de *P. nigriventer* e *T. serrulatus*, mas não ocorreu reatividade com venenos de serpentes.

Para o ELISA, placas multi-poço foram sensibilizadas com soro anti-*L. obliqua* (1:1000) “overnight”, lavadas e incubadas com extrato de cerdas, hemolinfa, saliva ou outros venenos animais. Após lavagem e incubação com IgG purificada por afinidade e conjugada à peroxidase (1:800), o substrato (o-fenilenodiamina) foi adicionado e a absorbância lida a 492 nm, após 30 min. Em alguns experimentos, o extrato de cerdas,

hemolinfa e saliva de *L. obliqua* foram fracionados por gel filtração em Superdex 75, equilibrada com tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,8 e a imunoreatividade das frações foi testada pelo ELISA.

A detecção limite para o extrato de cerdas no ELISA foi 0,5 - 1,0 $\eta\text{g/poço}$ (5 - 10 $\eta\text{g/ml}$) com resposta máxima com ≥ 2 $\mu\text{g/poço}$ (20 $\mu\text{g/ml}$). O coeficiente de variação intra-ensaio foi $< 5\%$. A hemolinfa de *L. obliqua* mostrou imunoreatividade quase idêntica à do extrato de cerdas. No entanto, a saliva não mostrou reatividade. Houve moderada reatividade cruzada com a hemolinfa de *L. achelous* e baixa reatividade cruzada com a hemolinfa e extrato de cerdas da lagarta saturnídea *A. rectilinea*. Não ocorreu reatividade cruzada com venenos de serpentes, aranha e escorpião em concentrações de até 100 $\mu\text{g/poço}$. A cromatografia de gel filtração em Superdex 75 mostrou que o extrato de cerdas e hemolinfa de *L. obliqua* possuem perfis de eluição muito semelhantes a 280 nm e imunoreatividade similar no ELISA. Ambos diferem marcadamente do perfil de eluição e imunoreatividade da saliva.

A administração i.v. do extrato de cerdas de *L. obliqua* em ratos (400 $\mu\text{g/kg}$) mostrou rápido declínio nos níveis circulantes de antígenos nas primeiras 2 h, seguido por diminuição progressiva até as 16 h quando tornaram-se não detectáveis. Quando a mesma dose foi injetada s.c., houve variação considerável nos níveis séricos de antígenos com picos observados em 0,5, 4 e 16 h após a injeção. O perfil cinético obtido com a administração i.d. foi semelhante àquele visto com a injeção i.v., embora os níveis absolutos de antígenos tenham sido muito menores.

Estes resultados mostram que há pouca ou nenhuma reatividade cruzada entre o soro anti-*L. obliqua* e venenos animais não saturnídeos. As semelhanças de imunoreatividades do extrato de cerdas e hemolinfa sugerem que o veneno pode ser derivado da hemolinfa e que esta poderia ser uma fonte útil e mais acessível para a purificação de fatores que afetam a cascata de coagulação. A sensibilidade e a especificidade do ELISA desenvolvido pode ser útil para imunodiagnóstico na clínica, embora o tempo após o envenenamento e a quantidade de veneno injetado possam ser um dos fatores limitantes na detecção de antígenos circulantes, como mostrado pelos experimentos cinéticos em ratos.

1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Acidentes com animais peçonhentos

No Brasil, entre os acidentes causados por animais peçonhentos, os acidentes ofídicos são os de maior importância médica, em virtude da gravidade e de sua frequência (20.000 casos/ano). Acidentes causados por escorpiões (8.000 casos/ano) ou aranhas (4.000 casos/ano) também são frequentes e oferecem potencial gravidade, principalmente em crianças. A incidência dos acidentes causados por himenópteros (abelhas, vespas e formigas) não é conhecida, embora a hipersensibilidade provocada pela picada destes insetos seja de grande importância médica. Nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste do país, existe uma alta frequência de acidentes com coleópteros, peixes e celenterados, sendo estes acidentes em geral, subnotificados (Ministério da Saúde, 1998).

Da mesma forma, os acidentes causados por lepidópteros têm sido subnotificados, o que dificulta o seu real dimensionamento. Existem mais de duzentas espécies irritativas de lepidópteros que estão amplamente distribuídas em áreas tropicais, subtropicais e temperadas do mundo (Tabela 1). Geralmente, o veneno destes animais não causam sintomas tão graves como aqueles produzidos por serpentes, aranhas, abelhas e escorpiões; no entanto, o número de vítimas pode ser bem maior quando ocorre um surto epidêmico (Kawamoto e Kumada, 1984). De maneira geral, fatalidades decorrentes dos acidentes com lepidópteros são raras, mas podem ocorrer se o tratamento de emergência e hospitalização não forem instituídos. Dormência, indisposição, náuseas, vômitos, dor de cabeça, taquicardia, rinite e prurido generalizado tem sido notados como resultado de acidentes com *Megalopyge*, *Thaumetopoea*, *Euproctis* e *Hylesia* (Kawamoto e Kumada, 1984). Atualmente, os acidentes causados por espécies do gênero *Lonomia* têm merecido atenção especial no Brasil, devido à gravidade dos sintomas de envenenamento. Além do distúrbio de coagulação causado por estas lagartas, as vítimas podem desenvolver insuficiência renal aguda, podendo evoluir a óbito (Arocha-Piñango *et al.*, 1988; Kelen *et al.*, 1995).

Tabela 1: Lepidópteros implicados em acidentes humanos e sua distribuição.

GÊNEROS/ESPÉCIES	DISTRIBUIÇÃO
SUPERFAMÍLIA ZYGAENOIDEA	
Família Zygaenidae	
<i>Chalcosia remota</i> (Walker)	Extremo Oriente
<i>Erasmia pulchella fritzei</i> Jordan	Extremo Oriente
<i>Illiberis rotundata</i> Jordan	Japão
Família Megalopygidae	
<i>Euryda variolarus</i>	Brasil
<i>Megalopyge</i> sp	América do Sul, EUA, Porto Rico
<i>Podalia</i> sp	América do Sul
Família Limacodidae	
<i>Doratifera</i> sp	Austrália
<i>Latoia</i> sp	Ásia, África, EUA, Extremo Oriente
<i>Monema flavescens</i> (Walker)	Extremo Oriente, EUA
SUPERFAMÍLIA NOCTUOIDEA	
Família Arctiidae	
<i>Premolis semirufa</i> (Walker)	América do Sul
<i>Adolia</i> sp	América do Norte
Família Noctuidae	
<i>Acronicta</i> sp	Europa, Extremo Oriente, EUA
<i>Catocala cara</i>	EUA
Família Lymantriidae	
<i>Euproctis</i> sp	Europa, Austrália, América do Norte, Japão
Família Nolidae	
<i>Uraba lugens</i> (Walker)	Austrália
Família Thaumetopoeidae	
<i>Anaphe</i> sp	África, Europa
<i>Enaphe</i> sp	África
<i>Thaumetopoea</i> sp	Espanha, Israel, Ásia
SUPERFAMÍLIA BOMBYCOIDEA	
Família Anthelidae	
<i>Anthela nicothoe</i> (Boisduval)	Austrália
<i>Chelepteryx collesi</i> (Gray)	Austrália
Família Saturniidae	
<i>Automeris</i> sp	América do Sul, EUA
<i>Dirphia</i> sp	Peru, Bolívia, América do Sul
<i>Hylesia</i> sp	América Central, América do Sul, EUA
<i>Lonomia</i> sp	Venezuela, Guiana, Brasil
Família Lasiocampidae	
<i>Dendrolimus</i> sp	Europa, Japão, Extremo Oriente
<i>Cyclophragma</i> sp	Extremo Oriente e Japão
Família Eupterotidae	
<i>Panacela levinae</i> (Lewin)	Austrália
SUPERFAMÍLIA PAPILIONOIDEA	
Família Nymphalidae	
<i>Morpho</i> sp	América do Sul
<i>Nymphalis antiopa</i> (L.)	EUA, Europa

Fonte: Kawamoto e Kumada (1984).

1.2. Biologia dos lepidópteros

Os lepidópteros sofrem completa metamorfose, e seu ciclo de vida consiste em 4 estágios: ovo, larva (lagarta), pupa e adulto. Normalmente as cerdas venenosas aparecem no segundo ínstar ou instares mais tardios da larva. Muitas espécies tornam-se inofensivas nos estágios de pupa e adultos. Ao emergir do casulo, os adultos de várias espécies perdem suas cerdas irritantes e tornam-se inofensivos. Somente poucas espécies, incluindo aquelas do gênero *Euproctis* e *Acyphas*, permanecem nocivas no estágio adulto, com cerdas venenosas. Estes adultos são importantes do ponto de vista epidemiológico, devido à sua habilidade de voar e entrar em contato com humanos. Além disso, as fêmeas destas espécies deixam cerdas venenosas em seus ovos para proteção dos mesmos. Assim, todas as espécies do gênero *Euproctis* e *Acyphas* são nocivas por toda sua vida, desde a fase de ovo até se tornarem adultos. Em alguns gêneros, inclusive *Hylesia*, espículas venenosas são formadas no estágio adulto e transferidas para os ovos e larvas de primeiro ínstar (Kawamoto e Kumada, 1984).

1.3. Toxinologia dos lepidópteros

1.3.1. Organização e estrutura geral do aparato venenífero

A inoculação do veneno dos lepidópteros nas vítimas, geralmente ocorre através das cerdas ou pêlos. Estas cerdas geralmente desenvolvem-se a partir de células tricógenas (células formadoras do pêlo), diferenciadas de células da epiderme. Os pêlos rígidos são chamados de cerdas e os lisos são chamados de escamas. O pêlo articula-se com uma estrutura rígida formada por uma célula tormógena, a qual também é diferenciada de células epidérmicas. A membrana articulante consiste de uma proteína elástica que deixa livre os pêlos para o movimento.

Funcionalmente, existem dois tipos de pêlos de insetos: mecano-receptor e mecano-quimiorreceptor. Em ambos os casos os pêlos são formados por várias camadas de cutículas secretadas pela célula tricógena. A parede de pêlos completamente formada consiste de epicutícula, exocutícula e endocutícula e envolve um lúmen vazio e pouco material

granular é observado no interior da parede do pêlo (Kawamoto e Kumada, 1984). A figura 1 mostra a organização esquemática dos diferentes tipos de pêlos irritantes em lepidópteros.

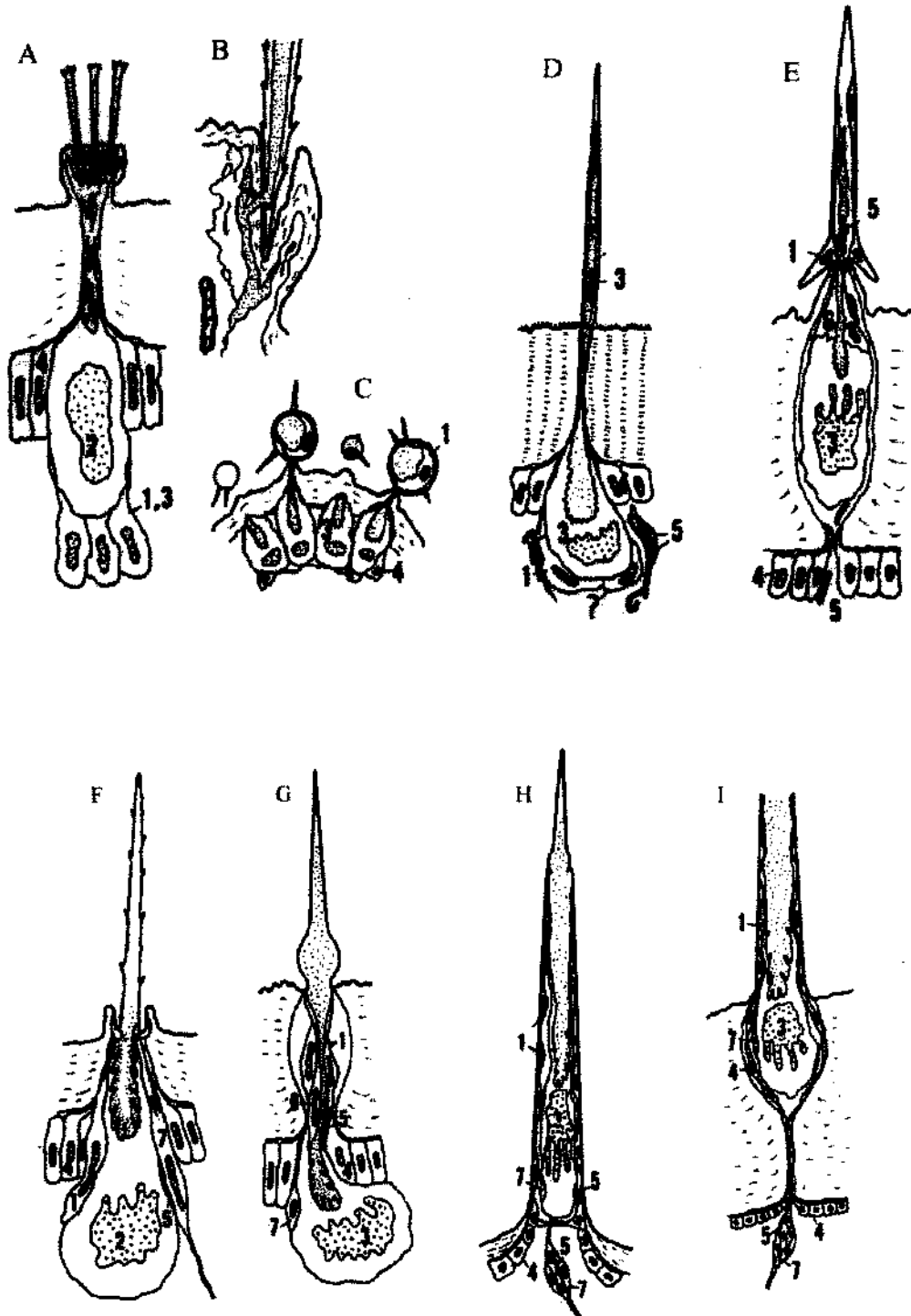


Figura 1: Desenho esquemático de diferentes tipos de pêlos em lepidópteros. A,B - espícula de *Euproctis*, C - pêlo em forma de estrela, D - espícula de *Dendrolimus*, E - espícula de *Latoia*, F - pêlo normal, G - espinho de *Balataea*, H - espinho de *Latoia* durante a mutação, I - espinho de *Latoia* após a mutação. Os números indicam: 1 - célula tricógena, 2 - célula tormógena, 3 - célula secretora de veneno, 4 - célula epidermal, 5 - célula traqueal, 6 - célula sustentadora, 7 - célula nervosa. Fonte: Kawamoto e Kumada (1984).

1.3.2. Composição e origem dos venenos de lepidópteros

1.3.2.1. Pêlos espículas

Gênero *Thaumetopoea*: Lamy *et al.* (1986) realizaram um estudo comparativo entre o extrato de cerdas, extrato cuticular e hemolinfa de *T. pityocampa*. Um total de 16 proteínas foram detectadas no extrato de cerdas por eletroforese em poliacrilamida. Mais de 25 proteínas foram identificadas no extrato cuticular, das quais, sete frações com baixa massa molecular não estavam presentes no extrato de cerdas. Cinco frações com massa molecular de 52.000 a 700.000 Da foram isoladas da hemolinfa da lagarta (no último estágio larval). As proteínas de alta massa molecular presentes no extrato de cerdas apresentaram similaridade com as proteínas da hemolinfa, enquanto que as proteínas de baixa massa molecular mostraram similaridade com as do extrato cuticular. Entretanto, uma proteína de peso molecular aproximadamente 28.000 Da foi encontrada apenas no extrato de cerdas. Esta proteína foi chamada de thaumetopoeína e possui duas subunidades de 13.000 e 15.000 daltons. O extrato das cerdas de *T. processionea* foi analisado por Lamy (1990). Foram separadas 17 frações proteicas, das quais 6 frações possuem alta massa molecular. Uma proteína semelhante à thaumetopoeína, com massa molecular aproximadamente 14.000 Da, foi encontrada nas glândulas urticantes de *T. processionea*.

Gênero *Euproctis*: Um estudo comparativo entre os venenos extraídos dos pêlos de *E. chrysoorhoea* e *E. subflava*, realizado por De Jong *et al.* (1982), demonstrou que estes venenos possuem atividades esterásica, proteolítica e fosfolipásica. A atividade fosfolipásica pode estar associada à alguma proteína de alta massa molecular. Sob as condições do ensaio, o veneno de *E. subflava* mostrou menor atividade fosfolipásica que o veneno de *E. chrysoorhoea*. As proporções dos diferentes tipos de proteases destes venenos variam entre as espécies (Bleumink *et al.*, 1982).

Gênero *Hylesia*: Sabe-se pouco sobre a natureza química do veneno do gênero *Hylesia*. No entanto, alguns pesquisadores da América do Sul relataram que os venenos (extraídos dos pêlos) de *Hylesia urticans* e *H. nigricans* são solúveis em água e insolúveis

em álcool e éter. Através de análise cromatográfica do veneno de *H. fulviventris*, foi detectado um componente, o qual parece ser uma alergina (Pesce e Delgado, 1971).

Outros gêneros: O extrato de espículas de *Latoia* foi submetido a processos de purificação, sendo que a histamina foi identificada como componente da fração de baixa massa molecular. A fração de alta massa molecular, foi separada em três picos proteicos capazes de induzir dor. A histamina também foi detectada no extrato bruto de *Dendrolimus spectabilis*, embora a presença desta substância no veneno de espécies dos gêneros *Cyclophragma* e *Dendrolimus* seja controversa (Kawamoto e Kumada, 1984).

1.3.2.2. Pêlos espinhos

Gênero *Megalopyge*: Em 1971, Picarelli e Valle demonstraram a presença de agentes hemolíticos e agentes que aumentam a permeabilidade vascular no extrato de cerdas de *Megalopyge* sp. A atividade máxima destes agentes ocorreu em pH 6,0 com perda de atividade em pH 2,0 ou pH 10,0. Estas substâncias são precipitadas pelo sulfato de amônio a 75% e digeridas pela tripsina, quimotripsina e pepsina, e portanto são de natureza proteica. Sugere-se que os efeitos produzidos pelo veneno de *Megalopyge* sp. são devidos à presença de mediadores químicos, que não sejam histamina, serotonina e acetilcolina. Cininas, cininogenases e calicreínas não foram detectadas no extrato de cerdas.

Gênero *Dirphia*: Picarelli e Valle (1971) demonstraram a presença de histamina no veneno de *Dirphia*. O conteúdo de histamina foi estimado em 0,086 a 0,172 µg por espinho. Entretanto, o efeito observado no envenenamento não foi compatível com o conteúdo estimado de histamina, indicando a presença ou liberação de outras substâncias farmacologicamente ativas. A acetilcolina não foi encontrada no veneno, mesmo em preparações mais sensíveis como músculo reto abdominal de sapo ou pelo efeito na pressão sanguínea de cão e gato. Os efeitos do extrato de cerdas sobre a pressão sanguínea poderiam talvez ser explicados pela liberação de compostos adenil. No entanto, ainda não há estudos conclusivos sobre este aspecto.

Gênero *Latoia*: O veneno dos espinhos de *Latoia* sp possui substâncias causadoras da dor, tais como serotonina, acetilcolina e cininas. O extrato bruto do espinho de *Latoia consocia* contém frações proteicas de alta e baixa massa molecular capazes de produzir dor quando testadas na pele de humanos (Kawamoto e Kumada, 1984).

Gênero *Automeris* (Figura 2): A estimulação mecânica das cerdas de *Automeris illustris* resulta na liberação de um líquido claro e transparente. A presença de serotonina no veneno de *A. illustris* tem sido relatada bem como o envolvimento de histamina ou substâncias liberadoras de histamina em lesões produzidas por *Automeris io* (Kawamoto e Kumada, 1984).



Figura 2: *Automeris* sp (Saturnidae)

Gênero *Lonomia*: O primeiro estudo sobre *Lonomia* foi feito por Arocha-Piñango e Layrisse (1969) que encontraram atividades fibrinolítica, caseinolítica e ativação do plasminogênio no extrato das cerdas, hemolinfa e saliva da lagarta da mariposa *L. achelous*. Uma fração ativa possuindo atividade caseinolítica e fibrinolítica foi submetida à purificação e uma proteína com massa molecular estimada em 16.000 – 18.000 Da foi obtida com as mesmas atividades. A propriedade mais forte desta enzima foi a lise rápida do fibrinogênio na presença de agentes desnaturantes como uréia 8,0 M e SDS 2%. Existem especulações de que a enzima possa liberar cininas em lesões de pele, uma vez que dor intensa ocorre após o contato com a lagarta desta espécie. Os primeiros estudos com o extrato de cerdas de *L. obliqua* demonstraram que este possui atividade pró-coagulante dose-dependente. Estes estudos revelaram também que o cálcio exerce efeito de potencialização da atividade sugerindo a formação intrínseca de trombina por ativação de

um ou mais fatores da coagulação (Kelen *et al.*, 1995). A toxicologia destas lagartas será melhor discutida nos itens 1.5 e 1.6.

1.3.2.3. Venenos em tecidos

Os venenos dos lepidópteros podem estar presentes em tecidos como glândulas secretórias e cavidades onde a hemolinfa circula. Estas substâncias venenosas são classificadas em duas categorias: (1) aquelas produzidas e secretadas pelo próprio inseto e utilizadas como defesa contra predadores e (2) criptotoxinas, derivadas da alimentação de plantas (Kawamoto e Kumada, 1984).

1.4. Envenenamento por lepidópteros

1.4.1. Epidemiologia

De maneira geral, as larvas de lepidópteros são fitófagas e por isso, consideradas pragas na agricultura. Entretanto, algumas espécies possuem grande importância médica. O acidente causado pelo contato com lepidópteros adultos é denominado de lepidopterismo e o acidente causado por larvas ou lagartas é denominado de erucismo.

Do ponto de vista epidemiológico, surtos epidêmicos de espécies irritativas que podem entrar em contato com humanos são o aspecto mais importante. Espécies conhecidas por infestar áreas populosas e que causam problemas de saúde pública pertencem geralmente aos gêneros *Euproctis*, *Thaumetopoea*, *Hylesia*, *Automeris*, *Megalopyge* e *Latoia*. Atualmente, acidentes por espécies do gênero *Lonomia* têm merecido atenção especial no Brasil, devido à gravidade dos sintomas de envenenamento.

Os insetos lepidópteros ocorrem principalmente em áreas rurais, mas também são encontrados em jardins, parques, pomares e árvores em áreas residenciais urbanas. Em áreas rurais, o erucismo é considerado como doença ocupacional dos trabalhadores do campo. Nas cidades, porém, grande número de vítimas tem sido relatadas frequentemente. Foram observados surtos causados por lagartas *Latoia consocia* em Nagoya, de 1975 a 1980 e de *Monema flavescens* em Okazaki, de 1976 a 1977. Um grande número de casos de envenenamento por *Megalopyge* sp (taturanas gatinho) foi descrito no Texas em 1913 e

1920 (Pinson e Morgan, 1991). O erucismo atinge com maior frequência crianças do que adultos, pois a coloração variada das lagartas fascina as crianças, levando-as ao toque.

Algumas espécies de lepidópteros pertencentes aos gêneros *Hylesia*, *Anaphe*, *Enaphe*, *Epicoma*, *Gazalina*, e *Euproctis* causam dermatite através das cerdas de seus adultos bem como de suas larvas. No entanto, a maioria das espécies epidemiologicamente importantes são do gênero *Hylesia* e *Euproctis*. Em 1955, mais de 150.000 pessoas de Nagoya sofreram dermatite causada por mariposas *E. subflava*. Em 1975-76, *E. pseudoconspersa* causou dermatite em pelo menos 20.000 pessoas em Hiroshima e Toyohashi. Uma grande epidemia causada por *E. similis* aconteceu em Shanghai em 1972 (Kawamoto e Kumada, 1984). No Brasil, no período de dezembro/1989 a janeiro/1990, foram registrados 612 casos de dermatite pápulo-pruriginosa causada por *Hylesia paulex* no litoral do Estado de São Paulo, Bertioga (Cardoso *et al.*, 1990).

