

Patricia Costa Panunto

**COMPARAÇÃO IMUNOQUÍMICA DOS ANTI-
SOROS PRODUZIDOS EM COELHOS A
PARTIR DO EXTRATO DE CERDAS E DA
HEMOLINFA DE LAGARTAS DA MARIPOSA**
Lonomia obliqua

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado, apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Farmacologia da Farmacêutica - Patricia Costa Panunto.

Campinas, 07 de junho de 2002.

Stephen Hyslop
Prof. Dr. Stephen Hyslop
Orientador

**Campinas
2002**

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Patricia Costa Panunto

**COMPARAÇÃO IMUNOQUÍMICA DOS ANTI-
SOROS PRODUZIDOS EM COELHOS A
PARTIR DO EXTRATO DE CERDAS E DA
HEMOLINFA DE LAGARTAS DA MARIPOSA
*Lonomia obliqua***

Dissertação de Mestrado apresentada à
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

**Campinas
2002**

UNIDADE	BC
CHAMADA	11/UNICAMP
	P196c
EX	
OMBO BC/	59572
ROC.	16-117-04
C	☐
D	☒
REÇO	11,00
ATA	
CPD	

35674 223682

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

P196c Panunto, Patrícia Costa

 Comparação imunoquímica dos anti-soros produzidos em coelhos a partir do extrato de cerdas e da hemolinfa de lagartas da mariposa. / Patrícia Costa Panunto. Campinas, SP : [s.n.], 2002.

 Orientador : Stephen Hyslop

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

 1. Coagulação. 2. Veneno. 3. Imunoquímica. 4. Hemóstase.
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:

Prof. Dr. Stephen Hyslop

Profa. Dra. Ida Sigueko Sano-Martins

Profa. Dr. Fábio Bucarechi

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

Data: 07/06/02

DEDICATÓRIA

A minha irmã Themys, que esteve presente em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Stephen Hyslop, pela orientação e amizade.

À Ana Lúcia, do Serviço Social da Faculdade do Sagrado Coração, pelo incentivo, apoio e 'força' para transpor os obstáculos.

Aos amigos do laboratório que, certamente, os levarei por toda vida.

Ao técnico José Ilton dos Santos, por sempre estar disposto a ajudar e ensinar.

À Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pelo apoio financeiro.

Aos secretários da pós-graduação e à seção de Apoio Didático da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp pelos serviços prestados.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURA.....	xiii
LISTA DE FIGURA.....	xv
LISTA DE TABELAS.....	xvii
RESUMO.....	xix
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	23
1.1. Ciclo biológico da <i>Lonomia obliqua</i>	25
1.2. Morfologia das cerdas.....	27
1.3. Composição e ação do veneno de <i>Lonomia</i>	29
1.4. Acidentes.....	33
1.4.1. Manifestações clínicas do envenenamento.....	33
1.4.2. Tratamento.....	36
1.5. Base do presente estudo.....	37
2. OBJETIVOS.....	39
3. RESULTADOS.....	41
3.1. Artigo para publicação (Toxicon).....	42
4. CONCLUSÃO GERAL.....	69
5. SUMMARY.....	72
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74

LISTA DE ABREVIATURAS

EACA	Ácido épsilon-amino-capróico
EDTA	Ácido etileno diamino tetra-acético
ELISA	“Enzyme-linked immunosorbent assay”
LOPAP	<i>Lonomia obliqua</i> prothrombin activator protease
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonila
TP	Tempo de protrombina
TTP	Tempo de tromboplastina parcial

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. O ciclo biológico da <i>Lonomia obliqua</i>	26
Figura 2. Microscopia óptica e eletrônica de varredura das cerdas da <i>Lonomia obliqua</i>	28
Figura 3. Cascata de coagulação sanguínea e ação de componentes presentes nos venenos de <i>L. obliqua</i> e <i>L. achelous</i>	31
Figura 4. Manifestações clínicas do envenenamento.....	34
Figura 5. Reatividade cruzada do soro anti-lonomia com diferentes Venenos.....	38
 Figuras do artigo para publicação	
Figure 1. Dilution curves for antisera against a spicule extract and hemolymph from <i>L. obliqua</i>	62
Figure 2. Antigen dilution curves for <i>L. obliqua</i> spicule extract and hemolymph using rabbit and commercial antisera.....	63
Figure 3. Electrophoretic profile of <i>L. obliqua</i> spicule extract and hemolymph following SDS_PAGE in a 10% polyacrylamide	64
Figure 4. Immunoblot profile of <i>L. obliqua</i> spicule extract and hemolymph following incubation with rabbit or commercial antisera.....	65

Figure 5. Immunoelectrophoresis <i>L. obliqua</i> spicule extract and Hemolymph following using rabbit and commercial antisera	66
Figure 6. Elution profiles of <i>L. obliqua</i> spicule extract and hemolymph following gel filtration on Superdex 75 and immunoreactivity of the fractions with rabbit and commercial antisera.....	67
Figure 7. Coagulant activity.....	68

LISTA DE TABELA

Tabela 1. As principais proteínas identificadas em extrato de cerdas e hemolinfa de espécies de <i>Lonomia obliqua</i>	30
---	----

RESUMO

RESUMO

O contato com lagartas de mariposas do gênero *Lonomia* pode resultar em envenenamento grave, com distúrbios da coagulação e hemorragia. Em casos fatais, têm sido associado à falência renal e hemorragia intracerebral. Atualmente a soroterapia com o anti-soro eqüino produzido contra o extrato de cerdas da *Lonomia obliqua* é o tratamento mais eficaz para o envenenamento por esta espécie. Neste trabalho, foram produzidos anti-soros em coelhos contra o extrato de cerdas e a hemolinfa e examinou-se sua imunorreatividade usando as técnicas de ELISA ("enzyme-linked immunosorbent assay"), immunoblot e imunoeletroforese. No ELISA, ambos os anti-soros reagiram igualmente com o extrato de cerdas e com a hemolinfa. Esta imunorreatividade era igual a do anti-soro comercial. Os três anti-soros também mostraram reatividade semelhante no immunoblot. O fracionamento, por gel filtração, do extrato de cerdas e da hemolinfa, demonstrou que possuem perfis de eluição qualitativa muito semelhantes e que as imunorreatividades das frações com os três anti-soros eram muito parecidas. Todos os anti-soros neutralizaram a atividade coagulante do extrato de cerdas em plasma humano citratado. Estes resultados indicam que o extrato de cerdas da *L. obliqua* e hemolinfa compartilham antígenos comuns e que o anti-soro produzido em coelhos e em cavalos reagem igualmente com as amostras biológicas. Os resultados também sugerem que a hemolinfa poderá servir como fonte de antígenos na produção de anti-soro comercial.

1. INTRODUÇÃO GERAL

1. INTRODUÇÃO GERAL

Um grande número de animais possui venenos ou secreções que podem produzir efeitos deletérios em outras espécies. No caso dos invertebrados, pode-se citar dentro do filo Artrópoda a classe Inseta, a qual possui muitas espécies produtoras de algum tipo de toxina prejudicial ao homem (BETTINI, 1978; TU, 1984; AROCHA-PIÑANGO *et al.*, 1999). A ordem Lepidoptera (borboletas e mariposas) representa um desses grupos. Mais de 60 gêneros de lepidópteros são capazes de causar acidentes em humanos e são divididos entre as subordens Rhopalocera (borboletas; duas famílias) e Heterocera (mariposas; oito famílias) (KAWAMOTO & KUMADA, 1984). Nesta última subordem encontra-se a família Saturniidae (Walker, 1855), cujos membros são espalhados no mundo inteiro. Dentro da família Saturniidae, o gênero *Lonomia* principalmente as espécies *Lonomia achelous* e *Lonomia obliqua*, é conhecido como causador de acidentes graves em humanos na Venezuela (ARROCHA-PIÑANGO, 1967), na Guiana Francesa (HOMMEL, BOUCHAREINE & HULIN, 1995) e no Brasil (FRAIHA NETO *et al.*, 1986, 1992; KELEN, PICARELLI, DUARTE, 1995; FAN 2002).

No Brasil, atribui-se os acidentes ocorridos no Norte do país (Amazonas, Pará, Amapá) à *L. achelous*, enquanto os do Sul e Sudeste são causados pela *L. obliqua*. Acredita-se que o aumento do número de acidentes causados por contato com as lagartas de *L. obliqua* deve-se, em parte, à derrubada de matas nativas em várias regiões do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná, uma vez que as lagartas normalmente

alimentam-se da folhagem de árvores silvestres como cedro (*Cetrella fissilis*), figueira do mato (*Ficus subtriplinervia*), araticum (*Rollinia emarginata*), ipê (*Tbebuia pulcherrima*), seringueira (*Ficus elastica*) e plátano (*Platanus acerifolia*). O desmatamento e a expansão agrícola com o uso desmedido de agrotóxicos talvez tenham levado a uma diminuição no número de predadores naturais e, conseqüentemente, a migração das lagartas para ambientes mais próximos ao homem (LUCAS, 1991), especialmente em árvores frutíferas, tais como a pereira (*Pyrus communis*), a ameixeira (*Prunus domestica*), a goiabeira (*Psidium guayava*) e a mangueira (*Manguifera indica*).

1.1. CICLO BIOLÓGICO DA *LONOMIA OBLIQUA*

O ciclo biológico da *L. obliqua* é composto por quatro fases distintas (LORINI & CORSEUIL, 2001), sendo somente a fase larval que apresenta o perigo de causar envenenamento.

A fase embrionária corresponde a um período de aproximadamente 30 dias que se encerra com a eclosão dos ovos de cor verde clara e uniforme (Fig. 1A). Após a eclosão, segue-se a fase larval durante a qual as larvas ou lagartas apresentam comportamento gregário (Fig. 1B), permanecendo em troncos de árvores durante o dia e subindo para a folhagem à noite para se alimentarem. Durante esta fase, que tem duração de aproximadamente 60 dias, as lagartas passam por seis instares ou etapas de crescimento, e é durante este período que acontecem os acidentes. No final do sexto instar, as lagartas páram de se alimentar (fase de pré-pupa), se isolam e diminuem seu

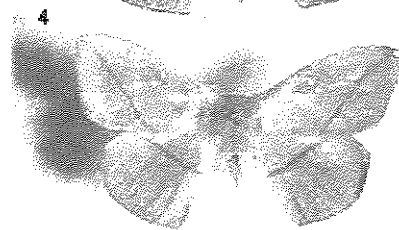
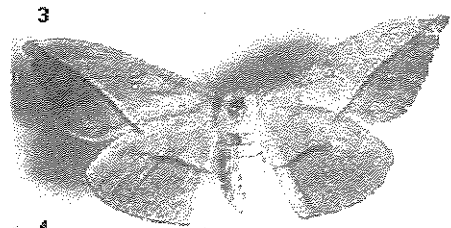
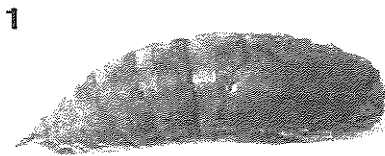
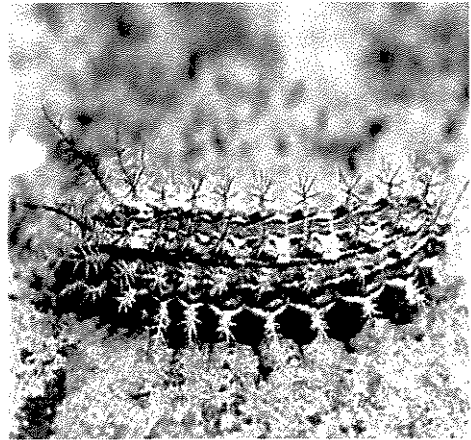
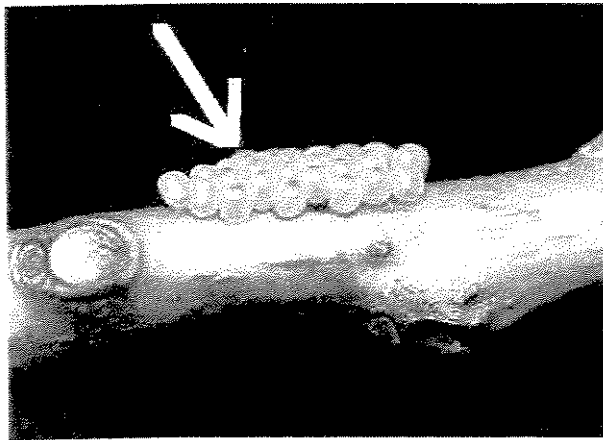


FIGURA 1 - Ciclo biológico da *Lonomia obliqua*. Ovos (A), lagarta (B), pupa macho (C1) e fêmea (C2), mariposa fêmea (D3) macho (D4)

nível de atividade, sendo comum encontrá-las embaixo de restos vegetais ao redor do tronco da árvore hospedeira. Após a contração e o escurecimento do corpo, as lagartas entram em fase de pupa quando permanecem, em média por 70 dias. As pupas têm cor castanho-avermelhado e os machos podem ser distinguidos das fêmeas pela forma, tamanho e aparência dos oitavos e nonos segmentos abdominais (Fig. 1C).