1.4.2. Sinais e Sintomas

1.4.2.1. Dermatite

As lesões na pele causadas por lagartas e mariposas são agudas e mais frequentes em partes expostas do corpo. Estas lesões variam dependendo da espécie causadora, do tipo de cerdas, sítio e extensão do contato e a sensibilidade das vítimas. Os sinais iniciais de dermatite podem ser classificados em três grupos:

O primeiro grupo de sintomas incluem irritação e prurido causados pela lesão mecânica e reação a corpos estranhos. A penetração de cerdas na pele causa danos ao tecido cutâneo que levam à liberação de substâncias autacóides. Em poucos minutos, o prurido pode surgir em decorrência da liberação de histamina. As cerdas venenosas, quando em contato com a pele, quebram-se liberando o veneno e causando eritema e edema (Figura 3).

O segundo grupo inclui sintomas causados pela maioria dos espinhos venenosos e algumas espículas. O primeiro sintoma é ardência ou sensação de ferroada.

O último grupo de sintomas inclui uma sensação de queimação com dor intensa imediatamente após o contato com as lagartas (Kawamoto e Kumada, 1984).

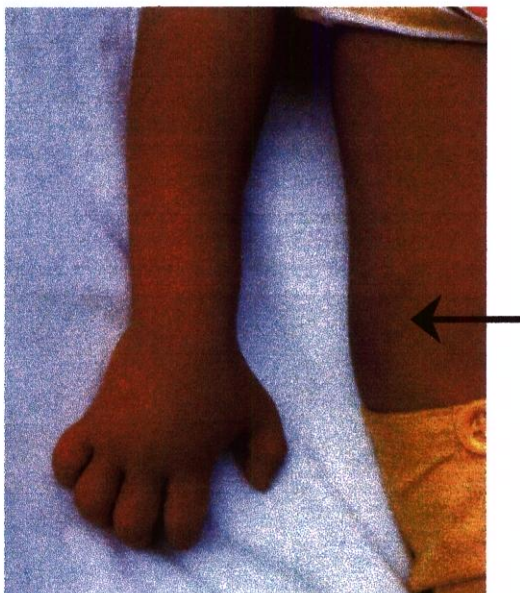


Figura 3: Acidente com lagarta na mão e tronco. Eritema (seta) e edema na região de contato.

1.4.2.2. Lesões oftálmicas

As cerdas de lagartas podem penetrar no tecido ocular e causar conjuntivite ou queratite, acompanhada de fotofobia, lacrimejamento, eritema e edema das pálpebras. Os pacientes com cerdas intra-oculares necessitam de cuidados oftalmológicos para que não ocorra prejuízo da visão. Com tratamento adequado, a inflamação regride em 7 ou 10 dias (Kawamoto e Kumada, 1984).

1.4.2.3. Danos aos aparelhos respiratório e gastrintestinal

Os problemas respiratórios são causados pela inalação de cerdas espículas flutuantes no ar. Os sintomas são devidos à rinofaringite e bronquite e incluem dor faringiana, rinorréia, tosse, espirros, dispnéia e febre.

Intensa estomatite ou enterite foi observada em humanos e animais que ingeriram acidentalmente lagartas do gênero *Thaumetopoea* e *Hemileuca* (Kawamoto e Kumada, 1984).

1.4.3. Tratamento

1.4.3.1. Remoção mecânica das cerdas venenosas

A primeira escolha de tratamento é lavar o local em água corrente. Submergir o corpo em água é recomendado para lesões provocadas por *Hylesia*. Na maioria das lesões com grande número de espículas, a sensação de ferroada não é aliviada com este tratamento. No Japão, em tais casos é recomendado que elas sejam removidas diretamente com pinça sob lupa (Kawamoto e Kumada, 1984).

1.4.3.2. Tratamento medicamentoso

No envenenamento causado por *Megalopyge* sp, recomenda-se o tratamento tópico com anti-histamínicos para aliviar o prurido. Os tratamentos mais eficazes no alívio da dor incluem a administração de analgésicos opióides, administração via intramuscular de acetonido de triamcinolona ou administração de dez mililitros de gluconato de cálcio a 10%, por via intravenosa. Entretanto, as loções à base de calamina e ácido acetilsalicílico tem sido usados com pouco sucesso no alívio da dor e da inflamação (Pinson e Morgan, 1991; Gardner e Elston, 1997).

No envenenamento causado por *Hylesia* sp, recomenda-se o tratamento com anti-histamínicos por via oral além do uso de compressas frias e cremes a base de corticosteróides no local acometido (Ministério da Saúde, 1998).

De maneira geral, a dermatite causada por contato com lagartas de vários gêneros requer as seguintes medidas de tratamento: lavagem da região com água fria, infiltração local com anestésico tipo lidocaína a 2%, compressas frias, elevação do membro acometido, corticosteróides tópicos e anti-histamínicos orais (Ministério da Saúde, 1998).

1.5. O erucismo no Brasil

As principais famílias de lepidópteros causadoras do erucismo no Brasil são a Megalopygidae, Saturnidae e Arctiidae.

Os megalopigídeos (Figura 4), popularmente conhecidos como sauí, lagartas de fogo, taturana-gatinho ou taturana-de-flanela, produzem manifestações predominantemente dermatológicas, que dependem da espécie causadora da irritação, do tipo de cerdas, da intensidade e extensão do contato e da sensibilidade das vítimas. Os sintomas mais comuns são dor local intensa, edema, eritema e prurido. Em alguns casos ocorre linfadenopatia, cefaléia e convulsões (Pinson e Morgan, 1991; Gardner e Elston, 1997).



Figura 4: *Podalia* sp. (Megalopygidae)

Na família Arctiidae estão incluídas as lagartas *Premolis semirufa* ou pararama (Figura 5), causadoras da pararamose ou reumatismo dos seringueiros, até o momento restrita à região Amazônica. O acidente com a pararama leva, em alguns casos, à lesões crônicas que comprometem as articulações falangeanas, levando a deformidades com incapacidade funcional (Ministério da Saúde, 1998).



Figura 5: *Premolis semirufa* (Arctiidae)

Na América do Sul, os acidentes mais graves envolvem espécies do gênero *Lonomia*, família Saturniidae (Pinto Moraes, 1992; Kelen *et al.*, 1995). A maioria dos estudos até o momento têm sido direcionados para a espécie *Lonomia achelous*, encontrada no Norte do Brasil, Guianas e Venezuela (Arocha-Piñango e Layrisse, 1969; Arocha-Piñango *et al.*, 1981, 1988, 1992; Guerrero *et al.*, 1997). O veneno desta lagarta possui potente atividade fibrinolítica sobre o plasma, podendo este efeito permanecer até um mês após o acidente. Além disso, o veneno atua diminuindo a concentração de fibrinogênio, fatores V, XII (Hageman), XIII e plasminogênio, aumenta os produtos da degradação do fibrinogênio, consome protrombina e aumenta a formação de trombina sugerindo um quadro de síndrome fibrinolítica severa associada à coagulação intravascular disseminada (Guerrero e Arocha-Piñango, 1992). Dois ativadores distintos de protrombina já foram caracterizados na hemolinfa de *L. achelous* (Guerrero e Arocha-Piñango, 1992) e duas isoenzimas com atividade fibrinolítica (aquelase I e II) foram isoladas e sua sequência de aminoácidos determinada (Amarant *et al.*, 1991). A espécie *Lonomia obliqua* (Figura 6), que difere da *L. achelous* pela morfologia da genitália masculina, é encontrada principalmente no Sul do Brasil, nos Estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, mas também nos Estados de São Paulo (Bucarechi *et al.*, 1997) e Paraná (Kelen *et al.*, 1995). O veneno da *L. obliqua* contém pelo menos duas atividades: ativação do fator X e ativação de protrombina cálcio-dependente, levando o indivíduo à síndrome hemorrágica (Donato *et al.*, 1998). O veneno atua diminuindo a concentração de fibrinogênio, fator V e XIII, proteína C, plasminogênio e α_2 antiplasmina (Kelen, 1996). Além dos distúrbios hemorrágicos, o indivíduo pode apresentar insuficiência renal aguda (Duarte *et al.*, 1990, Burdmann *et al.*, 1996).



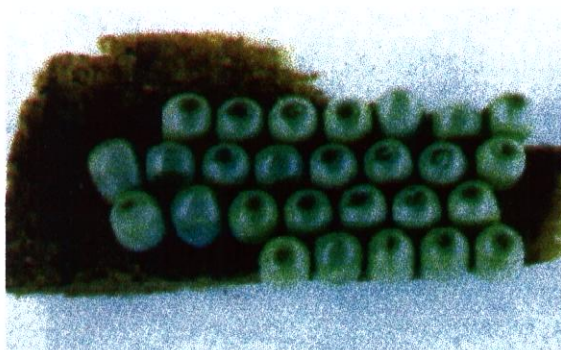
Figura 6: Lagarta de *Lonomia obliqua* (Saturniidae)

1.6. A lagarta *Lonomia obliqua*

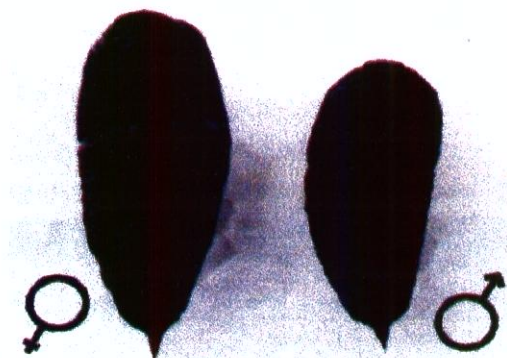
1.6.1. Descrição e biologia

As lagartas *Lonomia obliqua*, conhecidas por oruga ou rugas (Sul do Brasil), apresentam cerdas em forma de espinhos ramificados e pontiagudos de aspecto arbóreo, simetricamente dispostos ao longo do dorso. Apresentam tonalidade marrom esverdeada, exibindo no dorso e nas suas laterais manchas e listras características, muitas vezes mimetizando as plantas em que habitam. O ciclo biológico da *Lonomia* sp é composto por quatro fases distintas:

- Ovo: 30 dias de período embrionário (Figura 7A),
- Larva (lagarta): aproximadamente 59 dias, sendo encontrada nos troncos das árvores e arbustos, apresentando hábitos gregários. Este estágio que é dividido em seis fases de desenvolvimento denominadas ínstaes é onde ocorre a maioria dos acidentes (Figura 6),
- Pupa: por períodos de aproximadamente 45 dias permanece em dormência no solo (Figura 7B),
- Adulta: vive cerca de 15 dias e após o acasalamento ocorre a oviposição (Figura 7C, D).



A



B



C



D

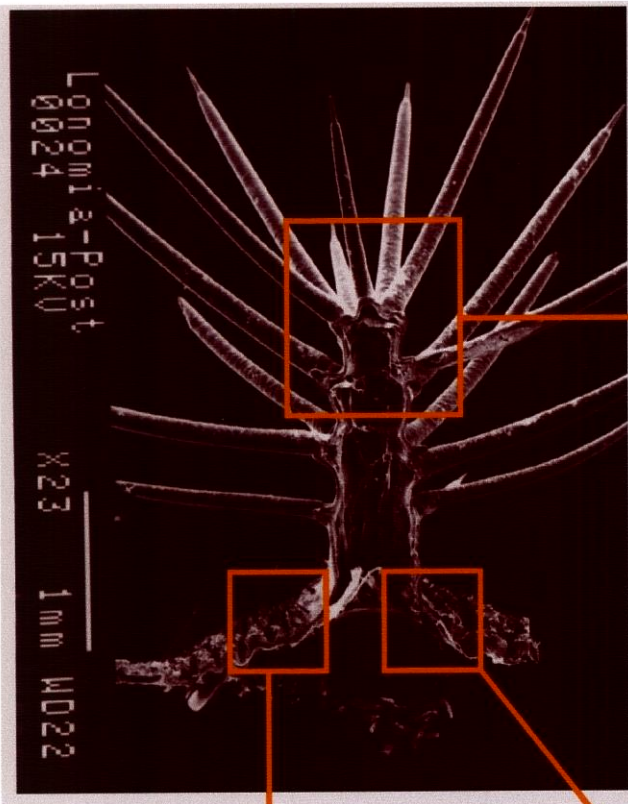
Figura 7: Ovos (A), Pupas (B), exemplares adultos, fêmea (C) e macho (D) de *L. obliqua*.

1.6.2. Toxinologia

1.6.2.1. Estrutura do aparato venenífero

Pouco se sabe sobre o mecanismo de produção e injeção do veneno das lagartas *L. obliqua*. As figuras 8 e 9 mostram a organização geral das cerdas de *L. obliqua* por microscopia de varredura. Os pêlos da região posterior da lagarta (Figura 8A) são formados por uma estrutura rígida central com várias ramificações simples. Com um aumento de 100x, observa-se um canal no interior do pêlo central o qual se comunica com os canais do interior das ramificações (Figura 8B). Como o sistema circulatório do animal é aberto, a hemolinfa poderia circular por estes canais. Nas figuras 8C e D observa-se que no tegumento da lagarta, existem vários pêlos com tamanhos variados invisíveis a olho nu. Os pêlos da região anterior da lagarta (Figura 9A), possuem uma disposição diferente dos pêlos da região posterior da lagarta, pois são mais ramificados. Embora ainda não se saiba exatamente o mecanismo pelo qual estas lagartas ejetam seu veneno, é possível que ao entrarem em contato com a pele do indivíduo, os pêlos se quebrem (no local indicado pela seta) liberando assim o veneno (Figura 9B). De maneira geral, as cerdas de *L. obliqua* são muito semelhantes às de *L. achelous* (Arocha-Piñango *et al.*, 1988).

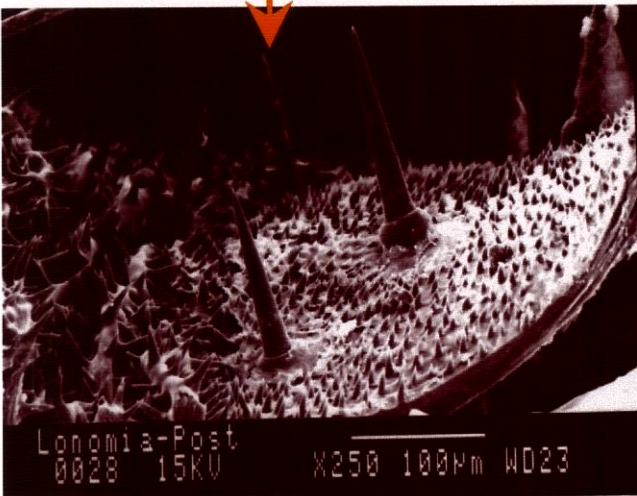
A



B



C



D

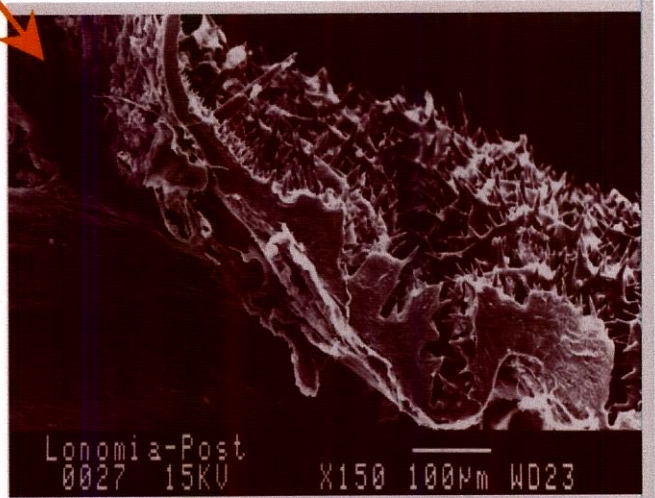
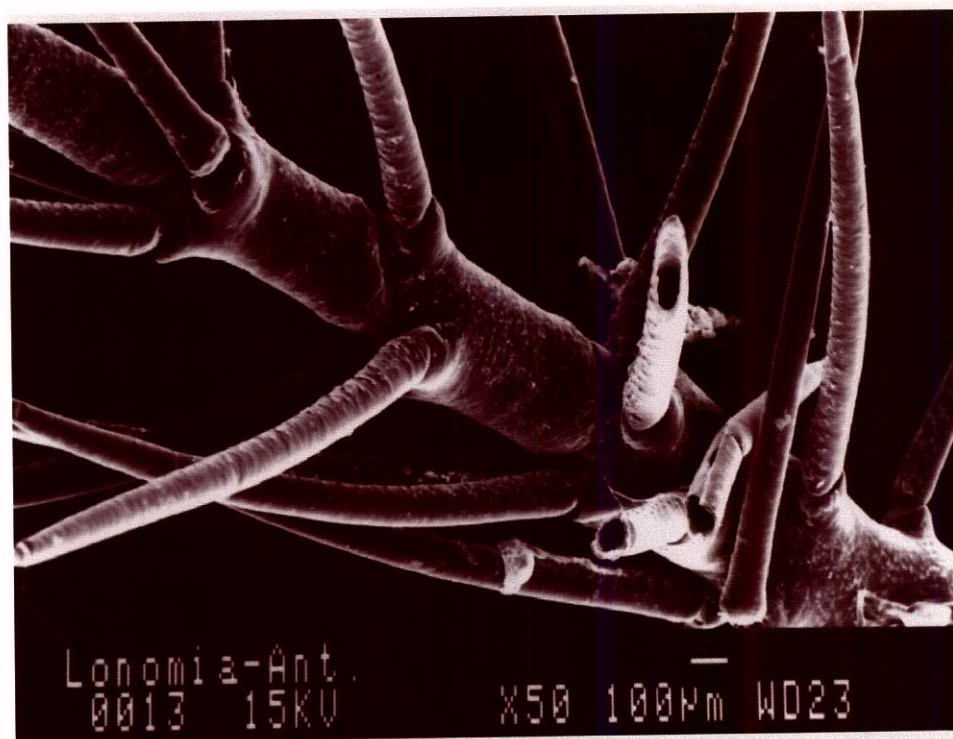


Figura 8: Estrutura das cerdas da *L. obliqua*. Estrutura de cerda da região posterior da lagarta, com aumento de 23x e 100x, respectivamente (A) e (B), tegumento da lagarta mostrando cerdas de tamanhos variados (C) e (D). Fotos: cortesia da Dra. Maria Alice da Cruz-Höfling.

A



B

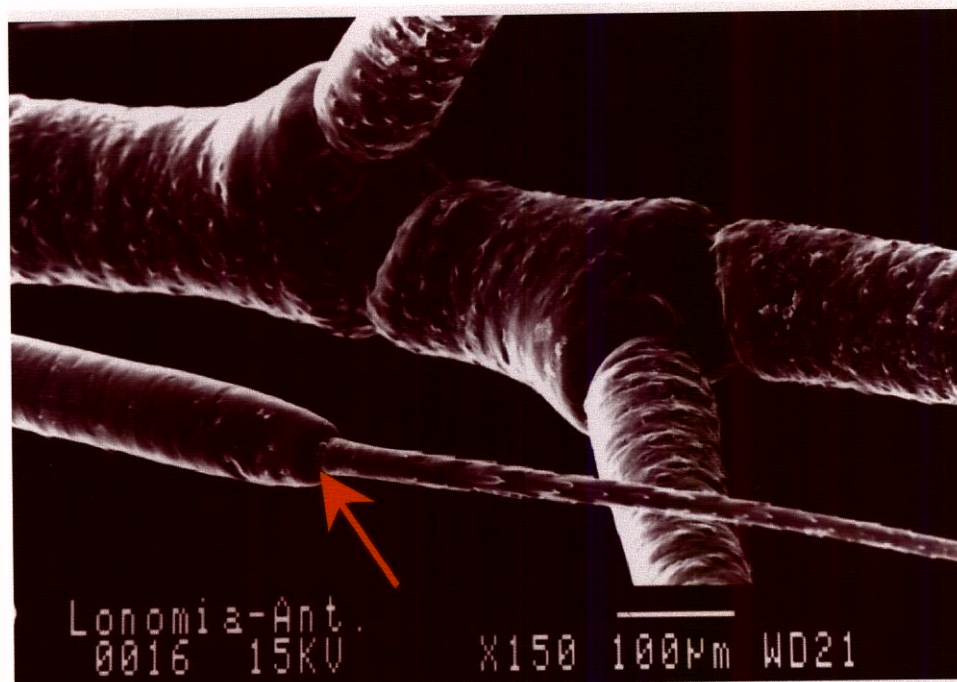


Figura 9: Estrutura das cerdas da *L. obliqua*. Cerdas da região anterior da lagarta, 50 x (A), ramificação de uma cerda anterior mostrando estreitamento e ponto de ruptura (seta) da cerda na região terminal, 150x (B). Fotos: cortesia da Dra. Maria Alice da Cruz-Höfling.

1.6.2.2. Composição e ação do veneno

Sabe-se muito pouco sobre a composição e o mecanismo de ação do veneno da lagarta *L. obliqua*. Recentemente, foi demonstrado que o extrato de cerdas possui duas atividades: ativação do fator X e ativação de protrombina cálcio dependente (Figura 10), o que pode contribuir para a alteração da coagulação observada em acidentes causados por esta espécie (Donato *et al.*, 1998).

Em estudos preliminares realizados por Reis, 1998, foi verificado que a concentração proteica necessária para promover a ativação do fator X era aproximadamente três vezes maior que a necessária para ativar o fator II (protrombina), sugerindo que o componente ativador da protrombina é o principal fator envolvido no defeito de coagulação. O ativador do fator II foi purificado à homogeneidade, é uma proteína de cerca de 69.000 Da mais sensível à inibição por PMSF (inibidor de proteases séricas), e tem sua atividade afetada por EDTA e ortofenantrolina (inibidores de metaloproteases). Esta proteína, denominada LOPAP produz *in vivo*, incoagulabilidade sanguínea e formação de trombos na microcirculação (Reis *et al.*, 1999). O ativador de protrombina LOPAP, atua diretamente sobre a protrombina e somente o Ca^{2+} potencia sua ação. Este ativador não sofre influência de outros componentes do complexo protrombinase, mostrando ser um ativador semelhante àqueles encontrados nos venenos de *Echis carinatus*, *Bothrops atrox* e *B. neuwiedi*.

Um estudo realizado com a hemolinfa de *L. achelous*, revelou que o ativador de protrombina da hemolinfa bruta e das frações II e IV obtidas por cromatografia em Sephadex G-75, são ativadores diretos da protrombina semelhantes àqueles encontrados nos venenos de *E. carinatus*, *B. atrox* e *B. neuwiedi*. Entretanto, a fração I atua similarmente ao fator Xa fisiológico e ativadores presentes no veneno de *Notechis*, cuja atividade é aumentada na presença de fator V, Ca^{2+} e fosfolipídios (Figura 10)(Guerrero e Arocha-Piñango, 1992). As frações II e III da hemolinfa possuem atividade fibrinolítica. Recentemente foi relatado que a lonomina V, uma fração purificada do veneno de *L. achelous*, degrada o fator XIII e contribui para a síndrome hemorrágica (Guerrero *et al.*, 1997).

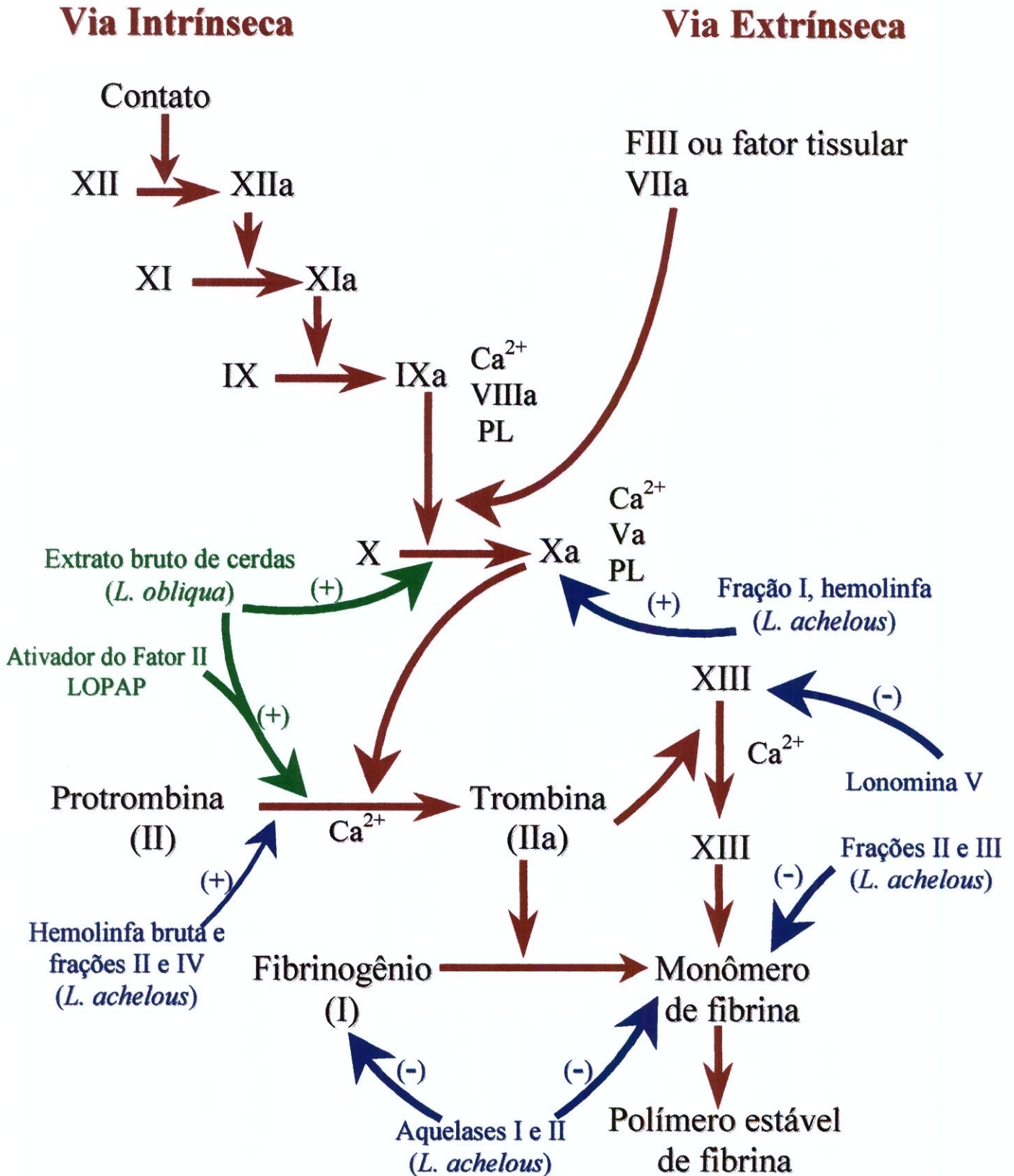


Figura 10: Cascata de coagulação sanguínea e ação de componentes presentes nos venenos de *L. obliqua* (verde) e *L. achelous* (azul). (+): ativação, (-): degradação.

1.6.3. Envenenamento por *L. obliqua*

1.6.3.1. Epidemiologia

Em 1989, uma alta incidência de vítimas com síndrome hemorrágica provocada por acidentes com lagartas *L. obliqua* foi descrita na área rural dos Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, no Sul do Brasil. Alguns acidentes também foram notificados no Estado do Paraná. As lagartas causadoras destes acidentes foram encontradas habitando árvores frutíferas destas regiões.

O número elevado de acidentes pode ser justificado, possivelmente, pelo aumento no processo de desflorestamento para implantação das lavouras de soja. Em uma pesquisa realizada no Estado do Rio Grande do Sul, verificou-se que aproximadamente 90 mil hectares são devastados todo ano para implantação das lavouras. Conseqüentemente, os lepidópteros difundiram das florestas para as árvores frutíferas das fazendas, aumentando o risco de contato com o homem. Outra possível explicação para a alta incidência de acidentes, é o uso de inseticidas para proteção das lavouras, levando à destruição do predador natural destas lagartas (Fraiha Neto *et al.*, 1992; Kelen *et al.*, 1995).

Os acidentes com lagartas do gênero *Lonomia* vem crescendo a cada ano, como mostra a Figura 11. No ano de 1997 no Rio Grande do Sul foram registrados 110 acidentes, em 1998, até o mês de maio, foram registrados 169 acidentes.

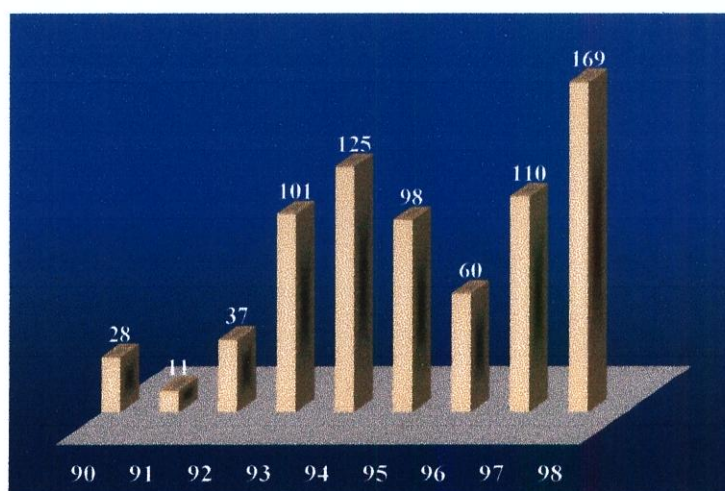


Figura 11: Acidentes por *Lonomia* no Rio Grande do Sul, de 1990 a maio de 1998.

Fonte: Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por *Lonomia*. Centro de Informação Toxicológica (CIT).

1.6.3.2. Sinais e Sintomas

Após o contato das vítimas com as lagartas, ocorre dor local intensa, cefaléia occipital, náuseas e mal-estar. Em casos de envenenamento sistêmico, equimoses aparecem na área de contato com a lagarta, de 8 a 72 h após os primeiros sintomas, ocorrendo hemorragias de mucosas, hematúria e epistaxes (Figura 12). Em alguns pacientes foi observado acidente vascular cerebral (Duarte *et al.*, 1996) e hemorragia pulmonar. A vítima pode ainda desenvolver insuficiência renal aguda (Duarte *et al.*, 1990, Burdmann *et al.*, 1996). De acordo com a intensidade dos distúrbios hemostáticos, o acidente pode ser classificado em:

- Leve: o paciente apresenta apenas manifestações locais, sem alteração da coagulação sanguínea;
- Moderado: manifestações locais, alteração da coagulação ou manifestações hemorrágicas na pele ou mucosas;
- Grave: alteração na coagulação com manifestações hemorrágicas viscerais, com alterações hemodinâmicas e/ou falência de múltiplos órgãos ou sistemas (Ministério da Saúde, 1998).

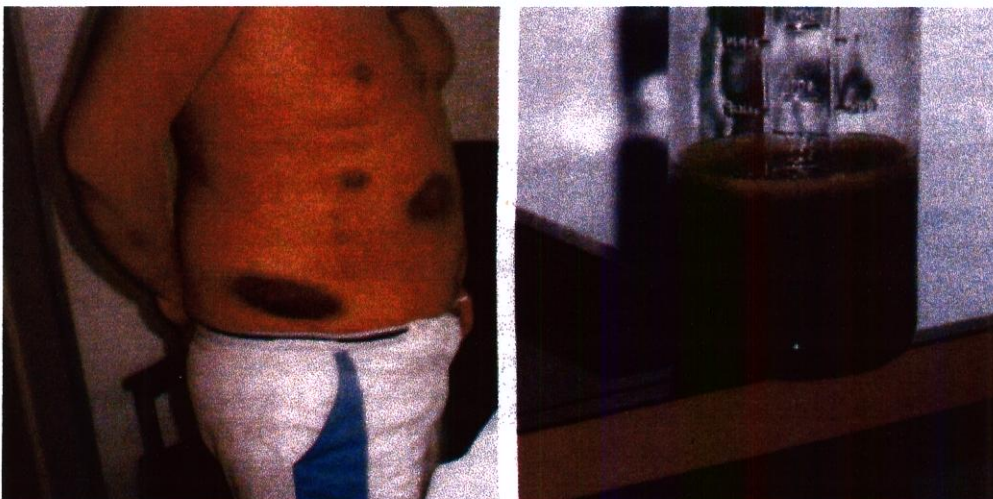


Figura 12: Equimoses espontâneas e hematúria após o contato com *L. obliqua*.

1.6.3.3. Tratamento

O Manual do Ministério da Saúde, recomenda o uso de agentes antifibrinolíticos em vítimas de taturanas hemorrágicas. O ácido épsilon-aminocapróico (EACA) pode ser administrado por via intravenosa na dose de 30 mg/kg de peso como dose inicial, seguida de 15 mg/kg a cada 4 h até a normalização da coagulação. A correção da anemia pode ser feita com a administração de concentrado de hemácias (Ministério da Saúde, 1998).

Devido à gravidade dos acidentes com *L. obliqua* e eficácia questionável dos esquemas de tratamento acima mencionados, o Instituto Butantan produziu um soro específico contra o veneno de *L. obliqua*, através da imunização de cavalos com extrato das cerdas desta lagarta (Dias da Silva *et al.*, 1996). Um estudo comparativo mostrou que o soro anti-lonômico é superior ao EACA, reduzindo significativamente o tempo de internação dos pacientes, com rápida normalização das provas de coagulação (Duarte *et al.*, 1997a, 1997b).

As reações adversas que seguem a injeção de soro heterólogo hiperimune são conhecidas, mas estas reações podem ser minimizadas significativamente por medidas de controle apropriadas. No entanto, o mais importante, é que estas reações são vistas como um problema bem menor quando comparadas à potencial gravidade dos sintomas oriundos do envenenamento por *L. obliqua* (Dias da Silva *et al.*, 1996).

1.7. O ELISA (“enzyme-linked immunosorbent assay”) como método diagnóstico

1.7.1. Princípios do método

O desenvolvimento do ELISA depende de quatro princípios:

- a) Formação de imunocombinados: uma variedade de enzimas, incluindo peroxidase, fosfatase alcalina, urease, β -galactosidase e penicilinase G podem ser ligadas ao anticorpo ou antígeno sob condições que preservem as propriedades biológicas, ou seja, interação com o substrato, ligação com antígeno e antigenicidade de ambos os componentes do conjugado, enzima e anticorpo.
- b) Capacidade de ligação do antígenos: a maioria dos antígenos, por exemplo, proteínas, peptídeos, polissacarídeos e lipopolissacarídeos de bactérias, ligam-se espontaneamente a superfícies plásticas das microplacas de poliestireno. Uma vez ligados à superfície

plástica, os antígenos ou anticorpos resistem a várias lavagens para remoção de material não ligado.

- c) Ligação do imunocjugado aos antígenos: em passos subsequentes, o imunocomplexo é formado, sendo o material não ligado removido por lavagem com tampão.
- d) Interação com o substrato: uma enzima conjugada ao antígeno ou anticorpo quando ligada ao imunocomplexo fica disponível para interação com o substrato. A adição do substrato específico, resulta em um aumento progressivo da cor da solução. Esta coloração pode ser comparada visualmente com padrões ou ainda pode-se fazer a determinação da densidade ótica em leitor específico para este fim (Catty e Raykundalia, 1989).

1.7.2. Tipos de ELISA

1.7.2.1. ELISA sanduíche direto

Inicialmente a microplaca é sensibilizada com uma quantidade fixa de anticorpo. Após a incubação, os orifícios são lavados para retirar o anticorpo não ligado. Subsequentemente, o antígeno é adicionado em uma única diluição ou em diluições seriadas. O complexo antígeno-anticorpo é detectado pela adição de um anticorpo específico conjugado a uma enzima (peroxidase ou fosfatase alcalina). Após uma última lavagem, o substrato específico para a enzima usada, é adicionado e a cor (absorbância) devida à hidrólise do substrato é proporcional à concentração de antígeno presente na amostra (Figura 13A) (Theakston, 1983). Este ensaio é ideal para certas preparações de antígenos que não podem ser ligados diretamente às microplacas, ou seja, preparações com baixa concentração proteica e/ou com alta concentração de contaminantes proteicos (Crowther, 1995).

Dentre as várias técnicas de ELISA, a mais sensível é, em teoria, o ELISA sanduíche. Entretanto, uma limitação deste ensaio é a diminuição da especificidade quando o fator reumatóide está presente na amostra de soro analisada. Este fator propicia um resultado falso positivo, ou aumenta a intensidade da reação. Uma vez que, esta reação envolve o segmento Fc da molécula de anticorpo, este efeito inespecífico pode ser eliminado empregando-se uma enzima acoplada aos fragmentos Fab ou Fab' do anticorpo (Clark e Engvall, 1980).

A

1. Ligação do anticorpo à fase sólida



2. Lavagem

3. Incubação com amostra contendo antígeno



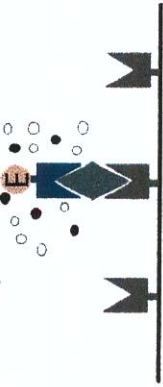
4. Lavagem

5. Incubação com anticorpo conjugado à enzima



6. Lavagem

7. Incubação com substrato e leitura da absorbância



B

1. Ligação do antígeno à fase sólida



2. Lavagem

3. Incubação com amostra contendo anticorpo



4. Lavagem

5. Incubação com Anti-IgG conjugado à enzima



6. Lavagem

7. Incubação com substrato e leitura da absorbância



Figura 13: Desenho esquemático do ELISA sanduíche direto (A) e ELISA indireto (B). Fonte: Clark e Engvall (1980).

1.7.2.2. ELISA indireto

O ELISA indireto é usado na detecção e/ou titulação de anticorpos específicos em fluídos biológicos e em soros. Uma quantidade fixa de antígeno é ligado à fase sólida, e após a incubação, os orifícios da microplaca são lavados para eliminar o antígeno não ligado. Em seguida, é adicionado o anticorpo numa única diluição ou em diluições seriadas. O complexo antígeno-anticorpo é detectado através de imunoglobulina anti-espécie conjugada à enzima. Neste caso, a hidrólise do substrato é proporcional à quantidade de anticorpo presente na amostra (Figura 13B) (Crowther, 1995).

A especificidade deste método é determinada pelo antígeno na fase sólida, o qual pode ser altamente purificado e caracterizado ou relativamente bruto e não caracterizado.

1.7.3. Aplicabilidade do ELISA na toxinologia

Os venenos de animais podem ser detectados por vários métodos: imunodifusão, imunofluorescência, hemaglutinação passiva, transformação de linfócitos, imunoelektroforese, eletroforese contra-corrente ou radioimunoensaio. No entanto, nenhum destes métodos até o momento, é tão satisfatório quanto o ELISA que foi introduzido na toxinologia no final dos anos 70 e início dos anos 80 (Theakston, 1983; Ho *et al.*, 1986; Chippaux e Goyffon, 1998; Selvanayagam e Gopalakrishnakone, 1999). Desde sua descrição inicial, a técnica tem sido constantemente refinada. Atualmente, o ELISA é o método de rotina mais rápido, sensível e de baixo custo empregado na toxinologia.

O ELISA é uma técnica versátil para estudos clínicos e epidemiológicos do envenenamento por animais peçonhentos e para pesquisa de aspectos imunológicos do veneno em geral (Tabela 2).

O ELISA tem sido muito usado na detecção e/ou titulação de venenos animais e de componentes (parcialmente) purificados (Bober e Ownby, 1988; Labrousse *et al.*, 1988; Barral-Neto *et al.*, 1990; Tan *et al.*, 1992; Chávez-Olórtegui *et al.*, 1993, 1997; Rezende *et al.*, 1995; Amuy *et al.*, 1997). A maioria dos ELISAs desenvolvidos são para detecção de venenos de serpentes, entretanto alguns ensaios já foram desenvolvidos para venenos de artrópodes tais como os escorpiões *Androctonus australis garzonii* e *Buthus occitanus* (Krifi

et al., 1998) e *Tityus serrulatus* (Barral-Netto *et al.*, 1991; Chávez-Olórtegui *et al.*, 1994; Rezende *et al.*, 1995); e a aranha *Loxosceles intermedia* (Chávez-Olórtegui *et al.*, 1998).

Tabela 2: A sensibilidade de alguns ensaios de ELISA para quantificação de venenos animais.

Espécie	Amostra	Sensibilidade (ng/ml)	Referência
Serpentes			
<i>Agkistrodon b. blomhoffii</i>	Soro de camundongos	50,0	Watanabe <i>et al.</i> (1988)
<i>Bothrops jararaca</i>	Soro de camundongos	14,6	Barral-Netto <i>et al.</i> (1990)
<i>B. lanceolatus</i>	Soro humano	7,0	Bucher <i>et al.</i> (1997)
<i>Calloselasma rhodostoma</i> , <i>Trimeresurus albolabris</i>	Soro humano	10,0-20,0	Silamut <i>et al.</i> (1987)
<i>C. rhodostoma</i>	PBS	5,0	Tan <i>et al.</i> (1992)
<i>Crotalus d. terrificus</i> (crotoxina)	Soro de camundongos	2,2	Barral-Netto e von Sohsten (1991)
<i>Daboia r. siamensis</i>	Soro humano	10,0	Tun-Pe <i>et al.</i> (1991)
<i>Lachesis muta muta</i>	Soro de camundongos	10,0	Chávez-Olórtegui <i>et al.</i> (1993)
<i>Micrurus n. nigrocinctus</i>	Fluídos biológicos	4,0	Amuy <i>et al.</i> (1997)
<i>Vipera ammodytes</i>	Sangue de coelhos	1,0	Labrousse <i>et al.</i> (1988)
<i>V. aspis</i>	Soro humano, sangue e urina	1,0	Audebert <i>et al.</i> (1992)
<i>V. berus berus</i>	Plasma humano	0,8	Sjostrom <i>et al.</i> (1996)
Artrópodes			
<i>Loxosceles intermedia</i>	Soro de camundongos	16,0	Chávez-Olórtegui <i>et al.</i> (1998)
<i>Tityus serrulatus</i>	Soros humano e camundongos	2,0	Barral-Netto <i>et al.</i> (1991) Chávez-Olórtegui <i>et al.</i> (1994)

Outras aplicações do ELISA incluem o diagnóstico do gênero/espécie envolvido no acidente (Chávez-Olórtegui *et al.*, 1997), estudos epidemiológicos, estudos de cinética dos venenos ou componentes purificados (Maung-Maung-Thwin *et al.*, 1988, Barral-Netto e von Sohsten, 1991, Guo *et al.*, 1993). O ELISA também tem sido usado para estudos de determinação da potência de neutralização do antissoro específico (Maria *et al.*, 1998), detecção de antiveneno injetado (monitorização do tratamento) (Amaral *et al.*, 1997), comparação imunológica entre venenos (Kalapothakis e Chávez-Olórtegui, 1997), avaliação

da imunização ativa em animais examinando a especificidade de anticorpos para frações isoladas de veneno e monitorização da produção de anticorpos monoclonais.

Alguns estudos mais recentes mostraram que o uso de biossensores (imunossensores) pode ser uma alternativa às técnicas convencionais de enzima-imunoensaio, como maneira de evitar alguns problemas do ELISA, como valores de branco elevados ou falsos positivos (Selvanayagam e Gopalakrishnakone, 1999).

2. Objetivos

2. OBJETIVOS

Considerando a gravidade dos acidentes causados por *L. obliqua* e que pouco se sabe da composição imunológica do seu veneno, este trabalho teve como objetivos:

- (1) investigar a composição imunoquímica do extrato das cerdas, hemolinfa e saliva de *L. obliqua*, comparando-os com outros venenos animais.
- (2) desenvolver um ELISA capaz de detectar as proteínas/toxinas envolvidas no envenenamento experimental.
- (3) estudar a reatividade do soro anti-*Lonomia* frente a outros venenos.
- (4) estudar a cinética do veneno em ratos envenenados experimentalmente por administração i.v., s.c., e i.d. do extrato de cerdas de *L. obliqua*.

3. Materiais e Métodos

3. MATERIAIS e MÉTODOS

3.1. Reagentes

γ -Globulina, 4-cloro-1-naftol, ácido bicinconínico, acrilamida, ágar, agarose, albumina bovina, amidoschwartz, anticorpo de coelho do tipo IgG anti-cavalo acoplado à peroxidase, azul brilhante de Coomassie R, azul de bromofenol, bis-acrilamida, borohidreto de sódio, carbonato de sódio, caseína (caprina e bovina), coluna HiTrap Sepharose-proteína G, dodecil sulfato de sódio (SDS), gelatina, glicina, membranas de nitrocelulose (0,45 μ m), N,N,N'N'-tetrametiletenodiamina (TEMED), O-fenilenodiamina (OPD), periodato de sódio, peroxidase, persulfato de amônio, placas multi-poço (Corning, 96 poços, fundo chato), Ponceau S, Sephadex G-25, Trizma base, Tween 20 e os padrões de massa molecular para eletroforese, foram comprados da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). A resina Superdex 75 foi adquirida da Pharmacia Biotech (Uppsala, Suécia). Os soros anti-aracnídico, -botrópico, -crotálico, -elapídico, -escorpiônico e -lonômico foram obtidos do Instituto Butantan (São Paulo, SP) ou da Fundação Ezequiel Dias (FUNED, Belo Horizonte, MG). Os outros reagentes foram obtidos de fornecedores nacionais. Os venenos de serpentes e artrópodes eram provenientes de estoques mantidos no Departamento de Farmacologia (FCM-UNICAMP).

3.2. Animais

Ratos machos Wistar (200-300 g) foram obtidos do Biotério Central da UNICAMP. Todos os animais receberam água e ração *ad libitum* durante os experimentos.

As lagartas *Lonomia obliqua* coletadas nos arredores da cidade de Passo Fundo, foram fornecidas pelo Dr. Irineu Lorini (EMBRAPA, Passo Fundo, RS) e Profa. Lisete Lorini (Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS).

3.3. Obtenção de saliva, hemolinfa e extrato de cerdas

A saliva (na realidade uma mistura de saliva e conteúdo estomacal) foi obtida massageando-se suavemente a superfície ventral dos animais com o auxílio de pinça. A saliva foi coletada com micropipeta e colocada em tubos Eppendorf, sobre gelo. A

hemolinfa foi obtida após punção da superfície ventral do animal com agulha fina, tendo-se o cuidado de não contaminar as cerdas com este fluido. Subsequentemente, os animais foram sacrificados rapidamente em nitrogênio líquido e as cerdas foram removidas cortando-as na base. As cerdas, hemolinfa e saliva coletadas foram armazenadas à -20°C.

Para a obtenção do extrato, as cerdas foram maceradas em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,8, sobre gelo. Em seguida, centrifugou-se a mistura à 2000 x g à 4°C por 30 min (centrífuga Hermle ZK 340). O sobrenadante (extrato) foi separado e aliqotado em tubos Eppendorf de 1,5 ml e armazenado a -20°C (Donato *et al.*, 1993, 1998).

O conteúdo proteico das amostras foi determinado por três métodos diferentes: pela absorbância a 280 nm (Stoscheck, 1990), pelo método de Lowry simplificado (Peterson, 1977) e pelo método do ácido bicinconínico (Stoscheck, 1990). Entretanto, o método usado neste estudo foi o do ácido bicinconínico por ser uma técnica rápida de fácil execução. A técnica do ácido bicinconínico é semelhante ao ensaio de Lowry que depende da conversão do cobre (II) a cobre (I), sob condições alcalinas. O ácido bicinconínico tem a vantagem de ser relativamente estável, enquanto que o Folin-Ciocalteu é instável em pH alcalino. Assim, o ácido bicinconínico pode ser incorporado à solução de cobre, simplificando o ensaio. Albumina bovina foi usada como padrão nestes ensaios.