As mariposas apresentam grande dimorfismo sexual, tanto na cor como no tamanho e no tipo de antena (Fig. 1D). Nesta fase, as mariposas não se alimentam por terem a cavidade bucal atrofiada, tendo um período de vida de aproximadamente 5 dias para os machos e de 7 dias para as fêmeas (variando de 4 a 14 dias) (LORINI & CORSEUIL, 2001). Durante este período ocorre o acasalamento e o início de um novo ciclo de vida.

1.2. MORFOLOGIA DAS CERDAS

O envenenamento por espécies de *Lonomia* ocorre através de contato das lagartas com a pele da vítima. Neste contato, as cerdas da lagarta penetram a pele da vítima, injetando posteriormente o veneno. A microscopia óptica e a eletrônica de varredura mostram que as cerdas formam estruturas ramificantes com a aparência de um pinheirinho; com luz e comunicantes com a cavidade central da lagarta e funcionam como uma agulha hipodérmica por onde o veneno é injetado (MARQUES, 1999; CRUZ-HÖFLING & HYSLOP, 2000; VEIGA, BLOCHTEIN, GUIMARÃES, 2001) (Figura 2). O sítio



FIGURA 2 – Microscopia óptica e eletrônica de varredura das cerdas da *Lonomia obliqua*. Estrutura de cerdas da região posterior da Lagarta, com aumento 23x e 100x, respectivamente (A) e (B)
Fonte: CRUZ-HÖFLING, HYSLOP (2000)

de produção do veneno ainda não foi conclusivamente identificado, porém, aparentemente não existe uma glândula especializada para esta função. A superfície interna das cerdas é forrada por uma camada de células epiteliais que poderiam funcionar na produção do veneno, mas isso ainda precisa ser confirmado. O mecanismo de injeção do veneno também ainda não está bem esclarecido, mas poderia envolver a pressão hidrostática/mecânica da cavidade do animal mais a contração do corpo da lagarta por fibras musculares presas ao tegumento, que no conjunto impulsionaria a hemolinfa com o veneno liberado pelo epitélio das cerdas para dentro da vítima.

1.3. COMPOSIÇÃO E AÇÃO DO VENENO DE *LONOMIA*

A manifestação sistêmica mais marcante do envenenamento por *L. achelous* e *L. obliqua* é a hemorragia, decorrente de alteração na coagulação sangüínea, que leva a um estado de incoagulabilidade que pode perdurar até um mês se não for tratado (ARROCHA-PIÑANGO *et al.*, 1988; KELEN *et al.*, 1995; ver abaixo). Conforme resumido na Tab. 1 e na Fig. 3, os venenos destas espécies contêm vários componentes capazes de atuar em diversos pontos da cascata de coagulação.

A fonte do material usado nos estudos toxinológicos de *Lonomia* varia, podendo ser a secreção coletada de cerdas cortadas (ARROCHA-PIÑANGO *et al.*, 1973; ARROCHA-PIÑANGO, PERALES & GORZULA, 1977; ARROCHA-PIÑANGO & PEPPER, 1981), extrato de cerdas (KELEN *et al.*, 1995; DIAS DA SILVA *et al.*, 1996; DONATO *et al.*, 1998; REIS *et al.*, 2001a,b; ROCHA-CAMPOS *et al.*, 2001), 'saliva' (ARROCHA-PIÑANGO,

PERALES & CARVAJAL., 1981; AMARANT, 1991), hemolinfa (AROCHA-PIÑANGO *et al.*, 1973;

Tabela 1 - As principais proteínas identificadas em extratos de cerdas e hemolinfa de espécies de *Lonomia*

Espécies	Nome da proteína	Atividade
<i>Lonomia achelous</i>	Lonomina II (achelases I e II)	Atividade tipo plasmina
	Lonomina III	Ativador direto da protrombina
	Lonomina IV	Atividade tipo fator Xa
	Lonomina V	Atividade tipo uroquinase e fator XIII
	Lonomina VI:a	Ativador do fator V
	Lonomina VI:i	Inibidor do fator V
	Lonomina VII	Atividade tipo calicreína
<i>Lonomia obliqua</i>	LOPAP	Ativador da protrombina
	-	Ativador do fator X
	Lonomiatoxina	Fosfolipásica

Fonte: AROCHA-PIÑANGO, MARVAL, GUERRERO (2000)

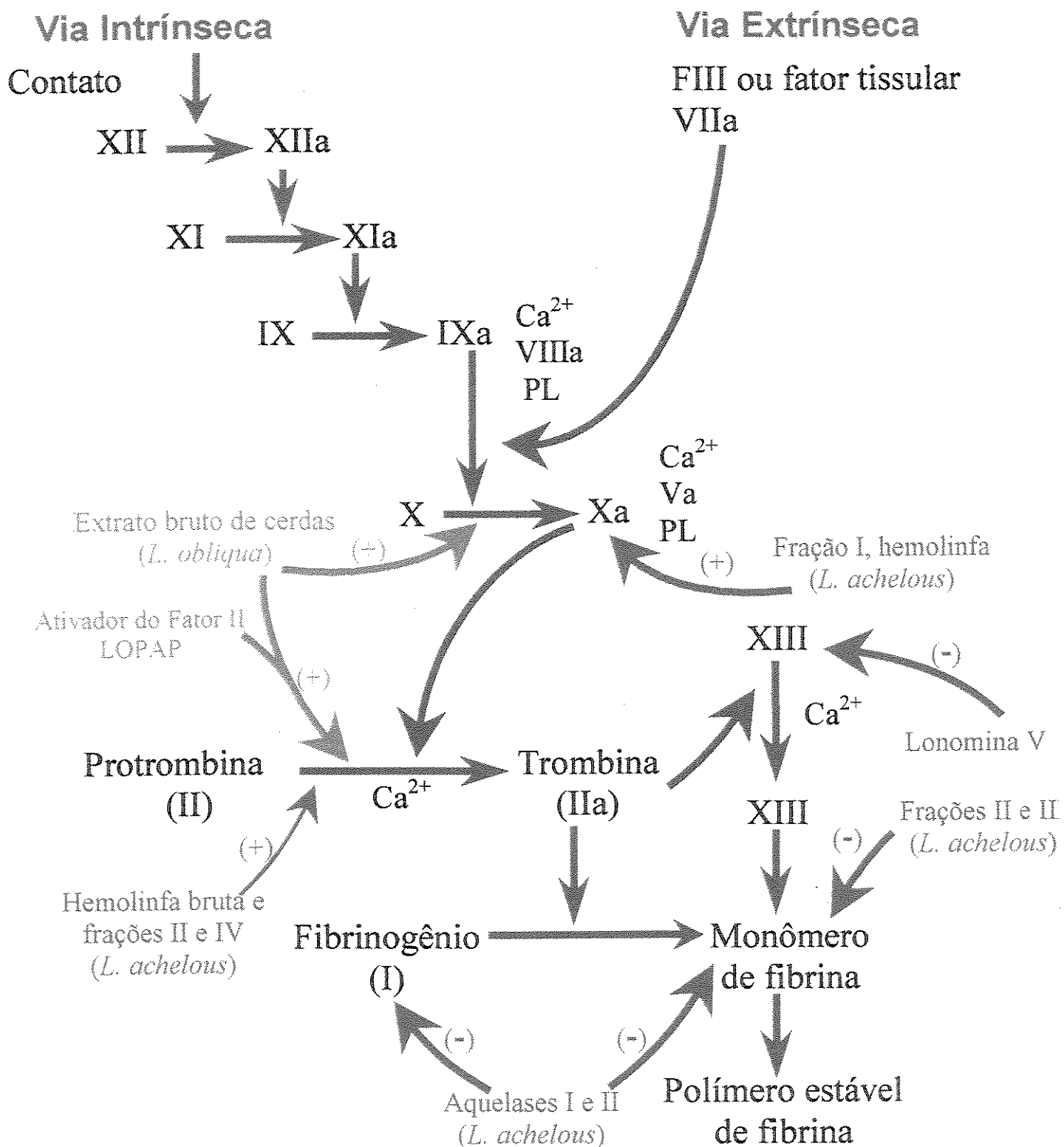


FIGURA 3 – Cascata de coagulação sanguínea e ação de componentes presentes nos venenos de *L. obliqua* (verde) e *L. achelous* (azul).
 (+): ativação, (-): degradação
 Fonte: MARQUES, 1999

CARVAJAL & AROCHA-PIÑANGO 1991; GUERRERO *et al.*, 1997), ou um homogenato do animal inteiro (ARROCHA-PIÑANGO *et al.*, 1977; COLL-SANGRONA & AROCHA-PIÑANGO, 1998). De modo geral, o extrato de cerdas tem sido empregado nos estudos do veneno de *L. obliqua* enquanto que as outras fontes têm sido usadas para obtenção do veneno de *L. achelous*.

No caso da *L. achelous*, a atividade coagulante do veneno é devido em boa parte à ativação do fator X (ARROCHA-PIÑANGO & PEPPER, 1981) e da protrombina (GUERRERO & AROCHA-PIÑANGO, 1992), enquanto a sua atividade anticoagulante deve-se à degradação do fator XIII (GUERRERO *et al.*, 1997), à hidrólise generalizada do fibrinogênio (ARROCHA-PIÑANGO *et al.*, 1981) e a uma potente atividade fibrinolítica (ARROCHA-PIÑANGO, 1967; AROCHA-PIÑANGO *et al.*, 1973; AROCHA-PIÑANGO & PEPPER, 1981; CARVAJAL & AROCHA-PIÑANGO, 1991). Duas isoformas (Achelase I e II) da enzima responsável por esta última atividade já foram purificadas, sequenciadas e caracterizadas (AMARANT *et al.*, 1991). Estas duas proteínas, com massa molecular em torno de 24 kDa, degradam fibrina, produzindo fragmentos de peptídeos muito semelhantes aos produzidos pela ação da tripsina.

Estudos bioquímicos do veneno de *L. obliqua* demonstraram que o extrato de cerdas desta espécie não possui atividade do tipo trombina (DONATO *et al.*, 1998), também ausente em *L. achelous* (ARROCHA-PIÑANGO *et al.*, 1973), mas é capaz de ativar a cascata de coagulação atuando no fator X na protrombina, sendo esta última atividade dependente de cálcio (DONATO *et al.*, 1998). Estas duas ações poderiam contribuir na indução dos distúrbios de coagulação. A proteína ativadora da protrombina, denominada

LOPAP ("*Lonomia obliqua* prothrombin activator protease"), já foi isolada e caracterizada bioquímica e fisiologicamente (REIS *et al.*, 2001a,b). Esta enzima é uma serino protease de 69 kDa (cadeia única), cuja atividade enzimática é potencializada pelo cálcio e inibida por EDTA e PMSF. A determinação da seqüência parcial dos aminoácidos do terminal N mostra que há pouca identidade com outros ativadores da protrombina (REIS *et al.*, 2001a). Quando testada *in vivo*, a LOPAP leva à formação de trombos, hemorragia microvascular e pulmonar, sangue incoagulável e uma infiltração leucocitária pulmonar em ratos (REIS *et al.*, 2001b).