3.4. Caracterização imunoquímica do veneno de *L. obliqua*

3.4.1. Imunodifusão dupla

A reação foi desenvolvida em gel de ágar 1% em NaCl 0,15 M. A reatividade cruzada do extrato de cerdas foi avaliada através de difusão do mesmo contra o soro anti-*Lonomia* e outros antivenenos (e também de diferentes venenos contra o soro anti-*Lonomia*). A reatividade da hemolinfa e saliva frente ao soro anti-*Lonomia* também foi estudada. As lâminas foram incubadas em câmara úmida à temperatura ambiente por 48 h e, em seguida lavadas em NaCl 0,15 M à temperatura ambiente por 24 h, secadas em estufa à 37°C por 36 h, coradas com amidoschwartz 0,4% em solução de ácido acético 10% por 10 min e descoradas usando-se o mesmo solvente à 5% (Clausen, 1988).

3.4.2. Imunoeletroforese

A reação foi desenvolvida em gel de agarose 1% em Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0. As amostras foram diluídas no mesmo tampão e aplicadas à placa. A corrida eletroforética foi realizada à temperatura ambiente com voltagem fixada em 120 V durante 90 min. Após a corrida, foram feitas canaletas no gel para adição de soro anti-*Lonomia*. A reação foi desenvolvida em câmara úmida por 48 h. Terminada a incubação, as lâminas foram lavadas e coradas conforme descrito no método de imunodifusão (Clausen, 1988).

3.4.3. Immunoblot

3.4.3.1. Eletroforese

A eletroforese foi desenvolvida em mini-gel de poliacrilamida contendo SDS (Hames, 1990), usando-se um sistema descontínuo em placa vertical (Mighty Small II, Bio-Rad, San Francisco, CA, EUA). O gel de resolução com concentração de poliacrilamida de 10%, foi preparado sob um gel de empacotamento de acrilamida a 3%.

As amostras foram diluídas em tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8 contendo SDS 2%, glicerol 10% e azul de bromofenol 0,03%, e fervidos durante 5 min. Aliquotas de 15 a 20 μ l foram aplicadas ao gel. A corrida eletroforética foi realizada à temperatura ambiente com voltagem fixada em 100 V, até o azul de bromofenol atingir 0,5 cm do final do gel.

Após a corrida eletroforética, alguns géis foram fixados com solução de etanol 40% e ácido acético 10% (v/v). Em seguida, foram corados com solução de azul brilhante de Coomassie R 250 0,1% em ácido acético 10%. O excesso de corante foi eliminado utilizando-se a mesma solução de fixação do gel. A técnica de coloração pela prata (Garfin, 1990) também foi utilizada em alguns géis, fixando-os em metanol 40% e ácido acético 10% (v/v) por 30 min e em seguida etanol 10% e ácido acético 5% (v/v) por 15 min. Os géis foram pré-tratados com tiosulfato de sódio 0,02% (e não com dicromato de potássio como recomenda a técnica) por 10 min e a solução de nitrato de prata a 0,012 M foi acrescentada. Após 30 min, as bandas de proteína foram visualizadas em carbonato de sódio 0,28 M e paraformaldeído 1,85% por aproximadamente 1 min. A reação foi interrompida adicionando-se ácido acético 5% (v/v).

3.4.3.2. Transferência e detecção de proteínas

Após a eletroforese, as proteínas do gel de poliacrilamida foram transferidas para membrana de nitrocelulose (0,45 μm) usando-se uma cuba de transferência Mighty Small TE 22 (Hoefer Scientific), com voltagem fixada em 100 V. Após coloração da membrana com vermelho Ponceau (0,2% em ácido tricloroacético 0,3%) para visualização das bandas proteicas, as membranas foram incubadas com uma solução de leite desnatado a 5% contendo Tween 20 (0,05% v/v) durante 2 h à temperatura ambiente sob agitação, para bloquear os sítios de ligação inespecíficos. Subsequentemente, a membrana foi lavada seis vezes (10 min cada) com tampão Tris 0,01M-NaCl 0,17 M, pH 7,6 contendo 0,02% (v/v) Tween 20 (tampão TBS) e então incubada com soro anti-*Lonomia* (1:800 diluído em TBS) durante 12 h à temperatura ambiente sob agitação. Em seguida, a membrana foi lavada seis vezes com TBS e então incubada com IgG de coelho anti-IgG de cavalo acoplado à peroxidase (1:1500 em TBS) por 2 h à temperatura ambiente sob agitação. Após mais uma série de lavagens com TBS, as bandas imunoreativas foram reveladas usando-se uma solução reveladora (500 μl de 4-cloro-1-naftol 3% em etanol + 50 μl de H_2O_2 30 vol em 50 ml de Tris-HCl 0,05 M pH 7,6). Após 20 min de incubação à temperatura ambiente sob agitação, as membranas foram secadas e as reações documentadas (Towbin *et al.*, 1979).

3.5. Preparação do conjugado

3.5.1. Purificação de IgG do soro anti-*Lonomia*

Um mililitro de soro anti-*Lonomia* diluído 1:1 em tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,0, foi aplicado em coluna (1 ml) de Sepharose-proteína G previamente equilibrada com o mesmo tampão. Após lavagem da coluna com este tampão para remover material não ligado, a IgG foi eluída com tampão glicina-HCl 0,1 M, pH 2,7. Amostras de 1 ml foram coletadas em tubos Eppendorf contendo 100 μl de tampão Tris-HCl 1,0 M, pH 9,0. O perfil de eluição foi monitorado a 280 nm em espectrofotômetro Uvikon 810 (Kontron, Suíça). As principais frações contendo IgG (baseado na absorbância a 280 nm) foram dialisadas contra água destilada à 4°C, liofilizadas e estocadas à -20°C até conjugação.

3.5.2. Conjugação de IgG à peroxidase

A IgG purificada foi conjugada à peroxidase pelo método de Goding (1986). Este método envolve a oxidação da peroxidase com o *m*-periodato, produzindo conjugado na forma polimérica. A reação entre a peroxidase (HRPO) e o *m*-periodato de sódio foi desenvolvida em tampão acetato pH 4,0 à temperatura ambiente por 15 min. Em seguida a mistura foi aplicada em coluna de Sephadex G-25 (1 cm x 11,5 cm) previamente equilibrada com tampão carbonato/bicarbonato pH 9,5. A peroxidase ativada (frações coradas de marrom) foi coletada e adicionada à IgG dialisada, reagindo por 1 h sob agitação branda. Após este período, o borohidreto de sódio foi adicionado, deixando-o reagir por 1 h. O conjugado anticorpo/enzima foi dialisado contra PBS, pH 7,4, por 16–20 h à 4°C. Terminada a diálise, a absorbância do conjugado foi determinada em 280 e 403 nm antes de adicionar glicerol (5%, v/v) como conservante. O conjugado foi estocado à – 20°C.

A qualidade do conjugado produzido foi avaliada (1) determinando-se a razão de absorbância peroxidase/anticorpo (403 nm/280 nm), (2) medindo-se a atividade enzimática do conjugado através de curva cinética e (3) titulando-se o conjugado pelo ELISA sanduíche direto, conforme recomendado por Catty e Raykundalia (1989).

3.6. ELISA sanduíche direto

3.6.1. Descrição geral

O ELISA direto descrito abaixo baseia-se no ensaio desenvolvido por Chavéz-Olórtegui *et al.*, 1993 para venenos animais.

Placas de ELISA (96 poços, fundo chato) foram sensibilizadas por 16–20 h à 4°C com antissoro diluído em tampão carbonato 0,05 M, pH 9,6 (tampão de ligação, TL). Em seguida, as placas foram lavadas com solução de Tween 20 0,05%-salina (solução de lavagem, SL) e então bloqueadas com uma solução de 2% de gelatina em tampão fosfato 0,05 M-salina 0,15 M, pH 7,4, por 1 h à temperatura ambiente. Após uma segunda lavagem com SL, as placas foram incubadas durante mais 1 h com concentrações variadas de antígeno (veneno) diluído em tampão fosfato 0,05 M-salina 0,15 M, pH 7,4 contendo 0,25% de caseína bovina e 0,05% de Tween 20 (tampão de incubação, TI). Depois, as placas foram

lavadas novamente com SL e o conjugado (IgG anti-*Lonomia* acoplada à peroxidase) foi acrescentado após diluição apropriada em TI. Ao término desta incubação (1 h), foi feita a última lavagem com SL e depois foram adicionados a cada poço 100 µl de uma solução de 0,2 mg de o-fenilenodiamina/ml de tampão citrato 0,15 M, pH 5,0, contendo 0,04% de H₂O₂. Após 30 min de incubação à temperatura ambiente, a reação foi interrompida pela adição de 50 µl de solução de H₂SO₄ 5%. A absorbância final foi lida em leitor de ELISA SpectraMax 340 (Molecular Devices, CA, EUA) a 492 nm.

A reatividade cruzada do soro anti-*Lonomia* frente a diversos venenos, foi investigada usando-se o ELISA acima. Foram testados os venenos das serpentes *B. jararaca*, *B. neuwiedi*, *B. jararacussu* e *Crotalus durissus terrificus* em diluições seriadas a partir de 100 µg/poço, e da aranha *Phoneutria nigriventer* e do escorpião *Tityus serrulatus* em diluições seriadas a partir de 50 µg/poço. Foram testados também o extrato de cerdas e hemolinfa de *Automeris rectilinea* e a hemolinfa de *Lonomia achelous* (duas espécies de saturnídeos).

A reatividade cruzada do extrato de cerdas frente a diversos anti-venenos foi investigada, usando-se o ELISA indireto. Neste caso, as placas foram sensibilizadas com extrato de cerdas (1 µg/poço). Os soros anti-aracnídeo, -botrópico, -crotálico, -elapídico e -escorpiônico foram testados em diluições seriadas a partir de 1:100 em TI. A reação foi desenvolvida usando-se conjugado IgG de coelho anti-IgG de cavalo acoplado à peroxidase (1:1500 em TI) com leitura a 492 nm.

Em alguns experimentos, a influência de soros ou plasmas humanos e de ratos sobre a sensibilidade do ensaio foi investigada diluindo-se o extrato de cerdas nestes fluidos antes de desenvolver o ELISA direto conforme descrito acima. A influência de soro e plasma humano também foi avaliada pelo ELISA indireto.

3.6.2. Otimização dos parâmetros do ELISA

3.6.2.1. Determinação da diluição ótima de conjugado IgG anti-*Lonomia* acoplado à peroxidase

Placas multi-poço foram sensibilizadas com soro anti-*Lonomia* (1:1000, em tampão de ligação), e incubadas por 16-20 h à 4°C. Após lavagem com SL, bloqueio com solução de

gelatina 2% por 1 h e nova lavagem com SL, as placas foram incubadas por mais 1 h com antígeno (extrato de cerdas) a 2 µg/poço diluído em tampão de incubação. Após várias lavagens com SL, o conjugado IgG anti-*Lonomia* acoplado à peroxidase diluído em TL, foi adicionado em diluições seriadas a partir de 1:100 e o ensaio desenvolvido conforme descrito acima (item 3.6.1.).

3.6.2.2. Diluição ótima de soro anti-*Lonomia*

Inicialmente placas multi-poço foram sensibilizadas com soro anti-*Lonomia* em diluições seriadas a partir de 1:250 em tampão de ligação por 16-20 h à 4°C. O antígeno (extrato de cerdas) foi acrescentado na concentração de 2 µg/poço. O conjugado (IgG anti-*Lonomia* acoplado à peroxidase) foi acrescentado às placas na diluição 1:800 (diluição escolhida com base no experimento anterior). O ensaio foi desenvolvido conforme descrito anteriormente (item 3.6.1.).

3.6.2.3. Diluição ótima de antígeno

Após a padronização da diluição ótima de conjugado e de antissoro, foram realizados experimentos com diluições seriadas de antígeno a partir de 8 µg/poço, a fim de confirmar se a a concentração de 2 µg de extrato/poço era suficiente para desenvolver a reação máxima.

Os parâmetros do ELISA indireto tais como diluições ótimas de antígeno, soro anti-*Lonomia* e conjugado IgG de coelho anti-IgG de cavalo acoplado à peroxidase, foram determinados por um procedimento semelhante ao utilizado no ELISA sanduíche direto.

3.7. Cromatografia em Superdex 75

Para investigar os componentes do extrato de cerdas, hemolinfa e saliva que interagem com o soro anti-*Lonomia*, amostras destes foram fracionadas por gel filtração em coluna de Superdex 75 (HR 16/60) equilibrada com 0,1 M Tris-HCl, pH 7,8. A coluna foi eluída a um fluxo de 30 ml/h à 22°C e frações de 2,0 ml foram coletadas usando um sistema

AKTApurifier 10 (Pharmacia). O perfil de eluição das proteínas foi determinado a 280 nm. A imunoreatividade das frações coletadas foi examinada usando-se o ELISA sanduíche direto.

3.8. Cinética do extrato de cerdas em ratos

Ratos machos Wistar (200-300 g) receberam extrato de cerdas de *L. obliqua* por via intravenosa (i.v.), subcutânea (s.c.) e intradérmica (i.d.) na dose de 400 µg/kg. A coleta de sangue foi feita através de punção cardíaca em tempos pré-determinados, após anestesia do animal com éter etílico. Após a coleta de sangue, os ratos foram sacrificados com éter etílico. Os níveis séricos do veneno foram determinados pelo ELISA sanduíche direto. Após diluição das amostras de soro 1:1 em TL, alíquotas de 100 µl destas amostras foram adicionadas às placas sensibilizadas com soro anti-*Lonomia* (1:1000 em TL contendo 5 mM EDTA). Uma curva padrão foi desenvolvida em paralelo, diluindo-se o extrato de cerdas em soro de ratos controle.

4. Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Determinação do conteúdo proteico das amostras

O conteúdo proteico de algumas amostras foi determinado por três métodos: pela absorbância a 280 nm (Stoscheck, 1990), pelo método de Lowry simplificado (Peterson, 1977) e pelo método do ácido bicinonínico (Stoscheck, 1990). O método do ácido bicinonínico foi escolhido por ser um método rápido de fácil execução.

Tabela 3: Determinação do conteúdo proteico das amostras por três métodos diferentes.

Amostra	Concentração (mg/ml)		
	A 280 nm	Ácido bicinonínico (562 nm)	Lowry simplificado (700 nm)
Extrato de cerdas de <i>L. obliqua</i>	15,3	6,1	6,5
Hemolinfa de <i>L. obliqua</i>	48,0	23,1	25,2
Hemolinfa de <i>L. achelous</i>	71,0	15,3	22,1

Houve diferença nas concentrações obtidas pela A 280 nm quando comparadas àquelas obtidas pelo método do ácido bicinonínico ou Lowry simplificado. Talvez o método usado neste trabalho não expresse as concentrações reais de proteína, no entanto os dados obtidos são reprodutíveis se um único método de dosagem for usado ao longo dos experimentos, como foi feito neste estudo.

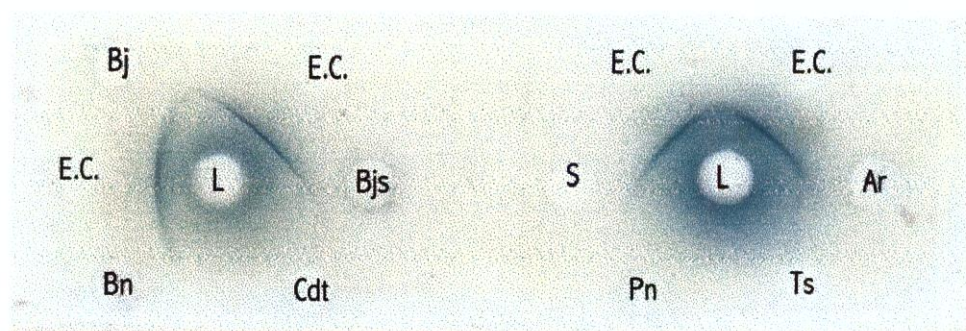
4.2. Caracterização imunoquímica do veneno de *L. obliqua*

4.2.1. Imunodifusão dupla

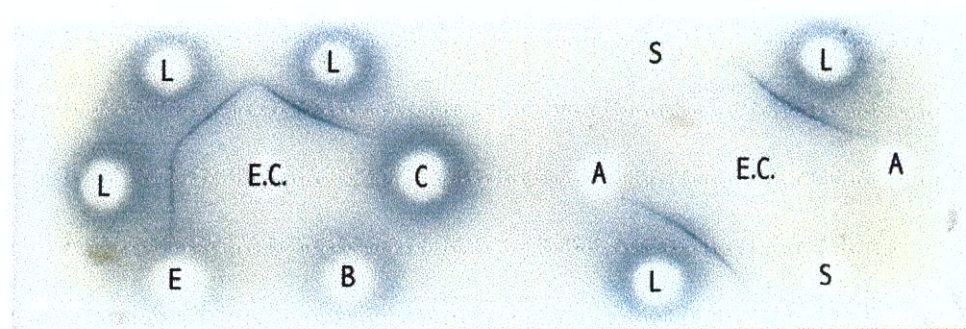
Na imunodifusão dupla, o extrato de cerdas de *L. obliqua* formou uma única linha de precipitação com seu antissoro (Figura 14). Quando a concentração do extrato foi aumentada em aproximadamente três vezes, houve a formação de pelo menos três linhas de precipitação (Figura 15). A hemolinfa de *L. obliqua* também formou com o soro anti-*Lonomia*, pelo menos três linhas de precipitação, algumas de completa identidade imunológica com àquelas produzidas pelo extrato de cerdas (Figura 15A). A linha de precipitação formada entre o soro anti-*Lonomia* e hemolinfa de *L. achelous* mostrou que há identidade imunológica parcial tanto com o extrato de cerdas quanto com a hemolinfa de *L. obliqua* (Figura 15B). O extrato de cerdas e hemolinfa de *A. rectilinea* formaram linhas de precipitação de não identidade com o soro anti-*Lonomia* (Figura 14 e 15A). Não houve reatividade cruzada entre o soro anti-*Lonomia* e a saliva de *L. obliqua* e de *A. rectilinea* e nem com os venenos de serpentes, veneno da aranha *P. nigriventer* e do escorpião *T. serrulatus* (Figuras 14B e 15A).

4.2.2. Imunoelektroforese

A imunoelektroforese consiste de uma combinação de eletroforese e imunodifusão radial simples em gel de agarose. Esta técnica mostrou que o perfil de imunoprecipitação do extrato de cerdas de *L. obliqua* e da hemolinfa de *L. obliqua* são bem parecidos (Figura 16A). As hemolinfas de *A. rectilinea* e *L. achelous* possuem um perfil de imunoprecipitação diferente do observado com a hemolinfa de *L. obliqua*. A hemolinfa de *A. rectilinea* formou com o antissoro pelo menos três linhas de precipitação enquanto que a hemolinfa de *L. achelous* formou pelo menos quatro linhas de precipitação (Figura 16B e C). O extrato de cerdas de *A. rectilinea* reagiu com o soro anti-*Lonomia* produzindo um perfil bem diferente do extrato de cerdas de *L. obliqua* (Figura 16D). As salivas de *L. obliqua* e de *A. rectilinea* não interagiram com o soro anti-*Lonomia* (dados não mostrados), confirmando o resultado obtido na imunodifusão dupla.

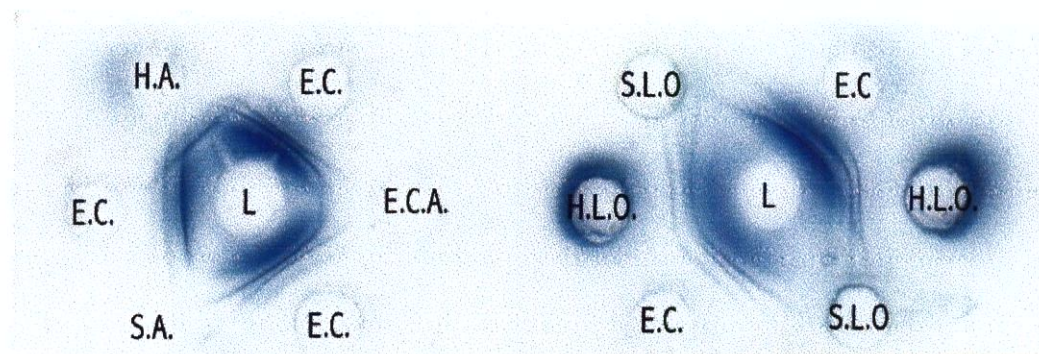


A

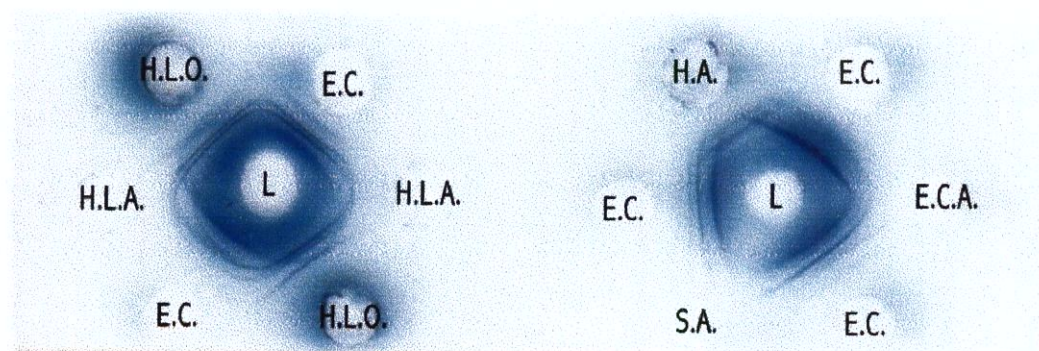


B

Figura 14: Imunodifusão do soro anti-*Lonomia* contra diversos venenos animais (A) e do extrato de cerdas contra diversos antissoros (B). **A:** E.C. = extrato de cerdas de *L. obliqua*, Ar. e S = extratos de cerdas de *Automeris rectilinea* e de uma espécie de Saturnidae não identificada, respectivamente. Bj, Bjs, Bn, Cdt, Pn, Ts = venenos de *Bothrops jararaca*, *B. jararacussu*, *B. neuwiedi*, *Crotalus durissus terrificus*, *Phoneutria nigriventer* e *Tityus serrulatus*, respectivamente. L = soro anti-*Lonomia*. **B:** E.C. = extrato de cerdas de *L. obliqua*, A, B, C, E, L, S = soros anti-aracnídeo, botrópico, crotálico, elapídico, lonômico e escorpiônico, respectivamente. Foram aplicados 20 μ l de cada antissoro. Os extratos de cerdas de *L. obliqua*, *A. rectilinea* e da espécie de Saturnidae não identificada foram aplicados na quantidade de 14 μ g, 48 μ g e 20 μ g/poço, respectivamente. Para os outros venenos foram aplicados 40 μ g/poço.



A



B

Figura 15: Imunodifusão do soro anti-*Lonomia* contra os venenos de taturanas da família Saturnidae. **A, B:** E.C., H.L.O., S.L.O. = extrato de cerdas, hemolinfa e saliva de *L. obliqua*, respectivamente. E.C.A., H.A, S.A. = extrato de cerdas, hemolinfa e saliva de *Automeris rectilinea*, respectivamente. H.L.A. = hemolinfa de *L. achelous* e L = soro anti-*Lonomia*. Foram aplicados 20 μ l de soro anti-*Lonomia*. As quantidades de extrato de cerdas, hemolinfa e saliva de *L. obliqua* aplicadas foram 46,2 μ g, 75,4 μ g e 68 μ g/poço, respectivamente. No caso do extrato de cerdas, hemolinfa e saliva de *A. rectilinea* foram aplicadas 59 μ g, 53 μ g e 20 μ g/poço, respectivamente, e, para a hemolinfa de *L. achelous*, 86 μ g/poço.

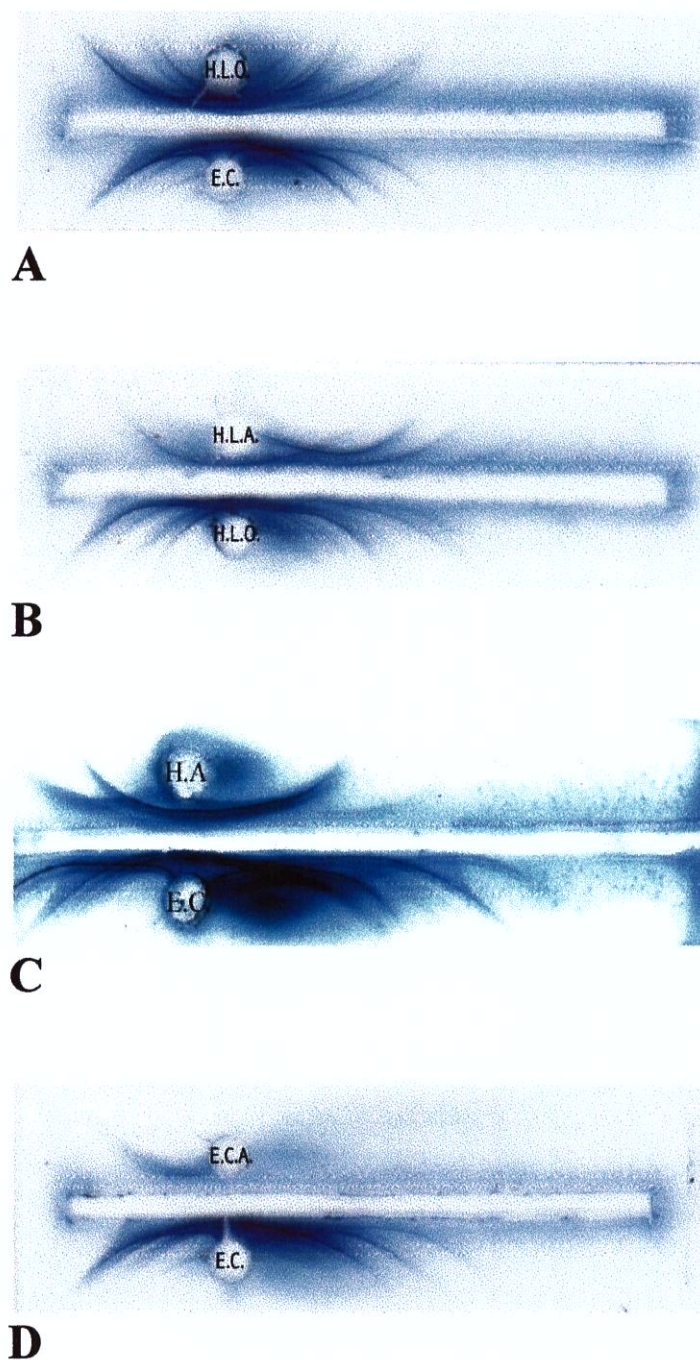


Figura 16: Imunoeletroforese de extrato de cerdas (E.C., 46,2 μg) e hemolinfa de *L. obliqua* (H.L.O., 75,4 μg) (A); hemolinfa de *L. obliqua* (H.L.O., 75,4 μg) e hemolinfa de *L. achelous* (H.L.A., 86 μg) (B); extrato de cerdas de *L. obliqua* (E.C., 78 μg) e hemolinfa de *A. rectilinea* (H.A., 212,4 μg) (C); extrato de cerdas de *L. obliqua* (E.C., 46,2 μg) e extrato de cerdas de *A. rectilinea* (E.C.A., 59 μg) (D). A reação foi desenvolvida em gel de agarose 1% em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0 após corrida eletroforética à 120 V por 90 min.

4.2.3. Imunoblot

4.2.3.1. Eletroforese

O perfil eletroforético mostrou a presença de pelo menos 13 proteínas no extrato de cerdas de *L. obliqua*, e pelo menos 14 proteínas na hemolinfa (Figura 17I). A hemolinfa de *L. achelous* apresentou pelo menos 7 bandas proteicas pela coloração de prata, sendo 1 banda na região de 205 kDa, 2 bandas entre 97,4 e 66 kDa, 3 bandas entre 45 e 36 kDa e 1 banda na região de 14,2 kDa (dados não mostrados). No extrato de cerdas de *A. rectilinea* foram detectadas pelo menos 9 proteínas, sete das quais se localizam na região de 20-45 kDa. A hemolinfa desta espécie apresentou pelo menos 17 bandas proteicas (Figura 17I). Não foram detectadas bandas proteicas na saliva de *L. obliqua* e *A. rectilinea* (Figura 17I).

Um estudo comparativo das proteínas das cerdas e hemolinfa de *L. obliqua* indicou que as proteínas das cerdas possuem alguma similaridade com as da hemolinfa. Comparando-se as hemolinfas de *L. obliqua*, *L. achelous* e *A. rectilinea*, observa-se similaridade entre o peso molecular de algumas proteínas da hemolinfa de *L. obliqua* com as de *A. rectilinea*, mas não há grande similaridade com a hemolinfa de *L. achelous*. Não há similaridade significativa entre o extrato de cerdas de *L. obliqua* e o extrato de cerdas de *A. rectilinea* (Figuras 17I e II).

4.2.3.2. Transferência e detecção de proteínas

O imunoblot mostrou que o perfil de imunoreatividade do extrato de cerdas é muito semelhante ao da hemolinfa de *L. obliqua*, principalmente na região de 45-205 kDa (Figura 18). Esta similaridade também é observada entre as hemolinfas de *L. obliqua*, *L. achelous* e de *A. rectilinea* mas com menor imunoreatividade (Figura 19).

O imunoblot mostrou fraca imunoreatividade do extrato de cerdas e saliva de *A. rectilinea* com o soro anti-*Lonomia* (Figura 18).

Não houve reatividade com venenos de serpentes (Figura 20). Ocorreu baixa reatividade com o veneno de *P. nigriventer*, com fracas bandas de imunoreatividade nas regiões entre 36 kDa e 116 kDa. O veneno de *T. serrulatus*, também apresentou fracas bandas de imunoreatividade na região de 205 kDa (Figura 21).

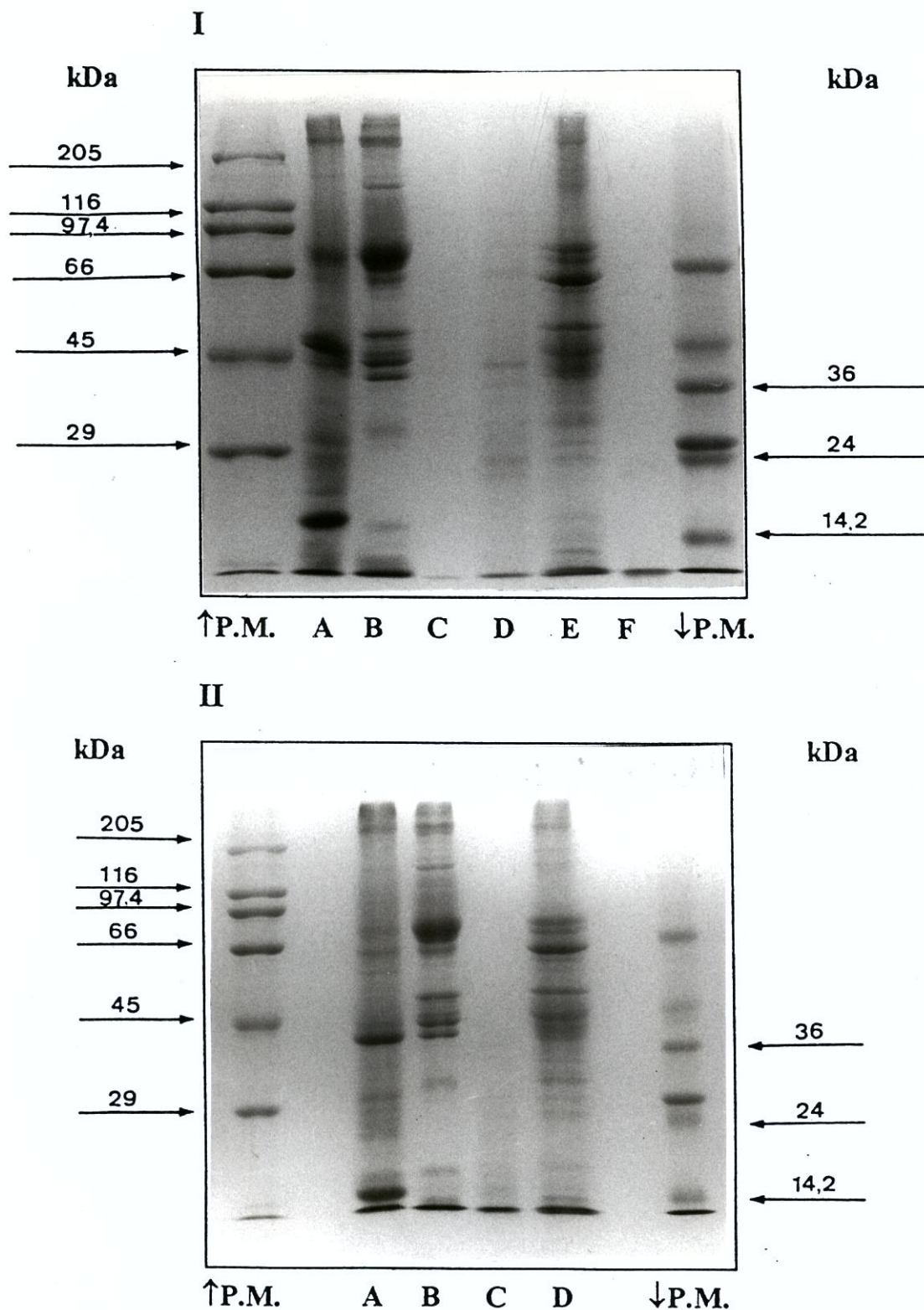


Figura 17: Eletroforese de extrato de cerdas, hemolinfa e saliva de espécies de Saturnidae. Em I – A, B e C: extrato de cerdas (40 μ g), hemolinfa (58 μ g) e saliva (68 μ g) de *L. obliqua*, respectivamente. D, E e F: extrato de cerdas (35 μ g), hemolinfa (106 μ g) e saliva (40 μ g) de *A. rectilinea*, respectivamente. Em II – A: extrato de cerdas de *L. obliqua* (40 μ g), B, C e D: hemolinfas de *L. obliqua* (58 μ g), *L. achelous* (172 μ g), e *A. rectilinea* (106 μ g), respectivamente. Os géis foram corridos a 100 V e depois corados com solução de azul brilhante de Coomassie R 0,025% em ácido acético 10%. \uparrow P.M.: proteínas marcadoras de alto peso molecular. \downarrow P.M.: proteínas marcadoras de baixo peso molecular. Ver Figura 16 para a identificação das marcadoras.

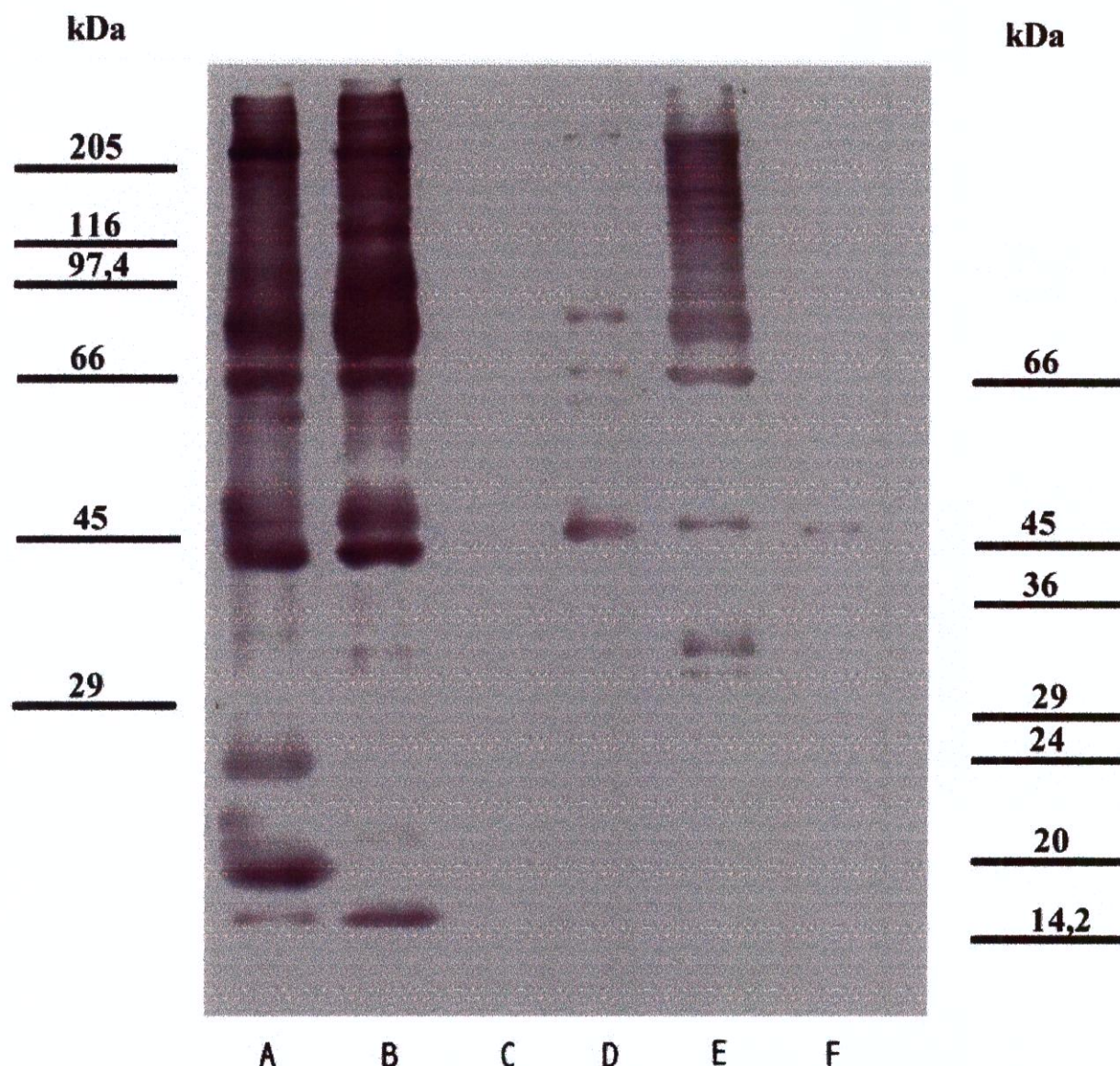


Figura 18: Imunoblot de extrato de cerdas de *L. obliqua* (A), hemolinfa de *L. obliqua* (B), saliva de *L. obliqua* (C), extrato de cerdas de *A. rectilinea* (D), hemolinfa de *A. rectilinea* (E) e saliva de *A. rectilinea* (F). Em todos os casos foram aplicados 17,25 μ g de amostra. Padrões proteicos: miosina (músc. coelho) – 205 kDa, β -galactosidase (*E. coli*) – 116 kDa, fosforilase b (músc. coelho) – 97,4 kDa, albumina bovina – 66 kDa, ovoalbumina – 45 kDa, anidrase carbônica (eritrócitos bovinos) – 29 kDa, gliceraldeído-3-P-desidrogenase – 36 kDa, tripsinogênio (pâncreas bovino) – 24 kDa, inibidor tripsina – 20 kDa e lactoalbumina (leite bovino) – 14,2 kDa. Tempo de reação: 20 min.

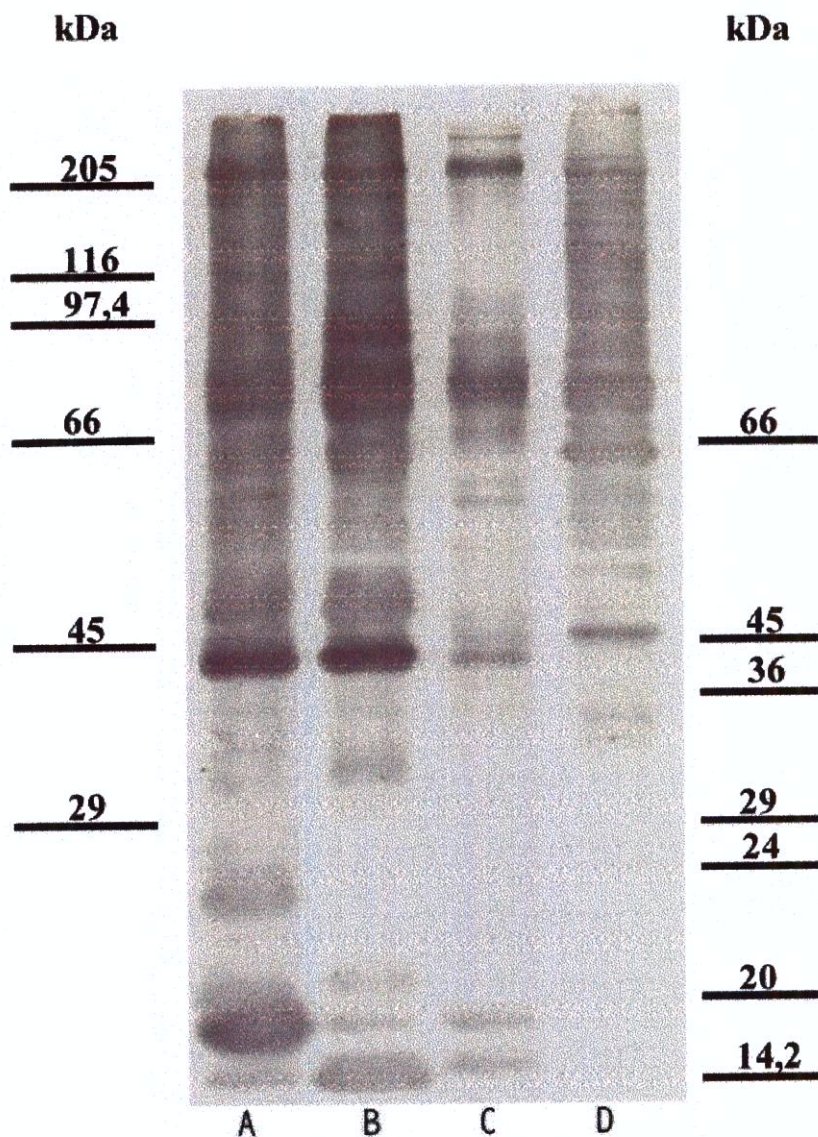


Figura 19: Imunoblot de extrato de cerdas de *L. obliqua* (A), hemolinfa de *L. obliqua* (B), hemolinfa de *L. achelous* (C) e hemolinfa de *A. rectilinea* (D). Em todos os casos foram aplicados 17,25 μ g de amostra. Os padrões de massa molecular são os mesmos indicados na figura 16. Tempo de reação: 20 min.

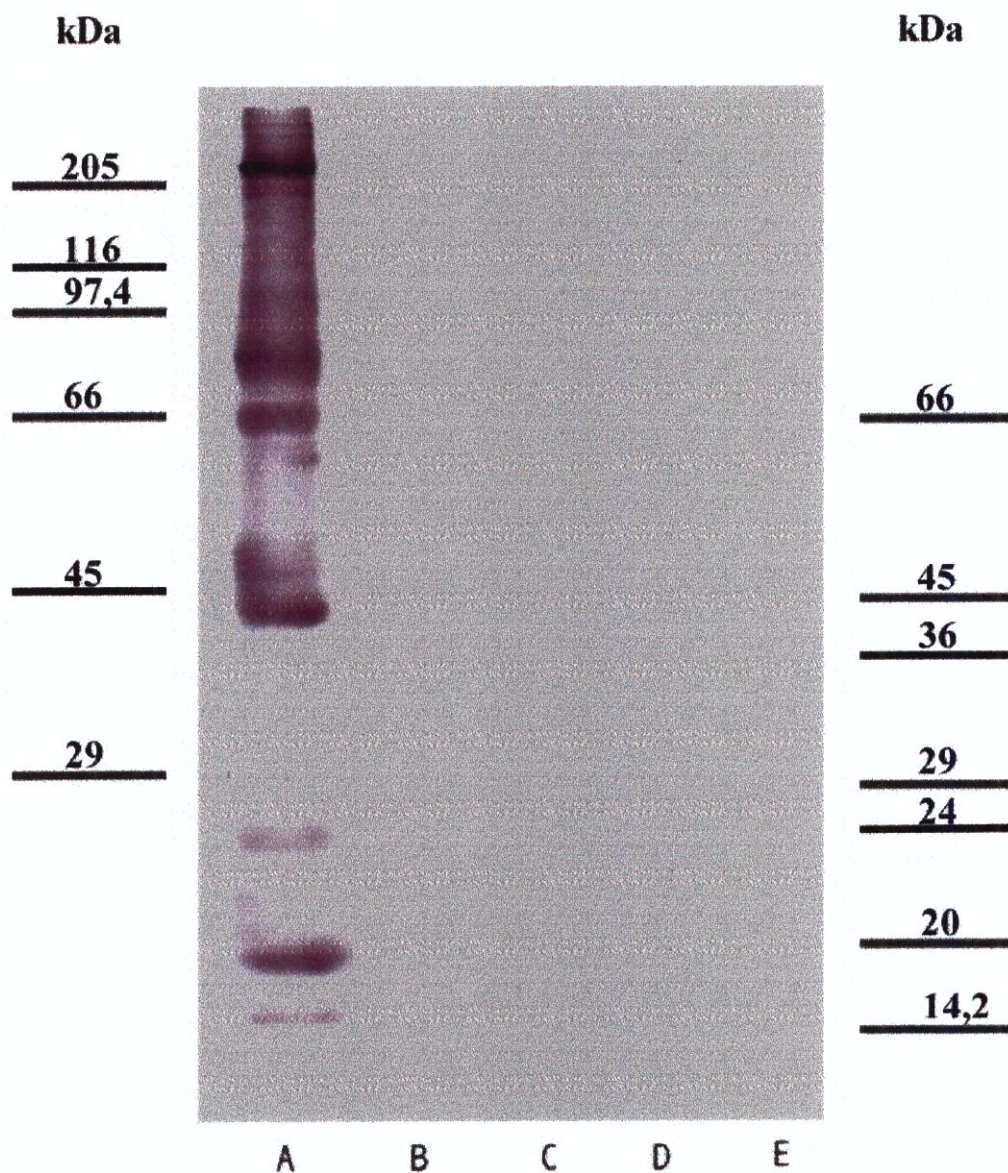


Figura 20: Imunoblot de extrato de cerdas de *L. obliqua* (A), e dos venenos de *Bothrops jararaca* (B), *Crotalus durissus terrificus* (C), *Bothrops jararacussu* (D) e *Bothrops neuwiedi* (E). Em todos os casos foram aplicados 17,25 μ g de amostra. Os padrões de massa molecular são os mesmos indicados na figura 16. Tempo de reação: 20 min.