1.4. ACIDENTES

1.4.1. Manifestações clínicas do envenenamento

O hábito das lagartas de se reunirem em colônias nos troncos das árvores próximos ao solo durante o dia facilita o contato com humanos, principalmente nos meses mais quentes do ano (novembro a maio no Sul e Sudeste do Brasil). De modo geral, as manifestações clínicas do envenenamento por *L. obliqua* são semelhantes às observadas no envenenamento por *L. achelous*, porém a frequência de acidentes causados por *L. obliqua* é muito superior a dos causados por *L. achelous*.

Dependendo da gravidade do acidente, o contato com lagartas de *Lonomia* causa, de imediato, dor, sensação de queimação e edema no local do acidente, podendo ser acompanhados por cefaléia e febre (BRASIL, 1998; FAN, 2002). Entre 2 e 72 horas após o contato, verifica-se o aparecimento de distúrbios de coagulação, hematomas, equimoses, sangramento pelas mucosas (DUARTE *et al.*, 1997) e nos casos mais graves

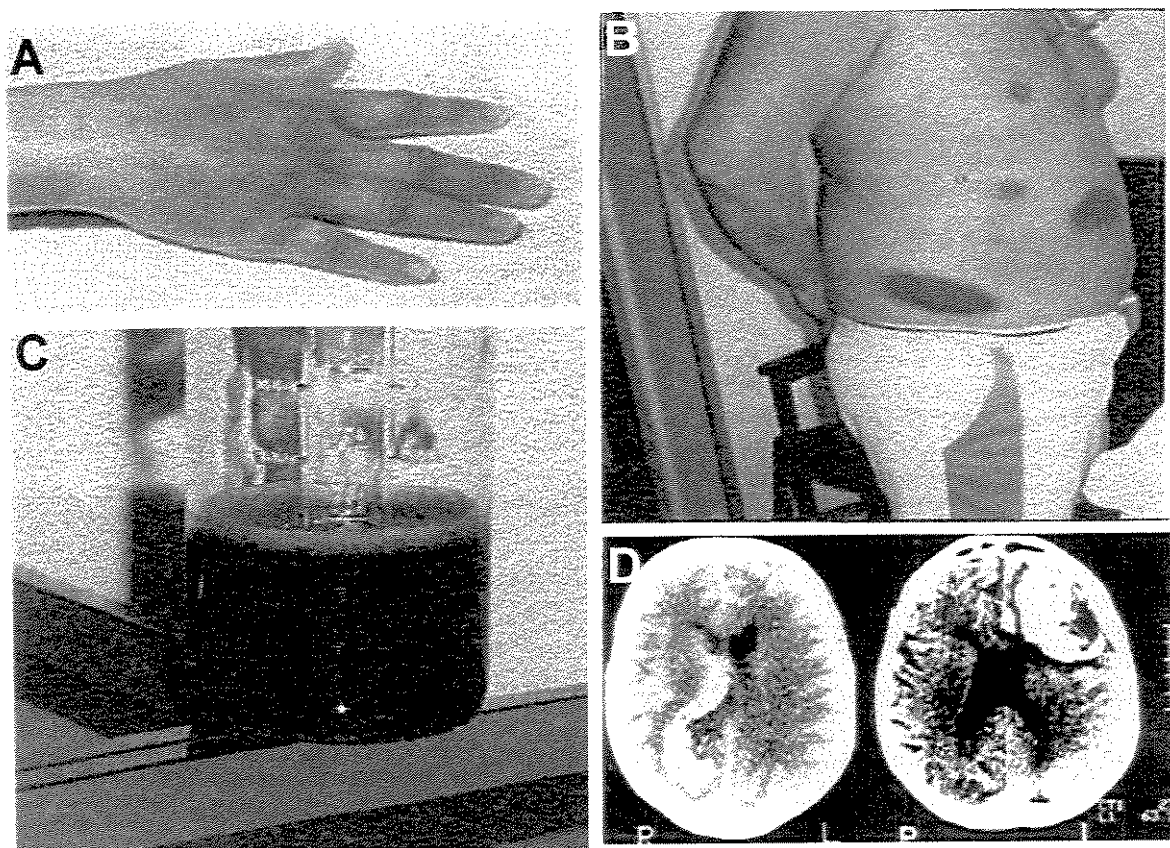


Figura : A- edema, B- equimoses espontâneas, C- hematúria e D- hemorragia intracraniana após o contato acidental com lagartas *L. obliqua*.

hemorragias em regiões como, rim e cérebro (Fig. 4). Essas manifestações podem permanecer por vários dias quando não forem tratadas adequadamente. Nos indivíduos que evoluíram para óbito foi observado hemorragia cerebral difusa e a presença de sangue nas cavidades peritoneal e renal (ARROCHA-PIÑANGO *et al.*, 1988; 1992; DUARTE *et al.*, 1996); A insuficiência renal como causa associada à morte parece ser mais comum em envenenamentos por *L. obliqua* (DUARTE *et al.*, 1990). A similaridade no quadro clínico causado pelo acidente com ambas as espécies, poderá estar de acordo com a estreita relação taxonômica entre elas (LEMAIRE, 1972a,b).

Quanto aos parâmetros de coagulação, os pacientes acidentados por *L. achelous* geralmente mostram um número normal de plaquetas, baixos níveis de fibrinogênio e tempos muito prolongados de protrombina (TP) e de tromboplastina parcial (TTP) (ARROCHA-PIÑANGO *et al.*, 1988, 1992; FAN, 2002). No caso de acidentes por *L. obliqua*, muito comuns em torno das cidades de Chapecó, SC, e Passo Fundo, RS, tem sido descrito alteração na coagulação entre 1 e 48 horas após o acidente resultando, em diminuição drástica de fibrinogênio, fator V, fator X, plasminogênio, α_2 -antiplasmina e da atividade da proteína C, o inibidor natural da coagulação (BRASIL, 1998; FAN, 2002). Observa-se também, presença de complexos trombina-antitrombina, de produtos de degradação de fibrinogênio/fibrina e a formação de D-dímeros de fibrina (KELEN *et al.*, 1996).

De acordo com o Ministério da Saúde (1998) o acidente Ionômico no Brasil é classificado de acordo com a gravidade do evento, conforme indicado a seguir :

Grau 0 (leve): pacientes com envenenamento local e sem alteração da coagulação ou sangramento até 24 horas após o acidente confirmado. Não recebem o soro anti-lonômico.

Grau I (moderado): pacientes com alteração da coagulação e/ou manifestações hemorrágicas em pele e/ou mucosas. Recebem o soro anti-lonômico (dose recomendada: 5 ampolas de 10 ml cada).

Grau II (grave): pacientes com alteração da coagulação e/ou manifestações hemorrágicas em vísceras. Recebem soro anti-lonômico (dose recomendada: 10 ampolas).

1.4.2. Tratamento

Atualmente, o único tratamento com eficácia comprovada para o envenenamento por *L. obliqua* é a terapia com soro anti-lonômico do Instituto Butantan (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1998; FAN, 2002). Este anti-soro é produzido por meio da imunização de cavalos com o extrato de cerdas das lagartas (DIAS DA SILVA *et al.*, 1996; ROCHA-CAMPOS *et al.*, 2001) e tem se mostrado eficaz na reversão da coagulopatia tanto em animais experimentais (DIAS DA SILVA *et al.*, 1996; ROCHA-CAMPOS *et al.*, 2001) como em pacientes envenenados (FAN, 2002). Baseado principalmente em relatos do grupo da Dra. Arocha-Piñango na Venezuela, tem-se recomendado também o uso do antifibrinolítico ácido épsilon-amino-capróico (EACA) no tratamento destes acidentes (BRASIL, 1998). Porém, um ensaio clínico mais recente (FAN, 2002) mostrou claramente que o EACA sozinho ou em conjunto com o anti-soro não oferece nenhuma vantagem sobre o uso isolado do anti-soro. A quantidade de anti-soro a ser administrada é

determinada pela gravidade do acidente (ver classificação acima) e tem sido recomendada para os casos classificados como moderados e graves (BRASIL, 1998; FAN, 2002).

1.5. BASE DO PRESENTE ESTUDO

Em trabalho anterior, demonstrou-se mediante técnicas imunoquímicas (ELISA, imunodifusão, imunoeletroforese e “immunoblot”) que o anti-soro eqüino contra o extrato de cerdas era bastante específico, reagindo apenas com amostras (extrato de cerdas e hemolinfa) de outras espécies de saturnídeos (*L. achelous* e *Automeris rectilinea*) (Fig. 5A) e não com venenos de serpente, escorpião ou aranha (MARQUES, 1999; MARQUES, PANUNTO, HYSLOP, 2002; MARQUES *et al.*, 2002). Notou-se também que a imunoreatividade do anti-soro com o extrato de cerdas e com a hemolinfa de *L. obliqua* era muito parecida (Fig. 5B), sugerindo que estas duas amostras poderiam conter ou compartilhar proteínas (antígenos) comuns. Esta reatividade semelhante poderia significar contaminação do veneno contido no extrato de cerdas e hemolinfa presente nas cerdas, ou poderia indicar que o veneno é parte integral da hemolinfa.

Tendo em vista o alto grau de imunorreatividade cruzada do anti-soro eqüino com o extrato de cerdas e hemolinfa, há a hipótese de que os anti-soros específicos contra o extrato de cerdas e contra a hemolinfa poderiam ajudar a desvendar a origem da imunorreatividade cruzada observada. Além disso, caso o anti-soro anti-hemolinfa se mostrasse tão imunorreativo quanto o do extrato de cerdas, a hemolinfa poderia se tornar uma fonte de antígenos para protocolos de imunização na produção de soro anti-lonômico em larga escala.

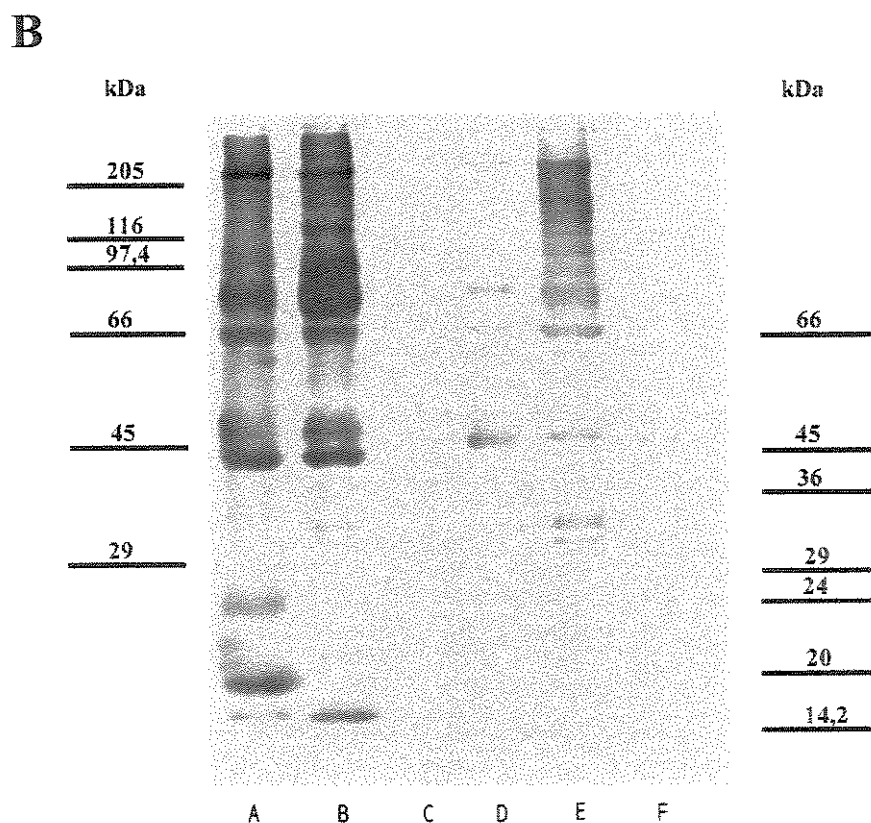
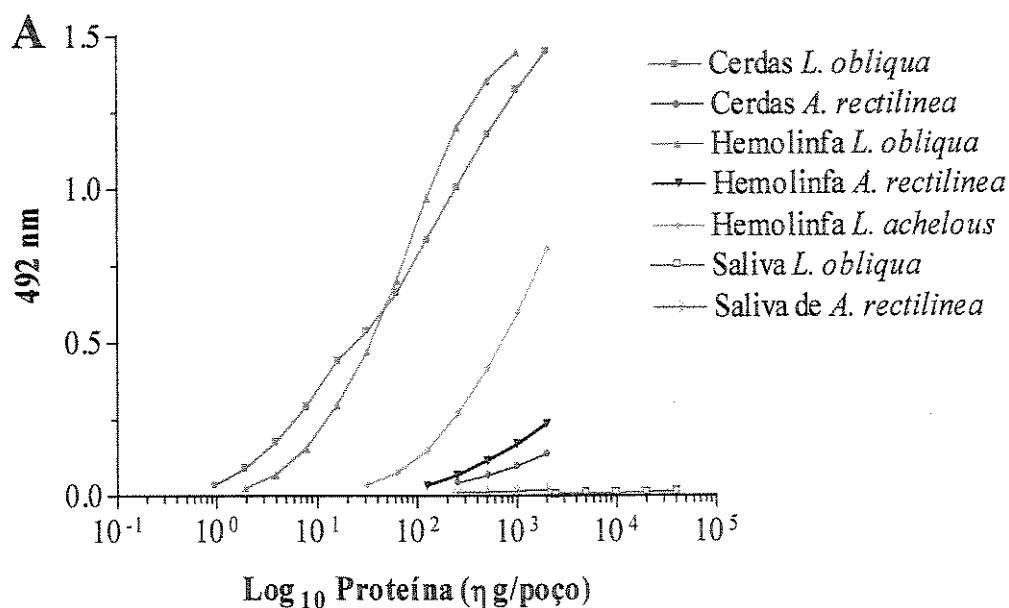


Figura 5: A- Reatividade cruzada do soro anti-ironomia com diferentes venenos. B- Immunoblot de extrato de cerdas de *L. obliqua* (A), hemolinf de *L. obliqua* (B), saliva de *L. obliqua* (C), extrato de cerdas de *A. rectilinea* (D), hemolinf de *A. rectilinea* (E) e saliva de *A. rectilinea* (F). Em todos os casos foram aplicados 17,25 µg de amostra

Fonte: MARQUES, 1999

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Com base nas observações anteriores, propõe-se, no presente estudo:

- 1) Produzir, em coelhos, anti-soros contra o extrato de cerdas e a hemolinfa da lagarta *Lonomia obliqua*.
- 2) Comparar a imunorreatividade dos anti-soros produzidos em coelhos e do anti-soro eqüino do Instituto Butantan, com o extrato de cerdas e a hemolinfa.
- 3) Avaliar a capacidade neutralizante destes anti-soros *in vitro* comparando-os com o anti-soro eqüino do Instituto Butantan.

3. RESULTADOS

3.1. ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO (TOXICON)

AN IMMUNOCHEMICAL COMPARISON OF ANTISERA RAISED IN RABBITS AGAINST A SPICULE EXTRACT AND HEMOLYMPH FROM CATERPILLARS OF THE SATURNID MOTH *LONOMIA OBLIQUA*

Patricia C. Panunto and Stephen Hyslop*

Departamento de Farmacologia, Faculdade de Ciências Médicas,
Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), CP 6111,
13083-970, Campinas, SP, Brasil

Running title: Antisera to *L. obliqua* spicules and hemolymph

*Author for correspondence at above address: Tel. 55-19-3788-7185. Fax: 55-19-3289-2968. E-mail: hyslop@fcm.unicamp.br

Abstract

Caterpillars of saturnid moths belonging to the genus *Lonomia* can cause severe and sometimes fatal envenoming, the main symptoms of which are coagulation disturbances, hemorrhaging, renal failure and intracranial hemorrhaging. The administration of antiserum raised against a spicule extract from *Lonomia obliqua* is the only effective treatment for systemic envenomations. In this work, we raised antisera in rabbits against a spicule extract and hemolymph and examined their cross-reactivity by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), immunoblotting and immunoelectrophoresis. In ELISA, the rabbit antisera and the commercial antiserum showed similar dilution curves and cross-reactivities with the spicule extract and hemolymph. Considerable similarity was also seen in the immunoblot patterns with all three antisera. The immunoelectrophoretic profiles were also alike. Fractionation of the spicule extract and hemolymph by gel filtration yielded qualitatively similar elution profiles which cross-reacted extensively with the three antisera. All antisera neutralized the coagulant activity of the spicule extract in human citrated plasma. These results indicate that *L. obliqua* spicule extracts and hemolymph share many antigens and that antisera raised in rabbits and horses show similar cross-reactivities with these biological samples.

1. Introduction

Moths of the genus *Lonomia* (family Saturniidae) are widely distributed in South America (Lemaire, 1972a,b), and the caterpillars of some species in this genus, notably *Lonomia achelous* in Venezuela, French Guyana and northern Brazil, and *Lonomia obliqua* in southeastern and southern Brazil, are capable of producing severe and sometimes fatal envenoming in humans (Fraíha Neto et al., 1986; Kelen et al., 1995; Hommel et al., 1995; Arocha-Piñango et al., 2000). The main symptoms associated with envenoming are coagulopathy and hemorrhaging. Death may result from renal failure or intracranial hemorrhaging (Arocha-Piñango et al., 1988; Duarte et al., 1990, 1996; Burdman et al., 1996). Currently, the only effective treatment for such envenomations is the administration of commercial equine antiserum produced by the Instituto Butantan in São Paulo, Brazil (Dias da Silva et al., 1996; Rocha-Campos, 2001).

The commercial antiserum, which is raised against a spicule extract of *L. obliqua* from southern Brazil, shows no cross-reactivity with non-lepidopteran (snake, scorpion, spider) venoms, but is reactive towards spicule extracts and hemolymph of related lepidopteran species such as *L. achelous* and the more distant *Automeris rectilinea* (L.A.M. Marques, Masters dissertation, State University of Campinas, Campinas, 1999; Marques and Hyslop, submitted). Of particular interest is the strong reactivity of this antiserum with both spicule extracts and hemolymph in enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA), immunoblotting and immunoelectrophoresis. This cross-reactivity suggests that the spicule extract and hemolymph may share some antigens. To examine this possibility further, we have now produced antisera to a spicule extract and to hemolymph separately in rabbits and have examined their cross-reactivity and that of the commercial antiserum using a variety of immunological approaches.

2. Materials and methods

2.1 Reagents

Acrylamide, agarose, amido black, ammonium persulfate, bovine serum albumin, bromophenol blue, casein, 4-chloro-1-naphthol, Coomassie brilliant blue R250, glycerol, horseradish peroxidase, N,N-methylene-bis-acrylamide, molecular weight standards for gel electrophoresis, nitrocellulose membrane (0.45 μ m), Ponceau red, O-phenylenediamine, rabbit anti-horse IgG-horseradish peroxidase conjugate, sodium dodecyl sulphate (SDS), N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED), and Tween 20 were from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Glycine, rainbow molecular weight markers for electrophoresis, Superdex 75 and Tris were from Amersham Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ, USA). Ninety-six-well plates (high binding capacity) were from Corning (Corning, NY, USA). Equine antiserum raised against a spicule extract of *L. obliqua* caterpillars (Dias da Silva et al., 1996; Rocha-Campos et al., 2001) was from the Instituto Butantan (São Paulo, SP, Brazil). All other reagents were of the highest grade available.

2.2 Animals

Male New Zealand white rabbits (2.0-2.5 kg at the start of the experiment) obtained from Granja Criex (Mogi das Cruzes, SP, Brazil) were housed individually with access to standard chow (Purina[®], Campinas, SP, Brazil) and water *ad libitum*.

L. obliqua caterpillars were collected around the city of Passo Fundo, state of Rio Grande do Sul, Brazil, and were shipped to the laboratory where they were maintained on a diet of guava (*Psidium guayava*) leaves.

2.3 Collection of hemolymph and preparation of spicule extract

Hemolymph was collected by turning the caterpillars on their back and puncturing the ventral surface with a fine needle while holding the animals in position with a pair of forceps. The fluid which exuded was collected using a micropipet or Pasteur pipet, care being taken to avoid contamination with tissue from internal organs, as well as contamination of the spicules. Thereafter, the caterpillars were rapidly frozen in liquid nitrogen and the spicules harvested by cutting at their base. Spicule proteins were extracted by grinding the spicules with a mortar and pestle in 0.1 M Tris-HCl, pH 7.8. Following centrifugation (2500 g, 30 min, 4°C), the resulting supernatant was aliquoted and stored at -20°C until used (Donato et al., 1998). Protein concentrations were determined by the method of Lowry et al. (1951), using bovine serum albumin as standard.

2.4 Immunization protocol

Antisera were raised against the spicule extract and hemolymph by inoculating rabbits with 500 µg of protein previously diluted in 0.5 ml of sterile saline and emulsified with 0.5 ml of Freund's complete adjuvant. The mixture was injected intramuscularly into the hind legs of two rabbits for each preparation. After 15 days, the rabbits received a series of four weekly booster injections of 500 µg of protein in mineral oil (Nujol[®]). Ten days after the last injection, the rabbits were bled and the blood was allowed to clot at room temperature before centrifugation. The resulting sera were collected and stored at -20°C until used. The antisera titers were monitored by ELISA during the immunization protocol.

2.5 Immunoelectrophoresis

Samples of spicule extract and hemolymph were run in 1% agarose gels in 0.1 M Tris-HCl, pH 8.0, at room temperature and a fixed voltage (120 V) for 90 min (Clausen, 1988). After electrophoresis, commercial antivenom (Instituto Butantan) or rabbit antiserum to spicule extract or hemolymph was added to a trough made in the agarose and the slides then incubated in a humidified chamber for 48 h. At the end of this period, the slides were washed in 0.15 M NaCl for 12 h, followed by drying at 37°C for 36 h and staining with 0.4% amido black in 10% acetic acid for 10 min. After destaining in 5% acetic acid, the slides were dried and photographed.

2.6 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Microtiter plates were coated overnight at 4°C with a fixed amount of spicule extract or hemolymph (5 µg/well in 100 µl of carbonate buffer, pH 9.6). After blocking with phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4, containing 2% casein, the wells were washed with 0.15 M NaCl containing 0.5% Tween 20 and then varying dilutions of the desired antiserum prepared in PBS containing 0.25% casein and 0.05% Tween 20 were added for 1 h at room temperature. The plates were subsequently washed and incubated with a rabbit anti-horse or goat anti-rabbit IgG-peroxidase conjugate (diluted 1:1000 in PBS/casein/Tween-20) for 1 h at room temperature. Following a further series of washes with saline-Tween solution, o-phenylenediamine (0.2 mg/ml in 0.02 M citrate buffer, pH 5.0, containing 0.04% H₂O₂) was added. The reaction was stopped after 30 min by adding 50 µl of 5% H₂SO₄ and the absorbance was read at 492 nm using a SpectraMax 340 multiwell plate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

In some experiments, the wells were coated with a fixed concentration of the desired antiserum (1:1000 in 100 µl of carbonate buffer) and then exposed to varying amounts of spicule

extract or hemolymph (2–5000 ng/well in 100 μ l, diluted in PBS/casein/Tween 20) for 1 h. After washing, the wells were incubated again (1 h) with the same antiserum (1:1000) used to coat the wells, then washed again before the addition of the appropriate anti-IgG-peroxidase conjugate mentioned above. The plates were subsequently developed and read as already described.