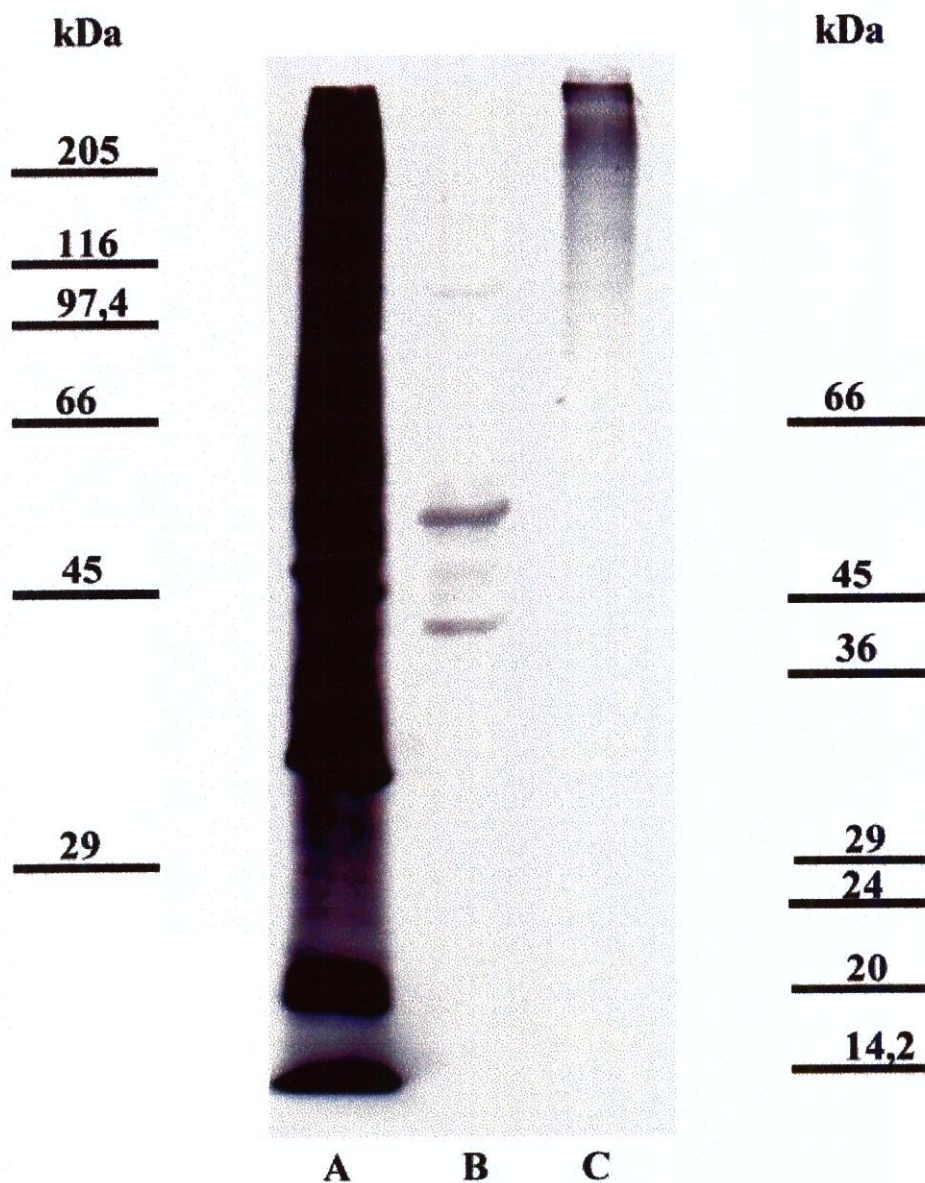


Figura 21: Imunoblot de extrato de cerdas de *L. obliqua* (A), e dos venenos de *Phoneutria nigriventer* (B) e *Tityus serrulatus* (C). Foram aplicados 17,25 μ g de extrato de cerdas e 75 μ g dos venenos de *P. nigriventer* e *T. serrulatus*. Os padrões de massa molecular são os mesmos indicados na figura 16. Tempo de reação: 50 min.

4.3. Padronização do ELISA sanduíche direto

4.3.1. Preparação do conjugado IgG anti-*Lonomia* acoplada à peroxidase

A Figura 22A mostra o perfil de eluição da IgG obtida do soro anti-*Lonomia* através de cromatografia de afinidade em resina Sepharose-proteína G. O material assim obtido foi conjugado à peroxidase (Goding, 1986) e foram realizados testes de controle de qualidade do conjugado. A razão de absorvância peroxidase-anticorpo (403 nm/280 nm) deste conjugado foi $> 0,3$, indicando que a conjugação foi de boa qualidade (alta proporção de moléculas de IgG com peroxidase acoplada).

A atividade enzimática do conjugado foi confirmada através de um ensaio cinético (Figura 22B), onde uma absorvância a 492 nm $> 1,0$ foi obtida entre 10-15 min e uma absorvância $> 1,5$ foi obtida entre 25-30 min, indicando que o conjugado produzido possui boa atividade enzimática (Catty e Raykundalia, 1989).

Bons conjugados possuem título de ponto final no ELISA $> 1:10.000$. Este parâmetro é determinado pela última diluição da curva com valor maior que o obtido pelo branco. O conjugado obtido, mostrou título de ponto final de 1:12.800 (Figura 23A).

4.3.2. Parâmetros do ensaio

A diluição ótima de conjugado escolhida foi de 1:800, menor diluição na parte mais linear da curva de diluição (Figura 23A). A razão entre a absorvância desta diluição de conjugado (1,5 - 2,0) e a do branco (0,15) foi $\geq 10:1$. Estes valores definem um conjugado com excelentes propriedades (Catty e Raykundalia, 1989).

A diluição ótima de antiveneno escolhida foi de 1:1000 (Figura 23B), diluição na parte linear da curva de diluição. O painel C da Figura 23 mostra a curva dose-resposta para o extrato de cerdas. A absorvância máxima foi obtida com 2 μg de extrato de cerdas/poço (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$), usando as diluições de conjugado e soro anti-*Lonomia* mencionadas acima. A quantidade mínima de extrato detectável em PBS foi de 1,0 $\eta\text{g}/\text{poço}$ (10 $\eta\text{g}/\text{ml}$), correspondendo a 2 desvios padrões acima da média do branco.

A diluição ótima de conjugado anti-espécie usada no ELISA indireto foi 1:1500. A diluição ótima de soro anti-*Lonomia* utilizada foi de 1:800.

A influência de soros ou plasmas humano e de rato sobre a sensibilidade do ensaio foi investigada diluindo-se o extrato de cerdas nestes fluídos antes de desenvolver o ELISA direto. Não houve diminuição significativa da sensibilidade do ensaio quando soros e plasmas humanos e de ratos foram utilizados (limite de detecção de 5 – 10 $\eta\text{g/ml}$) (Figura 24A). No entanto, com soro e plasma de rato ocorreu redução na amplitude da curva (dados não mostrados). Esta interferência foi eliminada ao acrescentar 5 mM de EDTA ao tampão de ligação. A influência de soro e plasma humano também foi avaliada pelo ELISA indireto como mostra a Figura 24B.

4.3.3. Especificidade do ensaio

A Figura 25A mostra que a hemolinfa de *L. obliqua* possui um perfil de imunoreatividade muito parecido ao do extrato de cerdas. Por outro lado, a saliva não reagiu neste ensaio, mesmo quando testada em quantidade 20 vezes maior que a do extrato de cerdas e hemolinfa. Estes resultados indicam que o extrato de cerdas e a hemolinfa possuem componentes semelhantes do ponto de vista imunológico e que esta semelhança não é compartilhada com a saliva.

A hemolinfa de *L. achelous*, outra espécie deste gênero, reagiu com menor intensidade com o soro anti-*Lonomia*, quando comparada com a hemolinfa de *L. obliqua*. Quando se tratou de outro gênero de Saturnidae, neste caso, *Automeris rectilinea*, a reatividade cruzada foi menor ainda (Figura 25A). Não houve reação com os venenos de serpentes testados, da aranha *P. nigriventer* e do escorpião *T. serrulatus* (Figura 25B).

Os soros anti-aracnídico e anti-escorpiônico interagiram fracamente com o extrato de cerdas de *L. obliqua* (Figura 26) pelo ELISA indireto, sugerindo que o extrato possui alguns componentes que são imunologicamente parecidos com os venenos aracnídeo e escorpiônico. Este resultado foi confirmado pelo imunoblot. Porém, no ELISA direto não houve reatividade cruzada do extrato de cerdas de *L. obliqua* com os soros anti-aracnídico e anti-escorpiônico (dados não mostrados).

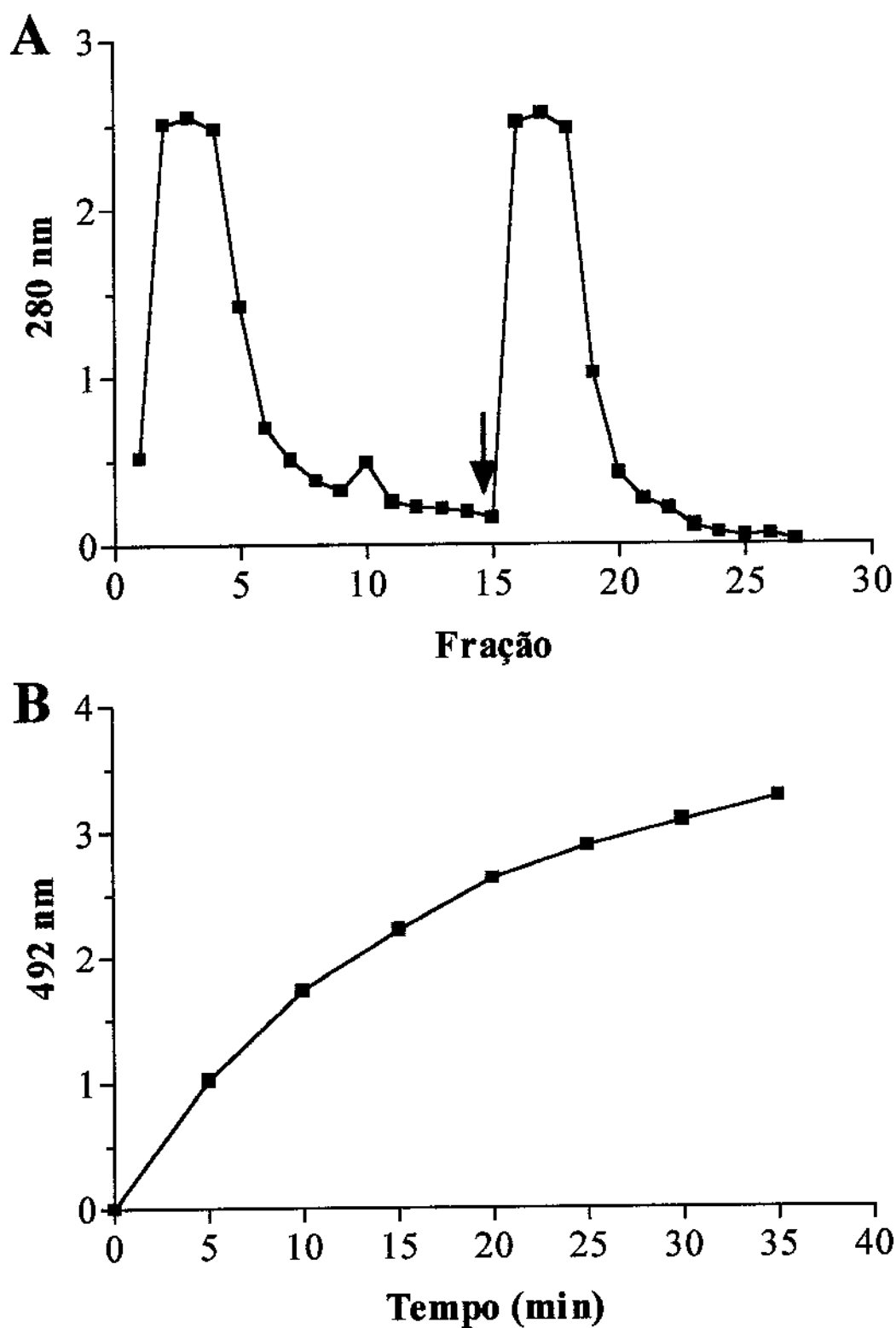


Figura 22: A- Purificação de IgG do soro comercial anti-*Lonomia* por cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose-proteína G. A IgG foi eluída com 0,1 M glicina-HCl, pH 2,7 (seta) e frações de 1 ml foram coletadas em tubos contendo 100 μ l de 0,1 M Tris-HCl, pH 9,0. B- Ensaio cinético para avaliar a atividade enzimática do conjugado IgG anti-*Lonomia*. As curvas representam a média de 3 experimentos.

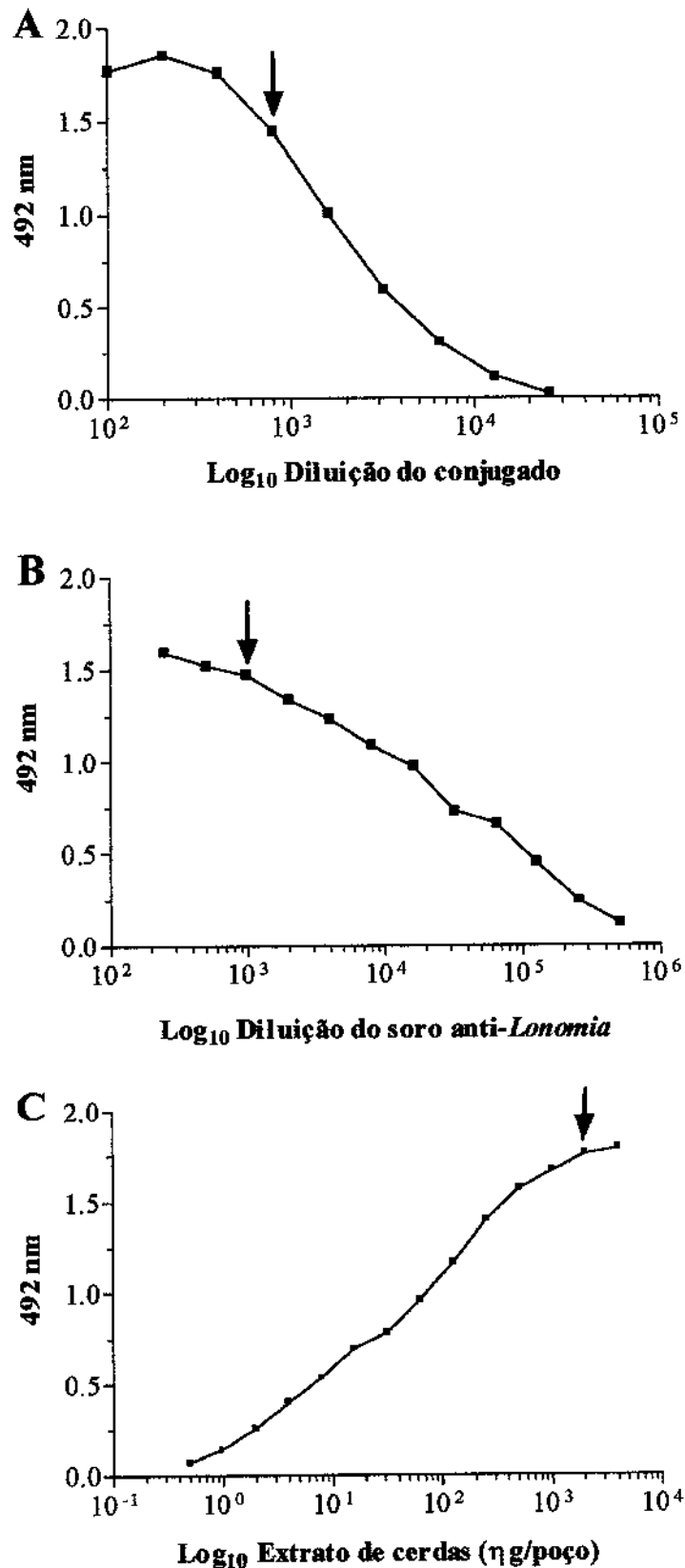


Figura 23: A- Determinação da diluição ótima de conjugado IgG anti-*Lonomia* acoplado à peroxidase (seta). A curva foi desenvolvida usando placas sensibilizadas com soro anti-*Lonomia* (1:1000) e extrato de cerdas (2 μg/poço). B- Determinação da diluição ótima de soro anti-*Lonomia* (seta). A curva foi desenvolvida com extrato de cerdas (2 μg/poço) e conjugado 1:800. C- Curva dose-resposta para o extrato de cerdas. A absorbância máxima foi obtida com 2 μg de extrato de cerdas/poço (seta). As curvas representam a média de 3 experimentos.

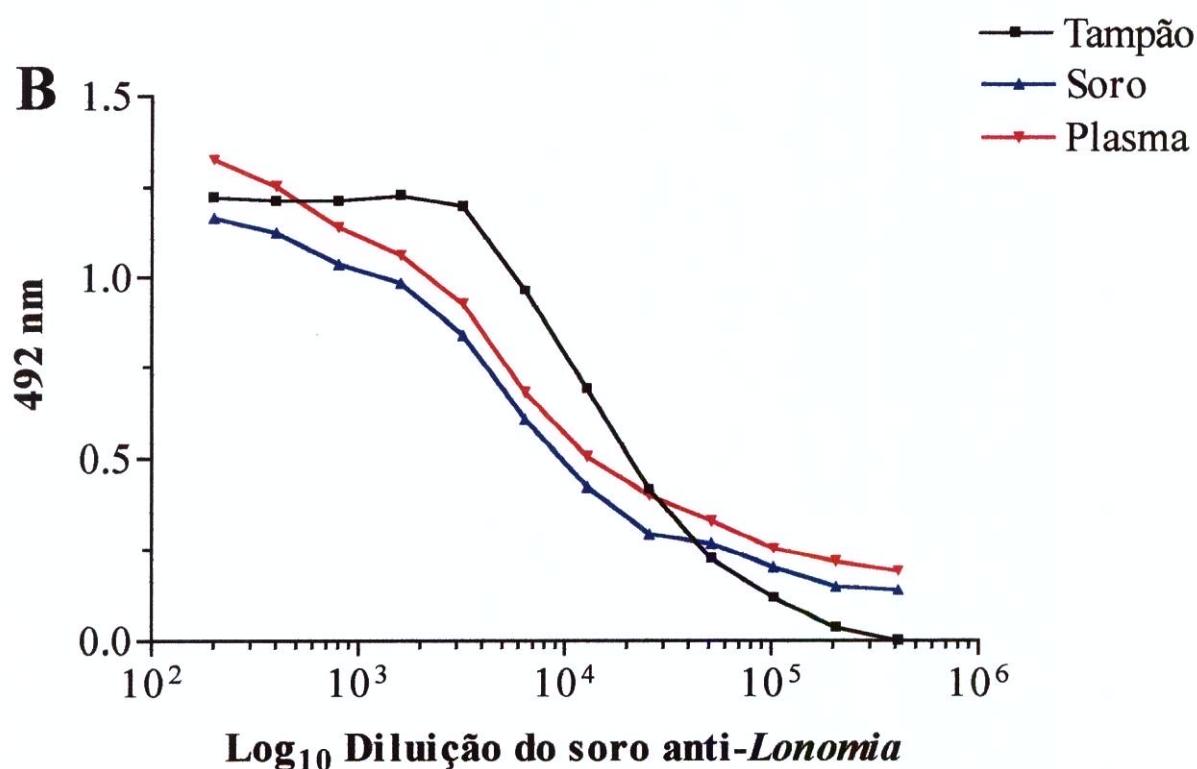
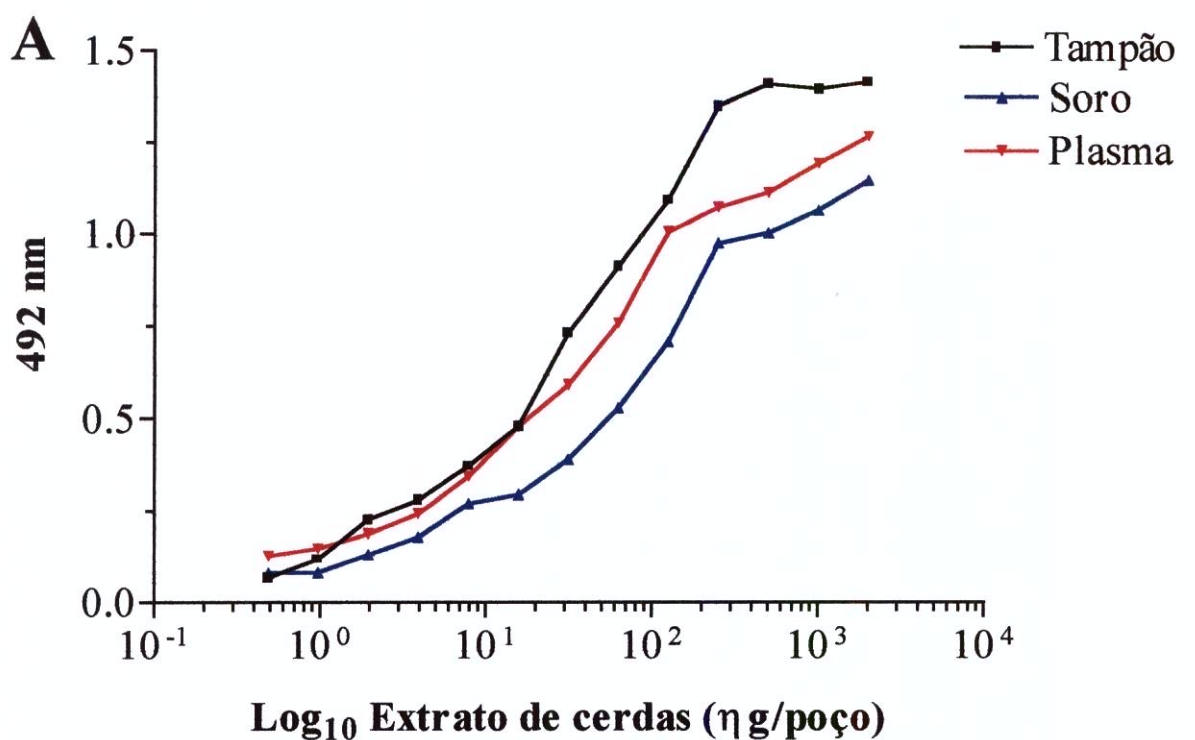


Figura 24: A- Influência de soro e plasma humanos na curva dose-resposta do extrato de cerdas de *L. obliqua* pelo ELISA sanduíche direto. B- Influência de soro e plasma humanos sobre a detecção do soro anti-*Lonomia* pelo ELISA indireto. As curvas representam a média de 3 experimentos.

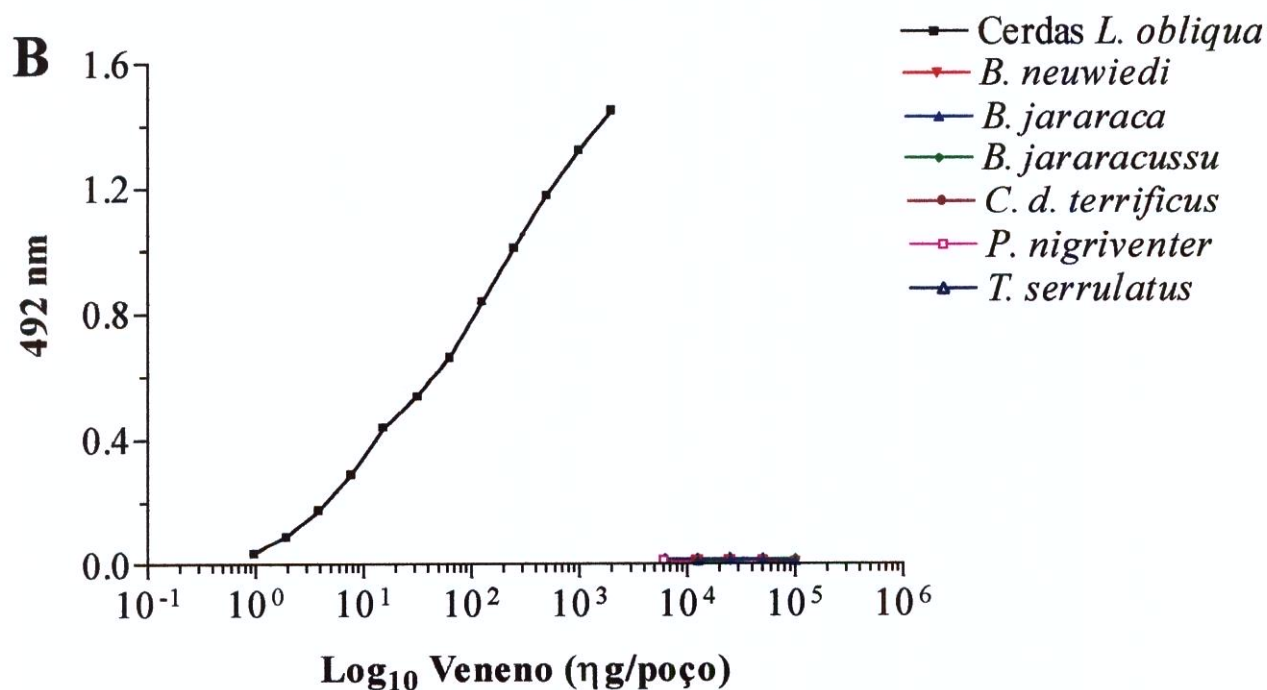
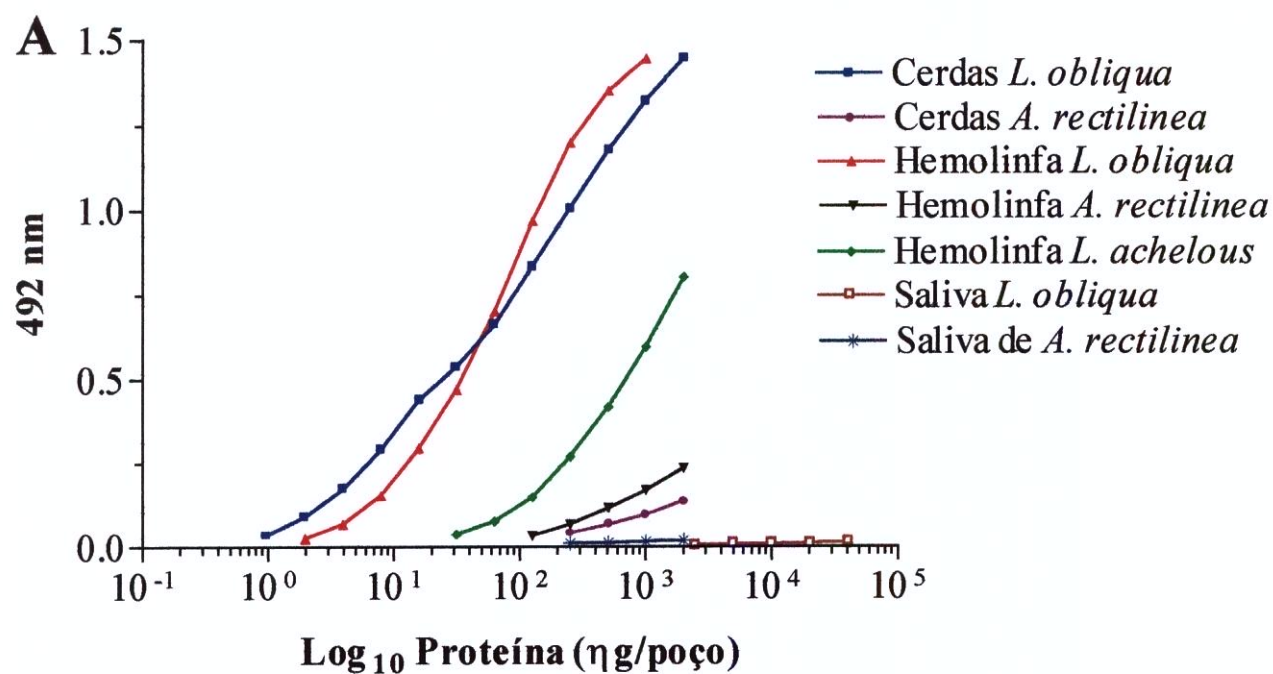


Figura 25: A e B- Reatividade cruzada do soro anti-*Lononomia* com diferentes venenos. As placas foram sensibilizadas com soro anti-*Lononomia* (1:1000) e o conjugado IgG anti-*Lononomia* foi usado na diluição 1:800. As curvas representam a média de 3 experimentos.

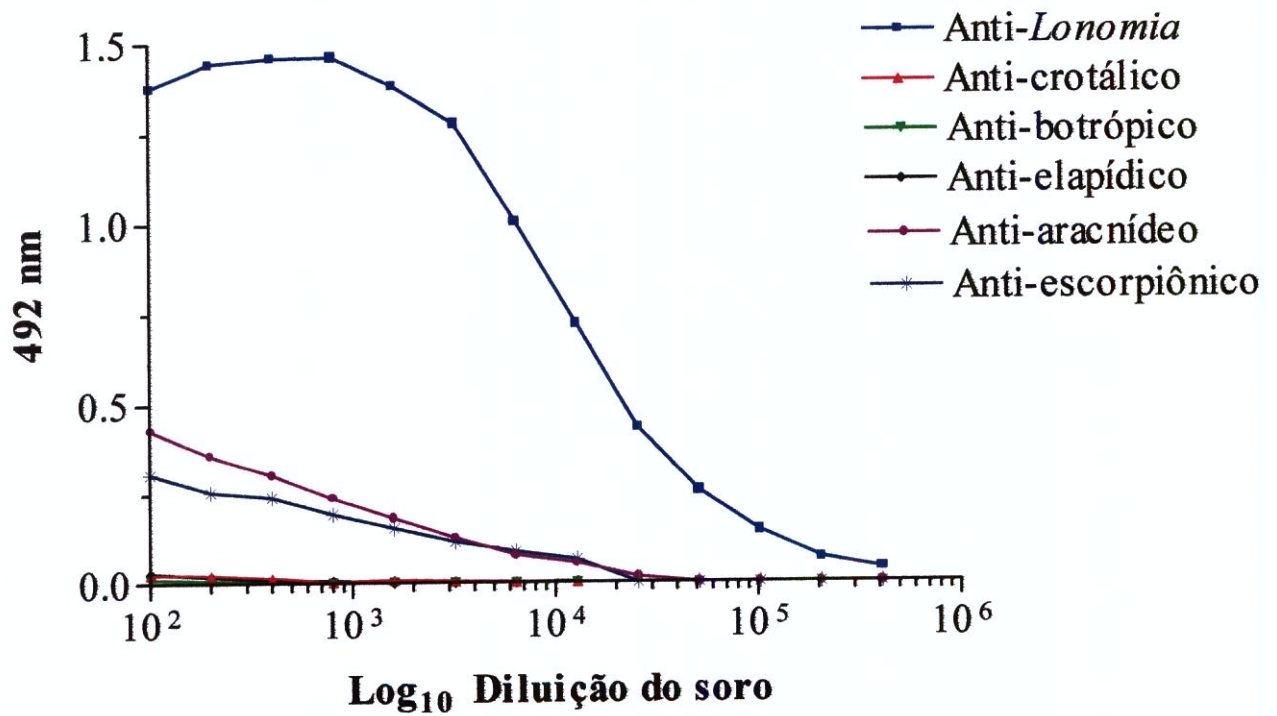


Figura 26: Reatividade cruzada entre diversos soros comerciais (todos equinos) e o extrato de cerdas (1 µg/poço) usando o ELISA indireto. Conjugado IgG de coelho anti-IgG de cavalo acoplado à peroxidase foi usado na diluição 1:1500. As curvas representam a média de 3 experimentos.

4.4. Cromatografia em Superdex 75

Os perfis de eluição do extrato de cerdas, hemolinfa e saliva de *L. obliqua* obtidos por cromatografia em coluna de Superdex 75 são indicados na figura 27. O perfil do extrato de cerdas mostrou quatro picos principais. A maior parte da imunoreatividade no ELISA localiza-se nos três primeiros picos. A hemolinfa também mostrou quatro picos principais, sendo que os dois primeiros mostraram maior imunoreatividade no ELISA. O perfil de eluição da saliva mostrou seis picos principais. Houve reatividade muito fraca e constante ao longo do perfil de eluição. Esta reatividade não é significativa pois seus valores aproximam-se do branco da placa.

4.5. Cinética do extrato de cerdas em ratos

A dose injetada de 400 µg/kg de extrato de cerdas foi escolhida em experimentos preliminares e foi suficiente para obter níveis detectáveis de antígenos pelo ELISA, sem causar a morte dos animais.

Pela via intravenosa, o nível máximo de antígenos no soro dos ratos foi obtido 15 min após a injeção e tornou-se não mensurável após 16 h (Figura 28A). Esta via foi realizada como um controle para verificar se o ELISA era capaz de detectar antígenos circulantes em animais envenenados experimentalmente.

Pela via subcutânea, foram obtidos três picos: 0,5, 4 e 16 h após a injeção, sendo que após 48 h ainda havia veneno circulante (Figura 28B). Pela via intradérmica, o nível máximo de antígenos circulantes ocorreu 1 h após a injeção, sendo eliminados da circulação após 16 h (Figura 28C).

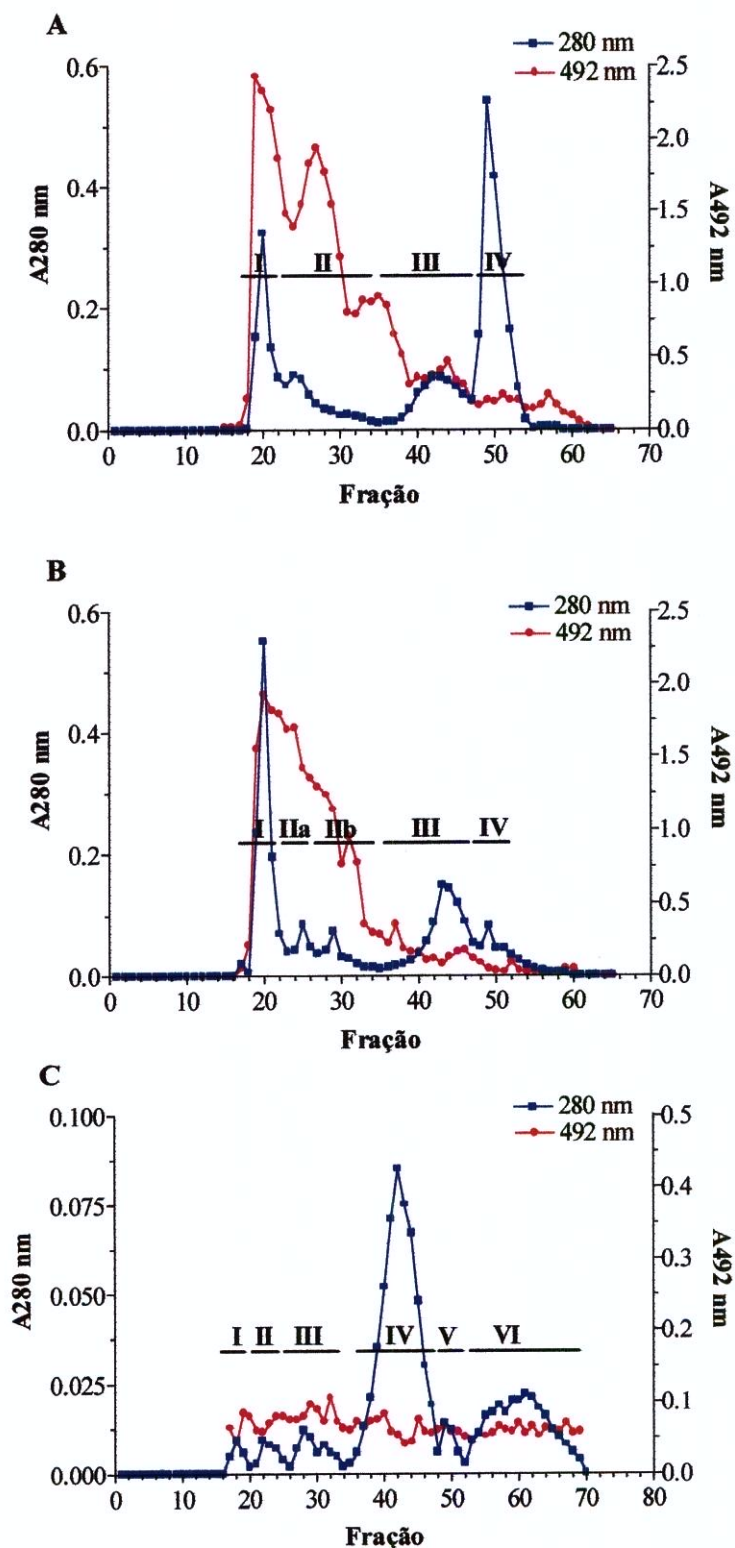


Figura 27: Cromatografia de extrato de cerdas (A), hemolinfa (B) e saliva (C) de *L. obliqua* em coluna de Superdex 75 e imunoreatividade das frações no ELISA sanduíche (492 nm). Foram aplicados 2,47 mg, 2,22 mg e 2,35 mg de extrato de cerdas, hemolinfa e saliva respectivamente. A coluna foi eluída com Tris-HCl 0,1 M, pH 7,8 a um fluxo de 30 ml/h e frações de 2,0 ml foram coletadas.

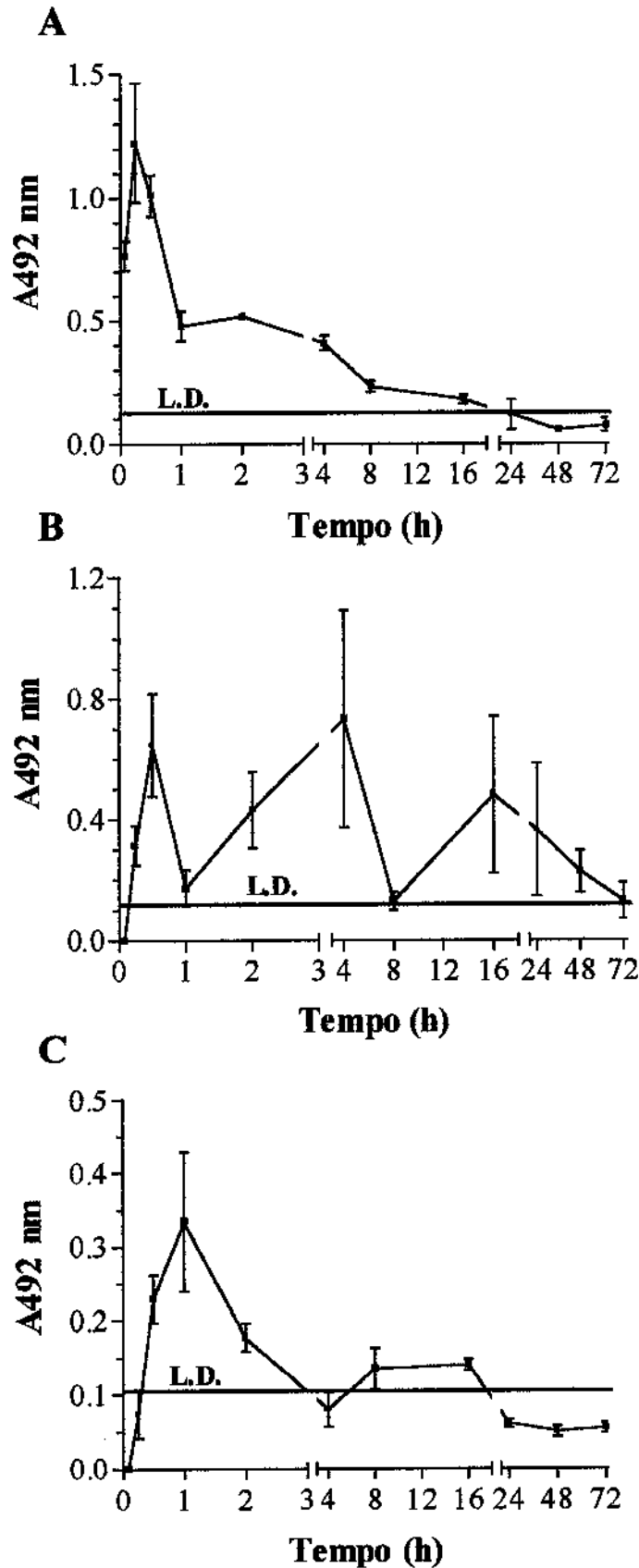


Figura 28: Cinética do extrato de cerdas de *L. obliqua* em ratos. Os animais receberam extrato de cerdas (400 µg/kg) pelas vias i.v. (A), s.c. (B) e i.d. (C). As amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca. O ELISA foi desenvolvido conforme descrito em Materiais e Métodos com placas sensibilizadas com soro anti-*Lonomia* (1:1000 em TL contendo 5 mM de EDTA). Os pontos representam a média ± EPM de 4 ratos. L.D., limite de detecção.

5. Discussão e Conclusões Gerais

5. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES GERAIS

O contato da pele com as cerdas das lagartas do gênero *Lonomia* leva a distúrbios hemostáticos que se manifestam por anormalidades na coagulação sanguínea e fibrinólise. No sul do Brasil, principalmente nos Estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, a incidência de tais acidentes (739 vítimas de 90 a maio/98), contrasta com o número de acidentes na Venezuela (24 casos em 25 anos) (CIT, 1998, Kelen, 1996). Devido ao grande número de acidentes com as lagartas *L. obliqua* e a gravidade dos seus sintomas, o Instituto Butantan desenvolveu um antiveneno a partir da imunização de cavalos com o extrato de cerdas destas lagartas (Dias da Silva *et al.*, 1996). Alguns estudos realizados com o soro anti-lonômico em humanos, mostraram eficácia terapêutica com rápida normalização das provas de coagulação (Duarte *et al.*, 1997a, 1997b). Até o momento não existem métodos diagnósticos específicos para os acidentes com lagartas *L. obliqua*. Se o Tempo de Coagulação (TC) estiver normal e não houver sangramentos, o paciente é acompanhado por 48 h, com avaliação do TC a cada 12 h. Se o TC estiver alterado ou houver evidências de sangramento, é confirmado o diagnóstico de síndrome hemorrágica (Ministério da Saúde, 1998). Portanto, o desenvolvimento de um método rápido e sensível para detectar veneno circulante nas vítimas, poderia talvez auxiliar o diagnóstico e a decisão clínica na administração do antiveneno.

As condições do ELISA sanduíche desenvolvido neste trabalho foram padronizadas em experimentos preliminares onde as diluições ótimas do antígeno, anticorpo e conjugado foram determinadas. Nestas condições, o limite de detecção obtido foi de 0,5 - 1 ng/poço (5 - 10 ng/ml) em PBS, soro humano e de ratos. Comparando o limite de detecção obtido com o de outros trabalhos (Tabela 2, pág. 27), verificamos que o ensaio desenvolvido neste estudo, mostrou-se bastante sensível. O ensaio foi relativamente rápido (tempo total: 3 h) pois as placas podem ser sensibilizadas, bloqueadas e estocadas em "freezer" até o momento do uso.

O ensaio apresentou alto título de ponto final ($> 1:10.000$) e valores de branco $< 0,15$, parâmetros estes considerados bons indicadores para um ELISA (Crowther, 1995). O coeficiente de variação intra-ensaio foi $< 5\%$ e o coeficiente de variação inter-ensaio $< 20\%$.

Esta variação inter-ensaio pode ser devido à adsorção não uniforme do anticorpo à superfície plástica, uma variável difícil de ser controlada (Clark e Engvall, 1980).

O ELISA desenvolvido mostrou alta especificidade. O soro anti-*Lonomia* não reconheceu os antígenos nos venenos das serpentes *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. neuwiedi*, *Crotalus durissus terrificus*, mesmo com altas quantidades destes (até 100 µg/poço). O mesmo resultado foi obtido quando os venenos do escorpião *T. serrulatus* e da aranha *P. nigriventer* foram testados em quantidades até 50 µg/poço. Entretanto, o imunoblot revelou uma fraca reatividade entre o soro anti-*Lonomia* e os venenos de *T. serrulatus* e *P. nigriventer* quando testados em concentração superior àquela usada no ELISA. O ELISA desenvolvido é capaz de detectar níveis séricos de veneno na faixa de ηg/ml, e nesta faixa de detecção não há reação cruzada entre o antissoro e os venenos de *P. nigriventer* e *T. serrulatus*.

Apesar do soro anti-*Lonomia* ter sido desenvolvido a partir da imunização de cavalos com o extrato das cerdas desta taturana, o soro também interagiu fortemente com a hemolinfa da *L. obliqua*. A semelhança dos perfis de imunoreatividade obtidos com extrato de cerdas e hemolinfa no ELISA, foi confirmada pelo imunoblot, imunodifusão e imunoeletroforese. Semelhantemente, os perfis de eluição (280 nm) obtidos após cromatografia em Superdex 75, revelaram que há grande semelhança na composição proteica do extrato de cerdas e hemolinfa. O perfil de imunoreatividade obtido pelo ELISA com as frações da hemolinfa foi muito semelhante ao perfil das frações do extrato de cerdas. Resultados semelhantes foram obtidos por Lamy *et al.*, 1986, mostrando semelhança entre as proteínas do extrato de cerdas, extrato cuticular e hemolinfa da lagarta *Thaumetopoea pityocampa*.

Ainda não se sabe se as proteínas da hemolinfa de *L. obliqua* atuam sobre a cascata de coagulação de forma semelhante à do extrato de cerdas. Entretanto, a identidade imunológica entre estas duas misturas de proteínas sugere que o veneno pode ser derivado da hemolinfa. Alguns trabalhos desenvolvidos com *L. achelous*, indicaram que o extrato de cerdas, hemolinfa e saliva possuem atividades importantes que podem contribuir para a alteração da coagulação (Arocha-Piñango e Layrisse, 1969; Arocha-Piñango *et al.*, 1981, 1988, 1992).

A hemolinfa de *L. achelous* reagiu moderadamente com o antissoro-lonômico. As técnicas de imunodifusão, imunoeletroforese e imunoblot mostraram que há identidade

imunológica parcial entre a hemolinfa de *L. achelous* e o extrato de cerdas e hemolinfa de *L. obliqua*, o que faz certo sentido, pois estas duas lagartas pertencem ao mesmo gênero.

Pelo ELISA, o soro anti-*Lonomia* produziu fraca reação cruzada com o extrato de cerdas e hemolinfa de *A. rectilinea*. Analisando o imunoblot, verificou-se que a imunoreatividade do extrato de cerdas foi menor do que a da hemolinfa. Esta diferença de imunoreatividade pode ser explicada pela presença de uma membrana diafragma que separa o espinho da cavidade onde circula a hemolinfa. Este diafragma está presente em lagartas do gênero *Automeris*, *Dirphia*, *Catocala* e possivelmente *Megalopyge* (Kawamoto e Kumada, 1984).

As salivas de *L. obliqua* e *A. rectilinea* não reagiram com o soro anti-*Lonomia*, em nenhuma das técnicas usadas, mesmo em concentrações elevadas. A cromatografia da saliva de *L. obliqua* também mostrou um perfil de eluição (280 nm) bem diferente dos perfis do extrato de cerdas e da hemolinfa e as frações apresentaram imunoreatividade (492 nm) com valores próximos aos do branco do ensaio. Estes resultados mostram que não há semelhança entre a composição proteica da saliva e a do extrato de cerdas/hemolinfa.

O estabelecimento da cinética do veneno no soro é um passo essencial no desenvolvimento de um método capaz de detectar veneno circulante, fenômeno em que o peso corporal da vítima, tempo decorrido da inoculação e níveis séricos do veneno são fatores importantes. Tal estudo permitiria o desenvolvimento de um tratamento personalizado, onde o paciente receberia somente a quantidade de antissoro necessária para neutralizar a quantidade de veneno circulante, reduzindo assim, o risco de reações adversas ao antissoro.

A cinética do veneno de *L. obliqua* (absorção, distribuição e eliminação) em pacientes acidentados ou animais envenenados experimentalmente ainda não foi descrita. Por esta razão, este trabalho visou estudar a cinética do extrato de cerdas por três vias. A via intravenosa, foi realizada como controle para testar a eficácia do ELISA em detectar antígenos circulantes. As vias subcutânea e intradérmica foram estudadas porque acreditamos que as lagartas possam injetar o veneno nestes tecidos, e a partir daí, o veneno possa ser absorvido para a circulação.