2.7 Electrophoresis (SDS-PAGE) and western blotting

SDS-PAGE was done in polyacrylamide gels (3% stacking gel and 10% separating gel) (Laemmli, 1970) using a Mighty Small II apparatus (Bio-Rad, San Francisco, CA, EUA). Samples were diluted in 0.125 M Tris-HCl, pH 6.8, containing 2% SDS, 10% glycerol and 0.03% bromophenol blue and boiled for 5 min before loading onto the gels which were run at a fixed voltage (100 V) at room temperature. After electrophoresis, the proteins were visualized by silver staining (Garfin, 1990).

In some experiments, after electrophoresis, proteins were transferred from the polyacrylamide gels to nitrocellulose membranes at a fixed voltage (100 V) using a Mighty Small TE 22 transfer cell (Hoefer Scientific). Subsequently, the membranes were stained with 0.2% Ponceau red in 0.3% (w/v) TCA to visualize the protein bands and check the efficiency of transfer. Thereafter, the membranes were blocked with a solution of 5% skimmed milk containing 0.05% (v/v) Tween 20 for 2 h with shaking at room temperature. After washing six times (10 min each) with 10 mM Tris–170 mM NaCl buffer, pH 7.6, containing 0.02% (v/v) Tween 20 (TBS buffer), the membranes were incubated with the desired *L. obliqua* antiserum (commercial, anti-spicule extract or anti-hemolymph, diluted 1:1000 in TBS) for 12 h with shaking at room temperature. Following a further six washes with TBS, the membranes were incubated with a rabbit anti-horse IgG-horseradish peroxidase conjugate to detect commercial equine *L. obliqua* antiserum, or a goat

anti-rabbit IgG-horseradish peroxidase conjugate to detect rabbit antisera (all diluted 1:1000 in TBS) for 2 h with shaking at room temperature. After a final series of washes, the immunoreactive bands were visualized using 4-chloro-1-naphthol (500 μ l of a 3% solution in ethanol mixed with 50 ml of 50 mM Tris-HCl, pH 7.6, containing 3% H₂O₂ (Towbin et al., 1979). The reaction was stopped by washing the membrane after incubation for 20 min at room temperature with shaking.

2.8 Gel filtration chromatography

Spicule extract and hemolymph were applied to a column (1.6 cm x 60 cm) of Superdex 75 equilibrated with 0.1 M Tris-HCl, pH 7.8. The proteins were eluted with the same buffer at a flow rate of 30 ml/h at 20°C and 2 ml fractions were collected using an ÄKTAprime chromatography system (Amersham Pharmacia Biotech). The elution profile was monitored at 280 nm and the immunoreactivity of the eluted fractions was examined by ELISA as described above.

2.9 Neutralization of biological activities

The ability of the different antisera to neutralize the coagulant activity of the spicule extract was examined using citrated plasma. Blood from healthy volunteers who had not been on medication for the previous 10 days was collected into 3.8% sodium citrate (blood:citrate ratio, 9:1; final citrate concentration, 0.38%) by venipuncture and platelet-poor plasma was obtained by centrifugation. The coagulant activity of the spicule extract was assayed by adding 100 μ l of extract (up to 100 μ g of protein) to 200 μ l of citrated plasma at 37°C in 96-well plates. Clotting was monitored as the increase in turbidity at 525 nm in a SpectraMax 340 microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Plasma clotting following the addition of Ca²⁺ (final

concentration, 8 mM) was used as a positive control. The neutralizing activity of the antisera was tested by incubating a fixed volume (75 μ l) of antiserum with spicule extract (ratio of 3:1) for 30 min at 37°C and then adding this mixture to plasma. Clot formation was monitored as described above.

3. Results

Figure 1 shows the ELISA dilution curves for rabbit antisera raised against *L. obliqua* spicule extract and hemolymph compared to commercial equine antiserum (Instituto Butantan) also raised against a spicule extract. Each antiserum reacted equally with the spicule extract and hemolymph proteins (wells were coated with 5 μ g of antigen). In addition, the shape of the dilution curves for the three antisera was very similar, with the linear portion of curves starting at a dilution of 1:1000. The end-point dilution in the ELISA, i.e. the dilution immediately preceding the background (basal) absorbance plus two standard deviations, was the same for all antisera (1:50,000). Similar reactivities were also observed when a fixed dilution of each antiserum was tested against varying amounts of spicule extract and hemolymph proteins (Figure 2).

Electrophoresis of spicule extract and hemolymph in 10% gels containing SDS revealed a variety of bands with molecular masses ranging from 14 kDa to >100 kDa (Fig. 3). Subsequent transfer of the proteins to nitrocellulose membranes followed by incubation with the different antisera showed that the three antisera produced similar patterns of immunoreactivity (Fig. 4). In immunoelectrophoresis, the antisera to spicule extract and hemolymph each showed one or two prominent precipitin bands with spicule extract and hemolymph proteins whereas commercial antiserum produced several bands with both groups of antigens (Fig. 5).

Gel filtration of the spicule extract and hemolymph yielded elution profiles that were qualitatively similar, but quantitatively different. The initial peak in the spicule extract was broader than in hemolymph and the large peak at the end of the elution (around fraction 50) was greatly reduced in hemolymph (Fig. 6, first panel in each column). Figure 6 also shows that the pattern of immunoreactivity of the three antisera with the fractionated spicule extract was very similar, with each having a large initial peak (corresponding to high molecular mass components) and two smaller peaks; there was no reactivity with the large peak at the end of the elution. When the antisera were tested against hemolymph, all produced two major peaks of reactivity (fractions 15-30 and 31-55). As with the spicule extract, the greatest reactivity was observed with the high molecular mass components of the hemolymph.

When tested in human citrated plasma, only the spicule extract produced coagulation which was independent of exogenous Ca^{2+} ; preincubation of the spicule extract with each of the antisera for 30 min at 37°C resulted in neutralization of the coagulant activity (Fig. 7).

4. Discussion

Envenomation by *L. obliqua* caterpillars can lead to a hemorrhagic syndrome (Kelen et al., 1995), the only current effective treatment of which is serumtherapy with an equine antiserum raised against a spicule extract from these caterpillars (Dias da Silva et al., 1996; Rocha-Campos et al., 2001). We have already observed that this antiserum shows similar reactivity with spicule extracts and hemolymph in an enzyme-linked immunosorbent assay (L.A.M. Marques, Masters dissertation, State University of Campinas, Campinas, 1999) and in immunoelectrophoresis and immunoblotting (Marques and Hyslop, submitted). These findings suggested that the spicule extract and hemolymph share common antigens and that antisera to each of these preparations

would probably show considerable cross-reactivity. As clearly demonstrated here, this was indeed the case, with each of the three antisera (two rabbit and one equine) tested showing virtually identical reactivity with spicule extracts and hemolymph in ELISA and immunoblotting. In addition, the responses obtained with the antisera were so similar as to make it practically impossible to distinguish among them.

A possible exception to this similarity could be the immunoelectrophoretic results for which commercial antiserum gave considerably more precipitin lines than the rabbit antisera. However, this discrepancy can be explained by the fact that the commercial serum is a semi-purified preparation (and concentrated) of $F(ab')_2$ fragments obtained by ammonium sulfate precipitation and partial pepsin digestion (Rocha-Campos et al., 2001) whereas the rabbit antisera were used crude without any prior purification or concentration. In addition, the fact that more sensitive tests than immunoelectrophoresis, such as ELISA and immunoblotting, produced cross-reactivity profiles for the rabbit antisera which were similar to those the commercial antiserum further confirms that the discrepancy in immunoelectrophoresis most likely reflected differences in antibody concentration.

The greater immunoreactivity of the three antisera associated with the initial fractions of the elution profiles of the spicule extract and hemolymph agrees with the generally greater immunogenicity of high molecular mass components (proteins) compared to small molecular mass peptides. As shown in Fig. 6, each of the antisera gave a similar profile when tested against spicule extract or hemolymph. The reactivity profiles for spicule extract in particular suggest that some proteins present in low concentrations may be quite immunogenic, e.g. proteins eluting around fraction 35 which consistently produced one of the three main peaks of immunoreactivity.

Commercial equine antiserum effectively protects against the coagulopathy caused by spicule extract in mice (Rocha-Campos et al., 2001). Although we have not done detailed biochemical and physiological tests on the ability of the rabbit antisera to neutralize the biological activity (procoagulant action) of *L. obliqua* spicule extracts (Donato et al., 1998; Reis et al., 2001a,b), the observation that both of these antisera neutralized the coagulant activity of the spicule extract in citrated plasma to a similar extent as the commercial antiserum indicated that they recognize the proteins responsible for this effect, as does commercial antiserum. These findings suggest that hemolymph could provide a useful source of antigens for immunization protocols in commercial antiserum production, with the added advantage of the higher protein concentration that this fluid frequently contains compared to manually prepared spicule extracts. This application would merit further investigation.

The present results may also have some bearing on the source of venom production. Although the general morphology of *L. obliqua* (Lorini and Corseuil, 2001) and the structure and organization of the spicules (Veiga et al., 2001) have been described, there is still no conclusive evidence as to the site of venom biosynthesis. However, venom production by epithelial cells lining the lumen of the spicules (rather than by a specific venom gland) is a possibility, with the subsequent release of venom proteins into the hemolymph filling the spicule lumen. In this case, during envenomation, both venom proteins and hemolymph proteins would be inoculated into the victim via the spicules through simple hydrostatic pressure of the caterpillar's body (L.A.M. Marques, Masters dissertation, State University of Campinas, Campinas, 1999; Veiga et al., 2001). Alternatively, the hemolymph itself could contain toxic components, as in the case of *L. achelous* for which many studies have used hemolymph rather than spicule extracts (Arocha-Piñango et al., 2000). Immunohistochemical analysis of spicule and body sections could perhaps

provide useful information on this matter. Either of these mechanisms could account for the extensive immunological similarity between the spicule extract and hemolymph. Finally, in view of the above considerations, it is probable that most of the proteins detected by electrophoresis and immunoblotting are probably not directly related to the venom or the symptoms of envenomation, i.e. the rabbit and equine antisera are raised primarily against non-venom proteins.

Acknowledgments

The authors thank Drs. Irineu Lorini (Embrapa, Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brazil) and Lizete Lorini (Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brazil) for supplying the caterpillars and José Ilton dos Santos for technical assistance. P.C.P. was supported by a studentship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), Brazil. This work was supported by the Brazilian agency Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp, grant no. 97/2578-5).

References

Arocha-Piñango, C.L., Blumenfeld-Bosh, N., Nouel, A.L., Torres, A., Perales, J., Alonso, M.E., Rodriguez, S., Carvajal, Z., Ojeda, A., Tasayco, M.L., Chitty, W., 1988. Fibrinolytic and procoagulant agents from a Saturnidae moth caterpillar. In: Pirkle, H., Markland, F.S. (eds), Hemostasis and Animal Venoms. Marcel Dekker Inc., New York, pp. 223-240.

Arocha-Piñango, C.L., Marval, E., Guerrero, B., 2000. *Lonomia* genus caterpillar toxins: biochemical aspects. *Biochimie* 82, 937-942.

Burdman, E.A., Antunes, I., Saldanha, L.B., Abdulkadeer, R.S., 1996. Severe acute renal failure induced by the venom of *Lonomia* caterpillars. *Clin. Nephrol.* 45, 337-339.

Clausen, J. Immunochemical Techniques for the Identification and Estimation of Macromolecules. Elsevier Science, New York, 1988.

Dias da Silva, W., Campos, A.C.M.R., Gonçalves, L.R.C., Sousa e Silva, M.C.C., Higashi, H.G., Yamagushi, I.K., Kelen, E.M.A., 1996. Development of an antivenom against toxins of *Lonomia obliqua* caterpillars. *Toxicon* 34, 1045-1049.