Por via intravenosa, a concentração máxima de antígenos circulantes em ratos foi obtido 15 min após a injeção, caindo rapidamente em seguida e tornou-se não mensurável após 16 horas, evidenciando uma rápida distribuição do veneno nas primeiras horas após a injeção. A curva farmacocinética obtida foi bifásica, com fase inicial de declínio rápido nos níveis

circulantes de veneno seguida por uma fase terminal mais lenta. Isso se assemelha bastante à cinética observada com outros venenos (Ismail *et al.*, 1980; Maung-Maung-Thwin *et al.*, 1988) e toxinas purificadas (Guo *et al.*, 1993). Por via subcutânea, foram obtidos três picos: 30 min, 4 h e 16 h após a injeção e em 48 h ainda havia veneno circulante. Um problema encontrado com esta via foi a grande variação nos níveis obtidos. O motivo destas diferenças precisa ser esclarecido, mas poderia estar associado à espécie de animal teste usada, neste caso ratos. Em experimentos futuros, a cinética será examinada em camundongos. Por via intradérmica, o nível máximo de antígenos circulantes ocorreu 1 h após a injeção e tornou-se não mensurável após 16 h. Num estudo realizado por Gonçalves *et al.* (1996), observou-se que o nível de fibrinogênio tornou-se não detectável 30 min após a administração de 150 µg de extrato de cerdas via i.d. em ratos. A normalização do fibrinogênio ocorreu 48 h após o envenenamento, quando o nível de fibrinogênio alcançou a concentração de 50% dos valores normais. Comparando esses resultados com a cinética obtida neste trabalho, observou-se que o efeito sobre a coagulação está relacionado aos níveis circulantes de veneno. Embora todos os animais tenham recebido a mesma dose de veneno (400 µg/kg), as concentrações obtidas na circulação variaram de acordo com a via de administração (i.v., s.c. ou i.d.). Todos animais após algum tempo da injeção de veneno, manifestaram sinais e sintomas clínicos do envenenamento como hematúria e epistaxe. Entretanto, aqueles que receberam o extrato de cerdas por via i.v., pareciam apresentar um quadro clínico de maior gravidade (com base em observações clínicas do animal) do que aqueles que receberam o veneno por via s.c. ou i.d., sugerindo que a gravidade do envenenamento pode estar correlacionada às concentrações séricas de veneno.

Em conclusão, demonstramos neste estudo que (1) o extrato de cerdas possui composição imunológica semelhante à da hemolinfa, o que poderia indicar a utilidade desta última na imunização de animais para obtenção do antissoro, (2) não há correlação entre a composição do extrato de cerdas/hemolinfa e a saliva de *L. obliqua*, (3) o extrato de cerdas e hemolinfa de *L. obliqua* possuem identidade imunológica parcial com a hemolinfa de *L. achelous*, (4) o ELISA desenvolvido para detecção das proteínas do extrato de cerdas foi bastante sensível, específico e rápido e (5) o ELISA detectou antígenos circulantes no soro de ratos envenenados experimentalmente e poderá ser útil na monitorização dos níveis circulantes de veneno em humanos.

6. Summary

6. SUMMARY

Human envenoming by caterpillars of the saturnid moth *Lonomia obliqua* in southern Brazil leads to hemostatic disturbances and hemorrhage, with death resulting from acute renal failure or intracranial hemorrhage. Little is known of the biochemical and immunological composition of the venom of these caterpillars. This thesis describes an immunological study of the venom of this species, including the development of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of *L. obliqua* venom.

The immunoreactivities of *L. obliqua* spicule extract, hemolymph and saliva with antiserum to *L. obliqua* venom were compared by Ouchterlony immunodiffusion, immunoelectrophoresis and immunoblotting following SDS-PAGE. The reactivity of the antivenom with other animal venoms was also assessed. In immunodiffusion, the spicule extract and hemolymph showed several immunoprecipitin lines, some of which had complete identity. Hemolymph from the related *L. achelous* also reacted with the antivenom, but to a lesser extent, and showed some lines of partial identity with *L. obliqua* hemolymph. Except for a spicule extract and hemolymph from the saturnid moth *Automeris rectilinea* which showed weak immunoprecipitin lines of non-identity with *L. obliqua* spicule extract and hemolymph, there was no reaction between *L. obliqua* antiserum and the other animal venoms tested. Immunoelectrophoresis essentially confirmed the immunoreactivities observed with immunodiffusion. Immunoblotting showed that the profile of the spicule extract was similar to that of hemolymph, particularly in the region of 45-205 kDa. A spicule extract from *A. rectilinea* and hemolymph from *A. rectilinea* and *L. achelous* showed several bands similar to those seen with *L. obliqua* spicules and hemolymph. There was no reactivity with *A. rectilinea* or *L. obliqua* saliva in these assays. There was very low (non-specific) reactivity with *P. nigriventer* and *T. serrulatus* venoms but no reactivity with snake venoms.

For the ELISA, multiwell plates were coated overnight with antivenom to *L. obliqua* venom (1:1000) and then washed and incubated with spicule extract, hemolymph, saliva or other animal venoms. After washing and incubation with affinity-purified IgG conjugated to peroxidase (1:800), substrate (o-phenylenediamine) was added and the absorbance read at 492

nm after 30 min. In some experiments, *L. obliqua* spicule extract, hemolymph and saliva were fractionated by gel filtration on Superdex 75 equilibrated with 0.1 M Tris-HCl, pH 7.8 and the immunoreactivity of the fractions was tested by ELISA.

The detection limit for spicule extract in the ELISA was 0.5-1.0 ng/well (5-10 ng/ml) with a maximum response at ≥ 2 $\mu\text{g/well}$ (20 $\mu\text{g/ml}$). The intra-assay coefficient of variation was <5%. *L. obliqua* hemolymph showed an immunoreactivity which was almost identical to that of the spicule extract whereas saliva showed no reactivity. There was moderate cross-reactivity with *L. achelous* hemolymph and low cross-reactivity with hemolymph and a spicule extract from the saturnid caterpillar *Automeris rectilinea*. No cross-reactivity was observed with scorpion, snake or spider venoms (up to 100 $\mu\text{g/well}$). Gel filtration chromatography on Superdex 75 showed that *L. obliqua* spicule extract and hemolymph had very similar elution profiles at 280 nm and similar immunoreactivities in the ELISA. Both of these differed markedly from the elution profile and immunoreactivity of saliva.

The i.v. administration of *L. obliqua* spicule extract in rats (400 $\mu\text{g/kg}$) showed a rapid decline in circulating antigen levels in the first 2 h, followed by a progressive decrease up to 16 h post-injection after which antigens were no longer detectable. When the same dose was injected s.c., there was considerable variation in the serum antigen levels with peaks being observed at 0.5, 4 and 16 h post-injection. The kinetic profile obtained with i.d. administration was similar to that seen following i.v. injection, although the absolute antigen levels were much lower.

These results show that there is little or no cross-reactivity between *L. obliqua* antiserum and non-saturnid animal venoms. The similar immunoreactivities of the spicule extract and hemolymph suggest that the venom may be derived from the hemolymph. Whether the latter may be a useful source for the purification of factors affecting the coagulation cascade remains to be determined. The sensitivity and specificity of the ELISA developed may be useful for immunodiagnosis in a clinical setting, although the time after envenomation and amount of venom injected may be limiting factors in the detection of circulating antigens, as shown by the kinetic experiments in rats.

7. Referências Bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amaral CFS, Campolina D, Dias MB, Bueno CM, Chávez-Olórtegui C, Penaforte CL, Diniz CR, Rezende NA. (1997) Time factor in the detection of circulating whole venom and crotoxin and efficacy of antivenom therapy in patients envenomed by *Crotalus durissus*. *Toxicon* **35**, 699-704.
- Amarant T, Burkhart W, LeVine III H, Arocha-Piñango CL, Parikh I (1991) Isolation and complete amino acid sequence of two fibrinolytic proteinases from the toxic saturnid caterpillar *Lonomia achelous*. *Biochim. Biophys. Acta* **1079**, 214-221.
- Amuy E, Alape-Girón A, Lomonte B, Thelestam M, Gutiérrez JM (1997) Development of immunoassays for determination of circulating venom antigens during envenomation by coral snakes (*Micrurus* species). *Toxicon* **35**, 1605-1616.
- Arocha-Piñango CL, Blumenfeld de Bosch N, Nouel AL, Torres A, Perales J, Alonso ME, de Rodriguez S, Carvajal ZA, Ojeda A, Tasayco ML, Chitty W (1988) Fibrinolytic and procoagulant agents from a Saturnidae moth caterpillar. In: *Hemostasis and Animal Venoms*. (Pirkle H, Markland FS, eds.), pp. 223-240, Marcel Dekker:New York.
- Arocha-Piñango CL, Bosch NB, Torres A, Goldstein C, Nouel A, Arguello A, Carvajal Z, Guerrero B, Ojeda A, Rodrigues A, Rodrigues S (1992) Six new cases of a caterpillar-induced bleeding syndrome. *Thromb. Haemost.* **67**, 402-407.
- Arocha-Piñango CL, Layrisse M (1969) Fibrinolysis produced by contact with a caterpillar. *Lancet* **1**, 810-812.
- Arocha-Piñango CL, Perales J, Carvajal Z (1981) Studies on the degradation of fibrinogen by proteolytic enzymes from the larvae of *Lonomia achelous* (Cramer). *Thromb. Haemost.* **46**, 233-236.

- Audebert F, Sorkine M, Bon C (1992) Envenoming by viper bites in France: clinical gradation and biological quantification by ELISA. *Toxicon* **30**, 599-609.
- Barral-Netto M, Schriefer A, Vinhas V, Almeida AR (1990) Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Bothrops jararaca* venom. *Toxicon* **28**, 1053-1061.
- Barral-Netto M, Vinhas V, Schriefer A, Barral A, Santos SB, Almeida AR, Novaes G (1991) Immunological studies with the venom of the scorpion *Tityus serrulatus*. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **24**, 171-180.
- Barral-Netto M, von Sohsten RL (1991) Serum kinetics of crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* venom in mice: evidence for a rapid clearance. *Toxicon* **29**, 527-531.
- Bleumink E, De Jong MCJM, Kawamoto F, Meyer GT, Kloosterhuis AJ, Slijper-Pal IJ (1982) Protease activities in the spicule venom of *Euproctis* caterpillars. *Toxicon* **20**, 607-613.
- Bober MA, Ownby CL (1988) Use of affinity-purified antibodies to measure the *in vivo* disappearance of antibodies to myotoxin *a*. *Toxicon* **26**, 301-308.
- Bucarechi F, Mantovani RS, Vieira RJ, Fonseca MRCC, Pereira FSVT, Hen FH (1997) Acidentes por lagartas do gênero *Lonomia* na região de Campinas: descrição de dois casos. 2º Encontro Nacional de Acidentes com Animais Peçonhentos, Porto Alegre, RS, de 29 a 31 de maio de 1997 (Resumo).
- Bucher B, Canonge D, Thomas L, Tyburn B, Robbevincent A, Choumet V, Bon C, Ketterle J, Lang J, Biao T, Brunod M, Garnier D, Guerin JF, Hillion G, Leonard C, Marienelly CA, Moravie V, Numeric P, Ortole O, Pecout F, Plumelle Y, Rieux D, Rouvel C, Smadja D, Symphor G, RGSBM (1997) Clinical indicators of envenoming and serum levels of venom antigens in patients bitten by *Bothrops lanceolatus* in Martinique. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **91**, 186-190.

- Burdmann EA, Antunes I, Saldanha LB, Abdulkader CMR (1996) Severe acute renal failure induced by the venom of *Lonomia* caterpillars. *Clinical Nephrology* **46**, 337-339.
- Cardoso JLC, Tarcísio Filho SB, Carneiro ECG, Moraes RHP (1990) Surto de dermatite por *Hylesia paulex* no litoral do Estado de São Paulo, Bertioga, verão de 1990. *Mem. Inst. Butantan*, **52**, 82-83.
- Catty D, Raykundalia C (1989) ELISA and related enzyme immunoassays. In: *Antibodies – a Practical Approach. Vol. II.* (Catty D, ed.), pp. 97-154, IRL Press: Oxford.
- CIT – Centro de Informação Toxicológica. Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por *Lonomia*. Porto Alegre, 1998, 20 p.
- Chávez-Olórtegui C, Fonseca SC, Campolina D, Amaral CF, Diniz CR (1994) ELISA for the detection of toxic antigens in experimental and clinical envenoming by *Tityus serrulatus* scorpion venom. *Toxicon* **32**, 1649-1656.
- Chávez-Olórtegui C, Lopes CS, Cordeiro FD, Granier C, Diniz CR (1993) An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) that discriminates between *Bothrops atrox* and *Lachesis muta muta* venoms. *Toxicon* **31**, 417-425.
- Chávez-Olórtegui C, Penaforte CL, Silva RR, Ferreira AP, Rezende NA, Amaral CFS, Diniz CR (1997) An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) that discriminates between the venoms of Brazilian *Bothrops* species and *Crotalus durissus*. *Toxicon* **35**, 253-260.
- Chávez-Olórtegui C, Zanetti VC, Ferreira AP, Minozzo JC, Mangili OC, Gubert, IC (1998) ELISA for the detection of venom antigens in experimental and clinical envenoming by *Loxosceles intermedia* spiders. *Toxicon* **36**, 563-569.

- Chippaux JP, Goyffon M (1998) Venoms, antivenoms and immunotherapy. *Toxicon* **36**, 823-846.
- Clark BR, Engvall E (1980) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): theoretical and practical aspects. In: *Enzyme-immunoassay* (Maggio ET, ed.). pp. 167-196. CRC Press.
- Clausen J (1988) *Immunochemical Techniques for the Identification and Estimation of Macromolecules*. pp. 64-162, Elsevier Science Publishing Company: New York.
- Crowther JR (1995) *ELISA: Theory and Practice. Methods in Molecular Biology*. Humana Press: Totowa, NJ, 223 p.
- De Jong MCJM, Kawamoto F, Bleumink E, Kloosterhuis AJ, Meijer GT (1982) A comparative study of the spicule venom of *Euproctis* caterpillars. *Toxicon* **20**, 477-485.
- Dias da Silva W, Campos ACMR, Gonçalves LRC, Sousa-e-Silva MCC, Higashi HG, Yamagushi IK, Kelen EMA (1996) Development of an antivenom against toxins from *Lonomia obliqua* caterpillars. *Toxicon* **34**, 1045-1049.
- Donato JL, Moreno RA, Hyslop S, Duarte A, Antunes E, de Nucci G (1993) Thrombin-like activity present in the spicule of *Lonomia obliqua* (Walker). VIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, Caxambu, MG, p. 306 (Resumo).
- Donato JL, Moreno RA, Hyslop S, Duarte A, Antunes E, Le Bonniec BF, Rendu F, de Nucci G (1998) *Lonomia obliqua* caterpillars trigger human blood coagulation via factor X activation. *Thromb. Haemost.* **79**, 539-542.
- Duarte AC, Caovilla JJ, Kelen EMA, Wen FH, Machado SMS, Hermann F, Renner LO, Santos SR, Tefilli AP, Rodrigues C, Butzke LMW (1997a) Estudo comparativo entre o soro anti-Lonômico e o ácido aminocapróico. 2º Encontro Nacional de Acidentes com Animais Peçonhentos, Porto Alegre, RS, 29 a 31 de maio de 1997, p. 65 (Resumo).

- Duarte AC, Caovilla JJ, Kelen EMA, Wen FH, Machado SMS, Hermann F, Renner LO, Santos SR, Tefilli AP, Rodrigues C, Butzke LMW (1997b) Soro anti-Lonômico: uma nova terapêutica. 2º Encontro Nacional de Acidentes com Animais Peçonhentos, Porto Alegre, RS, 29 a 31 de maio de 1997, p. 66 (Resumo).
- Duarte AC, Caovilla J, Lorini I, Lorini D, Mantovani G, Sumida J, Manfre PC, Silveira RC, Maura SP de (1990) Insuficiência renal aguda por acidente com lagartas. *J. Bras. Nefrol.* **12**, 184-187.
- Duarte AC, Crusius PS, Pires CAL, Schilling MA, Fan HW (1996). Intracerebral hemorrhage after contact with *Lonomia* caterpillar. *Lancet* **348**, 1033.
- Fraiha Neto H, Costa Jr D, Queiroz de Leão RN, Ballarini AJ (1992) Acidentes hemorrágicos por larvas de *Lonomia*. In: *Plantas Venenosas e Animais Peçonhentos*. (Schvartsman S, ed.). pp. 241-244, Sarvier: São Paulo.
- Gardner TL, Elston DM. (1997) Painful papulovesicles produced by the puss caterpillar. *Cutis* **60**, 125-126.
- Garfin DE (1990) One-dimensional gel electrophoresis. *Meth. Enzymol.* **182**, 425-441.
- Goding JW (1986) *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*. 2nd ed. Academic Press: London.
- Gonçalves LRC, Sousa e Silva MCC, Tomy SC, Oliveira MRL, Sano-Martins IS, Castro SCB, Kelen EMA (1996) Evolution of hemostatic and hematological alterations after experimental envenoming by *Lonomia obliqua* caterpillars in rats. IV Simpósio da Sociedade Brasileira de Toxinologia, Recife, PE, 06 a 11 outubro de 1996, p. 146 (Resumo).

- Guerrero B, Arocha-Piñango CL (1992) Activation of human prothrombin by the venom of *Lonomia achelous* (Cramer) caterpillars. *Thromb. Res.* **66**, 169-177.
- Guerrero B, Arocha-Piñango CL, San Juan AG (1997) Degradation of human factor XIII by lonomin V, a purified fraction of *Lonomia achelous* caterpillar venom. *Thromb. Res.* **87**, 171-181.
- Guo MP, Wang QC, Liu GF (1993) Pharmacokinetics of cytotoxin from Chinese cobra (*Naja naja atra*) venom. *Toxicon* **31**, 339-343.
- Hames BD, Rickwood D (1990) *Gel Electrophoresis of Proteins: a Practical Approach* (Hames BD, Rickwood D, eds.), pp. 1-383, IRL Press:Oxford.
- Ho M, Warrell MJ, Warrell DA, Bidwell D, Voller A (1986) A critical reappraisal of the use of enzyme-linked immunosorbent assays in the study of snakebite. *Toxicon* **24**, 211-221.
- Ismail M, Abdullah ME, Morad AM, Ageel AM (1980) Pharmacokinetics of ¹²⁵I-labelled venom from the scorpion *Androctonus amoreuxi* (Aud. and Sav.). *Toxicon* **18**, 301-308.
- Kalapothakis E, Chávez-Olórtegui C (1997) Venom variability among several *Tityus serrulatus* specimens. *Toxicon* **35**, 1523-1529.
- Kawamoto F, Kumada N (1984) Biology and venoms of Lepidoptera. In: *Handbook of Natural Toxins. Vol. 2. Insect Poisons, Allergens and other Invertebrate Venoms.* (Tu AT, ed.), pp. 291-330, Marcel Dekker: New York.
- Kelen EMA (1996) Envenoming by *Lonomia* caterpillars: hemostatic disturbances and serumtherapy. IV Simpósio da Sociedade Brasileira de Toxinologia, Recife, PE, 06 a 11 de outubro de 1996, p. 51 (Resumo).

- Kelen EMA, Picarelli ZP, Duarte AC (1995) Hemorrhagic syndrome induced by contact with caterpillars of the genus *Lonomia* (Saturnidae, Hemileucinae). *J. Toxinol. Toxin Rev.* **14**, 283-308.
- Krifi MN, Kharrat H, Zghal K, Abdouli M, Abroug F, Bouchoucha S, Dellagi K, El Ayeb M (1998) Development of an ELISA for the detection of scorpion venoms in sera of humans envenomed by *Androctonus australis garzonii* (Aag) and *Buthus occitanus tunetanus* (Bot): correlation with clinical severity of envenoming in Tunisia. *Toxicon* **36**, 887-900.
- Labrousse H, Nishikawa KA, Bon C, Avrameas S (1988) Development of a rapid and sensitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for measuring venom antigens after an experimental snakebite. *Toxicon* **26**, 1157-1167.
- Lamy M (1990) Contact dermatitis (erucism) produced by processionary caterpillars (Genus *Thaumetopoea*). *J. Appl. Ent.* **110**, 425-437.
- Lamy M, Pastureaud MH, Novak F, Ducombs G, Vincendeau P, Maleville J, Texier L (1986) Thaumetopoein: an urticating protein from the hairs and integument of the pine processionary caterpillar (*Thaumetopoea pityocampa* Schiff., Lepidoptera, Thaumetopoeidae). *Toxicon* **24**, 347-356.
- Maria WS, Cambuy MO, Costa JO, Velarde DT, Chávez-Olórtegui C (1998) Neutralizing potency of horse antiothropic antivenom. Correlation between *in vivo* and *in vitro* methods. *Toxicon* **36**, 1433-1439.
- Maung-Maung-Thwin, Khin-Mee-Mee-, Mi-Mi-Kyin, Thein-Than (1988) Kinetics of envenomation with Russell's viper (*Vipera russelli*) venom and of antivenom use in mice. *Toxicon* **26**, 373-378.

- Ministério da Saúde (1998) Acidentes por lepidópteros. In: *Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos*. Fundação Nacional de Saúde. Brasília, 131 p.
- Pesce H, Delgado A (1971) Poisoning from adult moths and caterpillars. In: *Venomous Animals and their Venoms*. (Bucherl W, Buckley EE, eds), pp. 119-156, Academic Press:London.
- Peterson GL (1977) A simplification of the protein assay method of Lowry et al. Which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry* **83**, 346-356.
- Picarelli ZP, Valle JR (1971) Pharmacological studies on caterpillar venoms. In: *Venomous Animals and their Venoms*. (Bucherl W, Buckley EE, ed5), pp. 103-118, Academic Press:London.
- Pinson RT, Morgan, JA (1991) Envenomation by the puss caterpillar (*Megalopyge opercularis*). *Ann. Emerg. Med.* **20**, 562-564.
- Pinto Moraes RH (1992) Acidentes por lepidópteros. In: *Plantas Venenosas e Animais Peçonhentos*. (Schvartsman S, ed.). pp. 233-236, Sarvier:São Paulo.
- Reis CV (1998) Purificação e caracterização de uma proteína procoagulante presente nas cerdas da lagarta *Lonomia obliqua*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo.
- Reis CV, Kelen EMA, Farsky SH, Portaro FCV, Sampaio CAM, Fernandes BL, Camargo ACM, Chudzinski-Tavassi AM (1999) A Ca⁺⁺ activated serine protease (LOPAP) could be responsible for the haemorrhagic syndrome caused by the *Lonomia obliqua*. *Lancet* **353**, 1942.

- Rezende NA, Dias MB, Campolina D, Chávez-Olórtegui C, Amaral CFS (1995) Standardization of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detecting circulating toxic venom antigens in patients stung by the scorpion *Tityus serrulatus*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* **37**, 71-74.
- Selvanayagam ZE, Gopalakrishnakone P (1999) Tests for detection of snake venoms, toxins and venom antibodies: review on recent trends (1987-1997). *Toxicon* **37**, 565-586.
- Silamut K, Ho M, Looareesuwan S, Viravan C, Wuthiekanun V, Warrell DA (1987) Detection of venom by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) in patients bitten by snakes in Thailand. *Br. Med. J.* **294**, 402-404.
- Sjostrom L, Karlson-Stiber C, Persson H, Al-Abdulla IH, Smith DC (1996) Development and clinical application of immunoassays for European adder (*Vipera berus berus*) venom and antivenom. *Toxicon* **34**, 91-98.
- Stoscheck CM (1990) Quantitation of protein. *Meth. Enzymol.* **182**, 50-68.
- Tan NH, Yeo KH, Jaafar MIN (1992) The use of Enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitation of *Calloselasma rhodostoma* (Malayan pit viper) venom and venom antibodies. *Toxicon* **30**, 1609-1620.
- Theakston RDG (1983) The application of immunoassay techniques, including enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to snake venom research. *Toxicon* **21**, 341-352.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350-4354.

Tun-Pe, Ba-Aye, Aye-Aye-Myint, Tin-Ne-Swe, Warrell DA (1991) Bites by Russell's vipers (*Daboia russelli siamensis*) in Myanmar: effect of the snake's length and recent feeding on venom antigenaemia and severity of envenoming. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **85**, 804-808.

Watanabe M, Sakai A, Kouda T, Sawai Y (1988) Detection of *Agkistrodon b. blomhoffii* venom in serum of mice by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Snake* **20**, 25-29.