Donato, J.L., Moreno, R.A., Hyslop, S., Duarte, A., Antunes, E., Le Bonniec, B.F., Rendu, F., de Nucci, G., 1998. *Lonomia obliqua* caterpillars trigger human blood coagulation via factor X activation. *Thromb. Haemost.* 79, 539-542.

Duarte, A.C., Caovilla, J, Lorini, I., Lorini, D., Mantovani, G., Sumida, J., Manfre, P.C., Silveira, R.C., Moura, S.P., 1990. Insuficiência renal aguda por acidentes com lagartas. *J. Bras. Nefrol.* 12, 184-187.

Duarte, A.C., Crusius, P.S., Pires, C.A.L., Schilling, M.A., Fan, H.W., 1996. Intracerebral haemorrhage after contact with *Lonomia* caterpillars. *Lancet* 348, 1033.

Fraiha Neto, H.I., Ballarini, A.J., Leão, R.N.Q., Costa Júnior, D., Dias, L.B., 1986. Síndrome hemorrágica por contato com larvas de mariposa (Lepidoptera, Saturniidae). *Man. Inst. Evandro Chagas, Fund. Serv. S. Pública* 2, 811-820.

Garfin, D.E., 1990. One-dimensional gel electrophoresis. *Meth. Enzymol.* 182, 425-441.

Hommel, D., Bouchareine, L., Hulin, A., 1995. Envenimation par une chenille de lépidoptère: *Lonomia achelous*. Revue de la littérature. À propos de deux cas em Guyane Francaise. *Sem. Hop. Paris* 71, 9-12.

Kelen, E.M.A., Picarelli, Z.P., Duarte, A.C., 1995. Hemorrhagic syndrome induced by contact with caterpillars of the genus *Lonomia* (Saturniidae, Hemilucinae). *J. Toxicol. – Toxin Rev.* 14, 283-308.

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

Lemaire, C., 1972a. Descriptions d'Attacidae nouveaux d'Amerique Centrale e du Sud. (Lep.). I. Descriptions preliminaires de 16 espécies nouvelles du genre *Lonomia* Walker. *Bull. Soc. Entomol. France* 76, 197-205.

Lemaire, C., 1972b. Revision du genre *Lonomia* Walker, Lep., Attacidae. *Ann. Soc. Entomol. France* 8, 767-861.

Lorini, L.M., Corseuil, E. 2001. Aspectos morfológicos de *Lonomia obliqua* Walker (Lepidoptera: Saturniidae). *Neotrop. Entomol.* 30, 373-378.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.

Rocha-Campos, A.C.M., Gonçalves, L.R.C., Higashi, H.G., Yamagushi, I.K., Fernandes, I., Oliveira, J.E., Ribela, M.T.C.P., Sousa-e-Silva, M.C.C., Dias da Silva, W., 2001. Specific heterologous F(ab')₂ antibodies revert blood incoagulability resulting from envenoming by *Lonomia obliqua* caterpillars. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 64, 283-289.

Reis, C.V., Farsky, S.H.P., Fernandes, B.L., Santoro, M.L., Oliva, M.L.V., Mariano, M., Chudzinski-Tavassi, A.M. (2001a). In vivo characterization of Lopap, a prothrombin activator serine protease from the *Lonomia obliqua* caterpillar venom. *Thromb. Res.* 102, 437-443.

Reis, C.V., Portaro, F.C.V., Andrade, S.A., Fritzen, M., Fernandes, B.L., Sampaio, C.A.M., Camargo, A.C.M., Chudzinski-Tavassi, A.M., 2001b. A prothrombin activator serine protease from the *Lonomia obliqua* caterpillar venom (Lopap) – Biochemical characterization. *Thromb. Res.* 102, 427-436.

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.

Veiga, A.B.G., Blochtein, B., Guimarães, J.A., 2001. Structures involved in production, secretion and injection of the venom produced by the caterpillar *Lonomia obliqua* (Lepidoptera, Saturniidae). *Toxicon* 39, 1343-1351.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Dilution curves for antisera against a spicule extract and hemolymph from *L. obliqua*. Antisera were raised in rabbits as described in Methods and compared with commercial equine antiserum also raised against a spicule extract. Microtiter plates were coated overnight at 4°C with a fixed amount of spicule extract or hemolymph (5 µg/well in 100 µl of carbonate buffer) and then incubated with the indicated dilutions of each antiserum. After incubation with a secondary peroxidase-conjugated antibody and substrate (O-phenylenediamine), the reaction was stopped with H₂SO₄ and the final absorbance read at 492 nm. The points are the mean of three experiments, each run in duplicate. A, rabbit antiserum to spicule extract; B, rabbit antiserum to hemolymph; C, commercial equine antiserum to spicule extract.

Figure 2. Antigen dilution curves for *L. obliqua* spicule extract and hemolymph using rabbit and commercial antisera. Microtiter plates were coated with a fixed amount of each antiserum (100 µl of a 1:1000 dilution in carbonate buffer) and then incubated with different amounts of spicule extract or hemolymph. After incubation with the same antiserum used to coat the wells, the appropriate secondary peroxidase-conjugated antibody was added with substrate (O-phenylenediamine). The reaction was stopped with H₂SO₄ and the final absorbance read at 492 nm. The points are the mean of three experiments, each run in duplicate. A, spicule extract; B, hemolymph.

Figure 3. Electrophoretic profile of *L. obliqua* spicule extract and hemolymph following SDS-PAGE in a 10% polyacrylamide gel. Fifteen micrograms of spicule extract or hemolymph protein

were applied to a gel prepared and run as described in Methods in the presence of molecular mass markers (M). Protein bands were detected by silver staining. HL, hemolymph; SE, spicule extract.

Figure 4. Immunoblot profile of *L. obliqua* spicule extract and hemolymph following incubation with rabbit or commercial antiserum. Spicule extract and hemolymph (15 µg) were run on SDS-PAGE and the proteins electroblotted onto nitrocellulose membranes. Following incubation with the desired primary antibody, the membranes were incubated with the secondary peroxidase-conjugated antibody and the reaction developed with substrate (4-chloro-1-naphthol). HL, hemolymph; SE, spicule extract.

Figure 5. Immuno-electrophoresis of *L. obliqua* spicule extract and hemolymph against rabbit and commercial antisera. Samples of spicule extract and hemolymph (15 µg/well) were run in 1% agarose gels in 0.1 M Tris-HCl, pH 8.0 at room temperature for 90 min (120 V) and then incubated with the desired antiserum for 48 h in a humidified chamber. After washing in 0.15 M NaCl, the slides were dried and stained with 0.4% amido black in 10% acetic acid then destained in 5% acetic acid. HL, hemolymph; SE, spicule extract.

Figure 6. Elution profiles of *L. obliqua* spicule extract (first panel, left column) and hemolymph (first panel, right column) following gel filtration on Superdex 75 and immunoreactivity of the fractions with rabbit and commercial antisera. Spicule extract and hemolymph (10 mg) were applied to a column (1.6 cm x 60 cm) of Superdex 75 equilibrated with 0.1 M Tris-HCl, pH 7.8. Proteins were eluted at a flow rate of 30 ml/h at 20°C and 2 ml fractions were collected. The elution profile was monitored at 280 nm. The immunoreactivity of the fractions against the

different antisera (second, third and fourth panels in each column) was determined by ELISA (492 nm) as described in Methods. Note that the protein elution profile for the spicule extract and hemolymph is shown only once (first panel in each column).

Figure 7. Coagulant activity of *L. obliqua* spicule extract and its neutralization by antisera. Spicule extract or hemolymph in 100 μ l was added to 200 μ l of human citrated plasma and the clotting response monitored at 37°C and 525 nm in a multiwell plate reader. Note that the subsequent addition of Ca^{2+} (arrow; final concentration, 8 mM) had little effect in the case of spicule extract whereas exogenous Ca^{2+} produced clotting after incubation with hemolymph. To evaluate the neutralizing capacity of the antisera, spicule extract and the desired antiserum (75 μ l) were preincubated (sample:antiserum ratio, 1:3) for 30 min at 37°C and the residual clotting activity then determined as described above. The points represent the mean of three experiments, each run in duplicate using a pool of citrated plasma from three different donors on each occasion. A, coagulant activity of the spicule extract but not hemolymph. Exogenous Ca^{2+} was used as a control. B, neutralization of the coagulant activity of the spicule extract (100 μ g) by antisera. HL, hemolymph; SE, spicule extract.

FIGURE 1

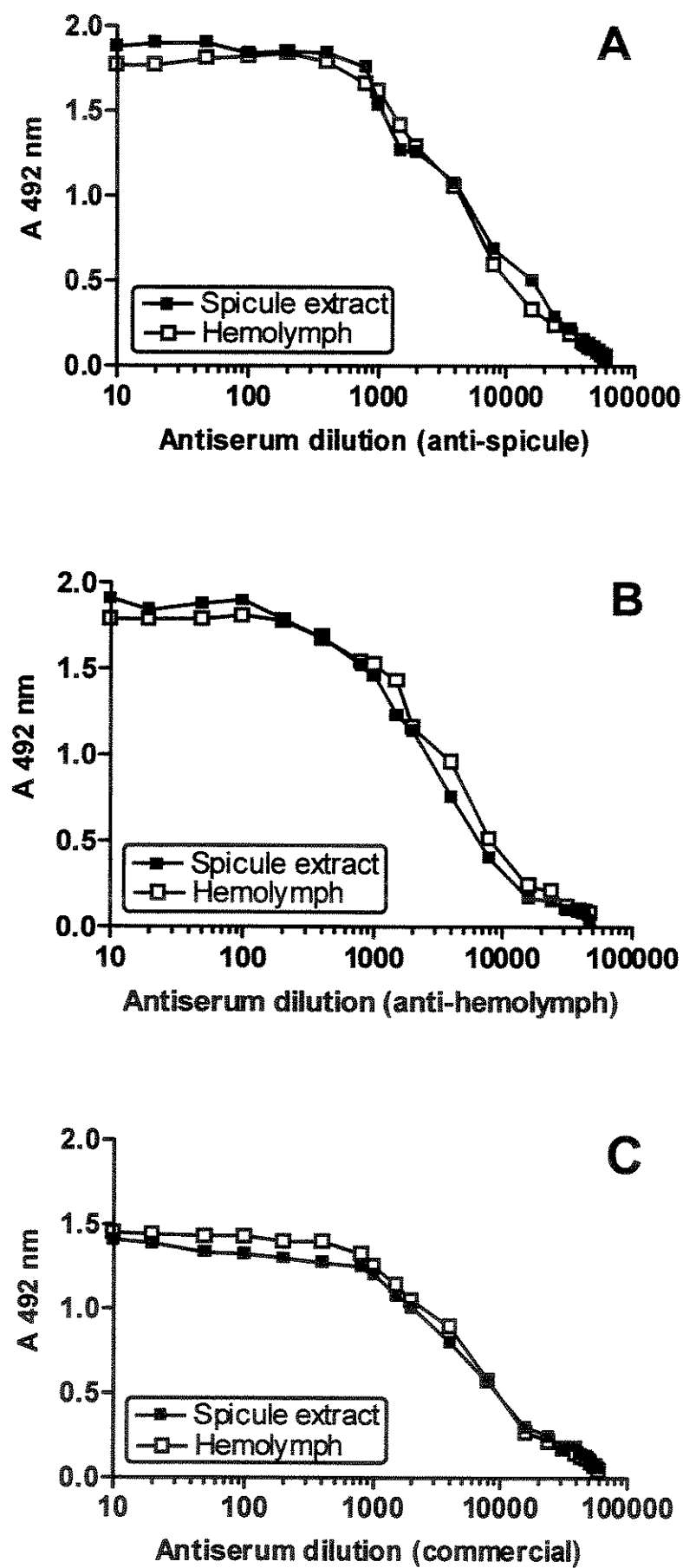


FIGURE 2

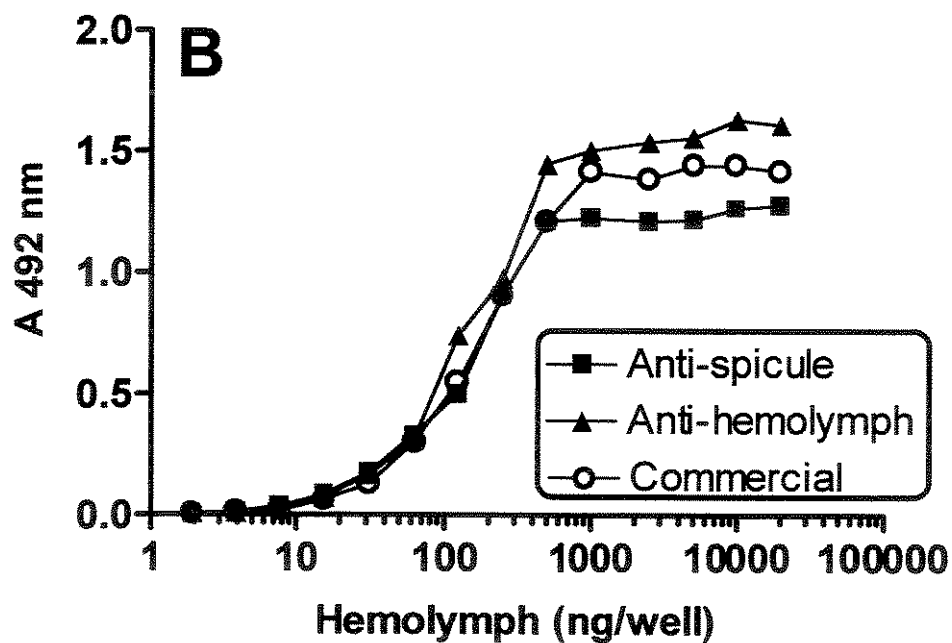
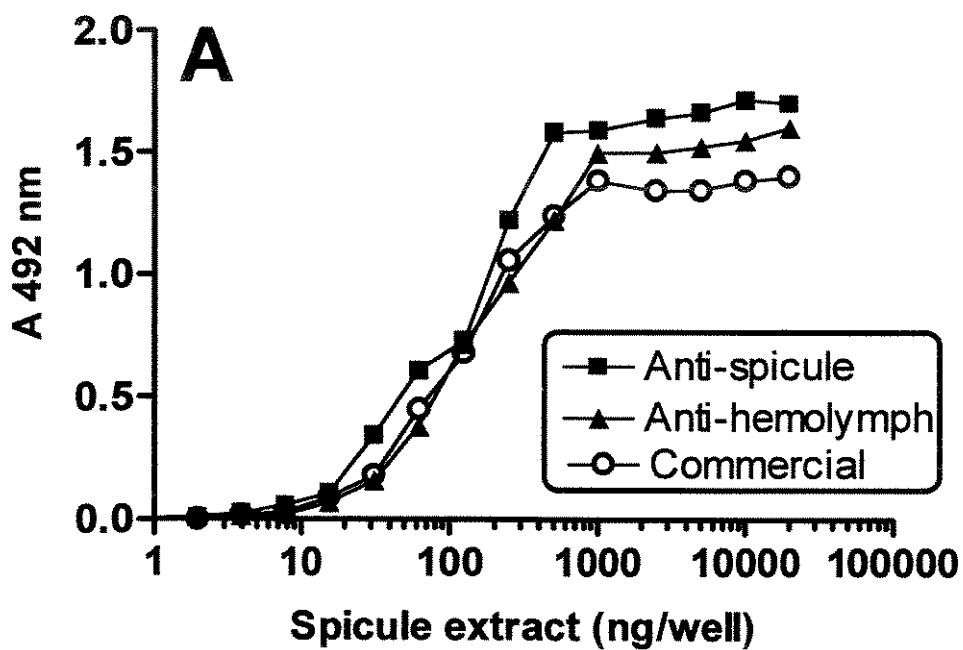
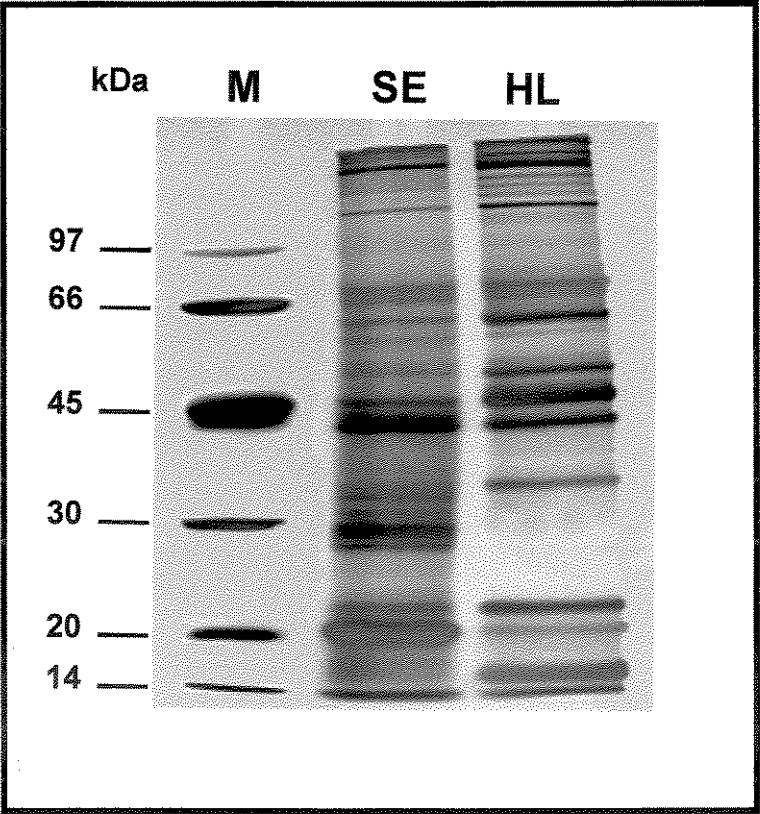
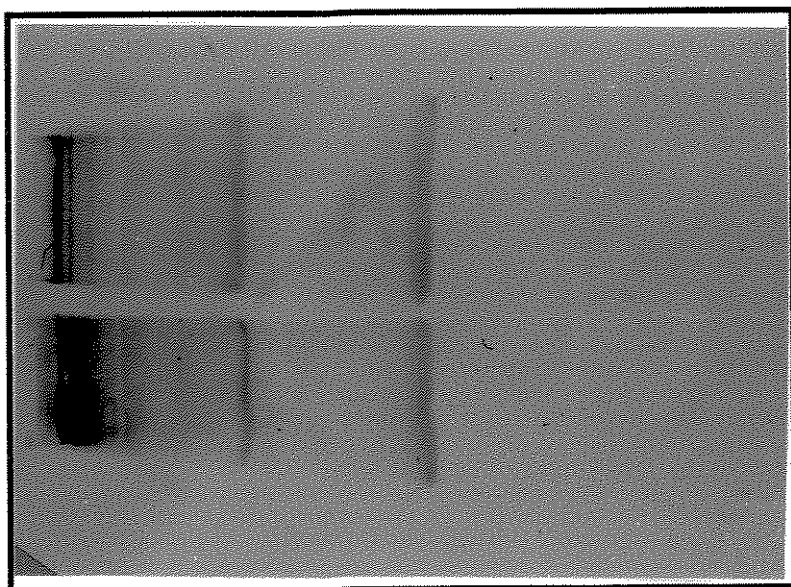


FIGURE 3



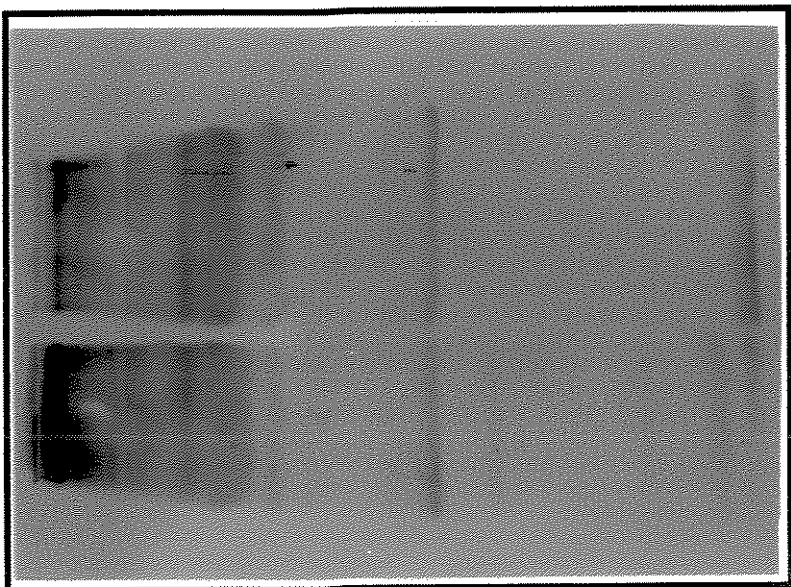
HL

SE



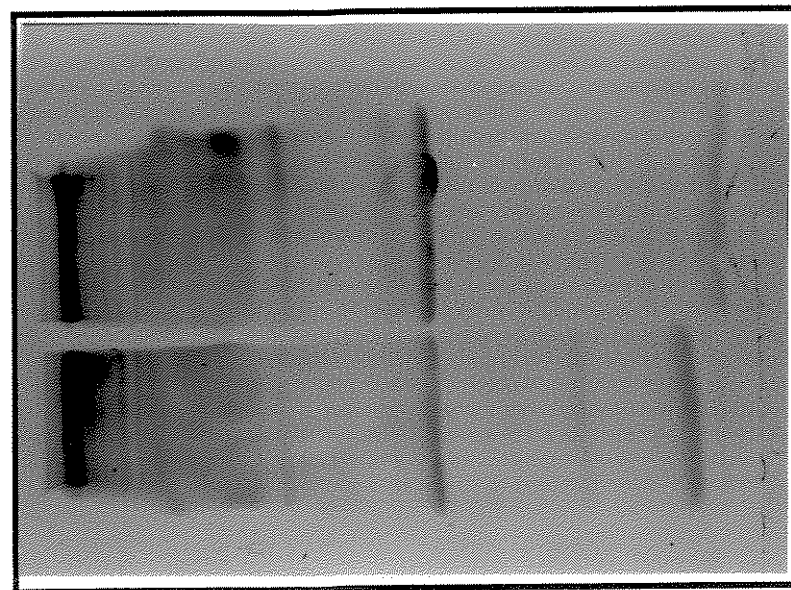
HL

SE



HL

SE



ANTI-HEMOLYMPH

ANTI-SPICULE

COMMERCIAL

FIGURE 4

FIGURE 5

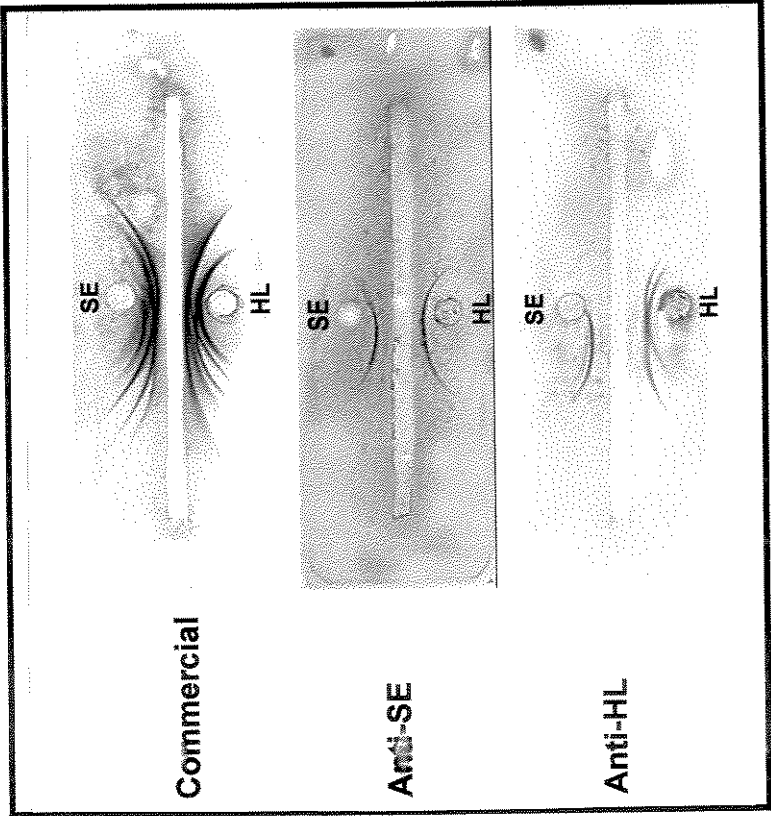


FIGURE 6

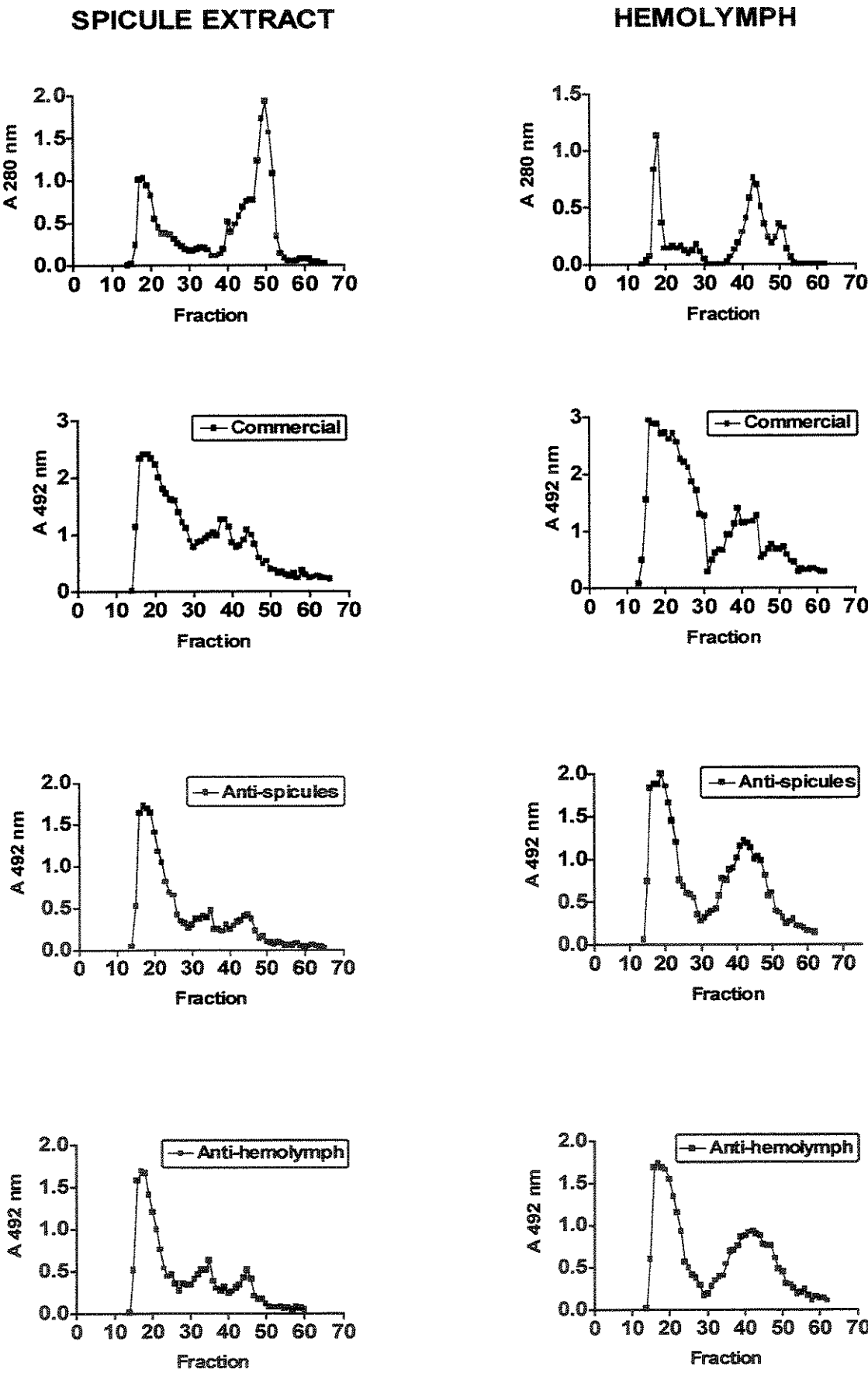
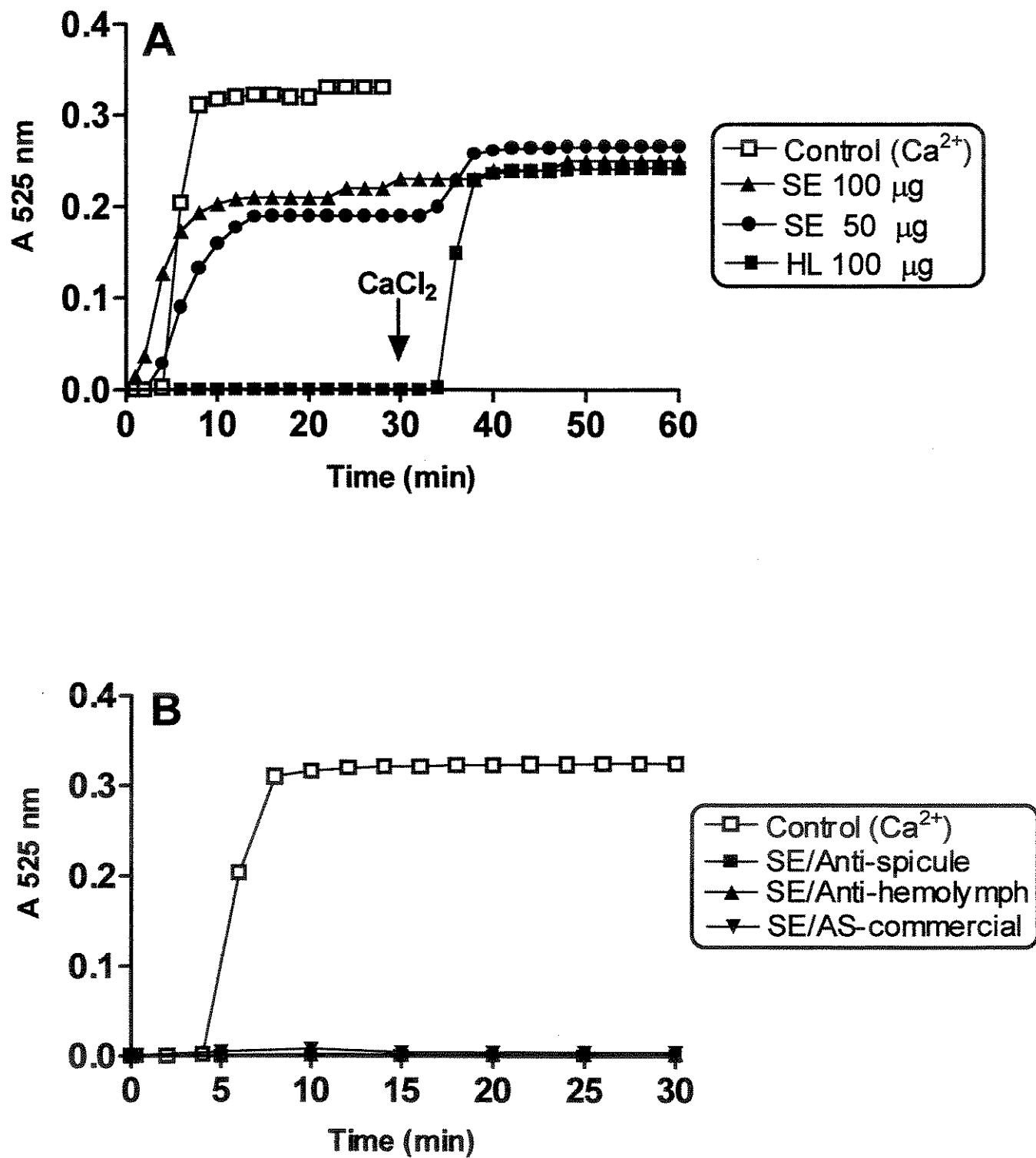


FIGURE 7



4. CONCLUSÃO GERAL

4. CONCLUSÃO GERAL

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que a produção de anti-soro contra o extrato de cerdas e contra a hemolinfa de *L. obliqua* foi satisfatória, com um título adequado para realização dos testes imunológicos. Houve semelhança marcante na imunorreatividade do extrato de cerdas e da hemolinfa com os diversos anti-soros, o que indica considerável identidade na composição protéica destas duas amostras biológicas. A semelhança entre os perfis de imunorreatividade obtidos com o extrato de cerdas e a hemolinfa da *L. obliqua* no ELISA foi confirmada pelo imunoblot e, em grau menor, pela imunoeletroforese.

A semelhança na composição imunológica entre o extrato de cerdas e a hemolinfa indica ou (1) que o veneno de *L. obliqua* faz parte integral da hemolinfa (conforme sugerido para a *L. achelous*), ou (2) que a hemolinfa simplesmente serve de 'veículo' para carregar ou transportar o veneno (possivelmente produzido por uma camada de células epiteliais na parede interna das cerdas (VEIGA *et al.*, 2001)) para dentro da vítima durante a inoculação. Independente de qual destas hipóteses esteja certa, parece razoável concluir que a maioria das proteínas reconhecidas pelos anti-soros de coelho e também o comercial provavelmente não tem a ver diretamente com a ação do veneno.

A neutralização eficaz pelos anti-soros contra cerdas e hemolinfa da atividade coagulante do extrato de cerdas em soro humano citratado indica que estes possuem anticorpos contra as proteínas responsáveis por esta atividade. De modo semelhante, em outros experimentos, observou-se que os três anti-soros estudados eram capazes de reverter o estado de sangue incoagulável em ratos

após injeção de extrato de cerdas (dados não mostrados). Estes resultados mostram claramente o poder neutralizante do anti-soro contra hemolinfa, e sugerem que a hemolinfa poderia servir de fonte alternativa para antígenos na produção de soro anti-lonômico em larga escala em equinos.

5. SUMMARY

5. SUMMARY

Caterpillars of saturnid moths belonging to the genus *Lonomia* can cause severe and sometimes fatal envenoming, the main symptoms of which are coagulation disturbances, hemorrhaging, renal failure and intracranial hemorrhaging. The administration of antiserum raised against a spicule extract from *Lonomia obliqua* is the only effective treatment for systemic envenomations. In this work, we raised antisera in rabbits against a spicule extract and hemolymph and examined their cross-reactivity by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), immunoblotting and immunoelectrophoresis. In ELISA, the rabbit antisera and the commercial antiserum showed similar dilution curves and cross-reactivities with the spicule extract and hemolymph. Considerable similarity was also seen in the immunoblot patterns with all three antisera. The immunoelectrophoretic profiles were also alike. Fractionation of the spicule extract and hemolymph by gel filtration yielded qualitatively similar elution profiles which cross-reacted extensively with the three antisera. All antisera neutralized the coagulant activity of the spicule extract in human citrated plasma. These results indicate that *L. obliqua* spicule extracts and hemolymph share many antigens and that antisera raised in rabbits and horses show similar cross-reactivities with these biological samples.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMARANT, T.; BURKHART, W.; LE VINE, H.; AROCHA-PIÑANGO, C. L.; PARIKH, I. – Isolation and complete amino acid sequence of two fibrinolytic proteinases from the toxic *Saturnid* caterpillar *Lonomia achelous*. **Biochim Biophys Acta**, **1079**: 214-21, 1991.
- AROCHA-PIÑANGO, C. L. - Fibrinolysis producida por contato com orugas. **Acta Cient Venez**, **18**: 136-39, 1967.
- AROCHA-PIÑANGO, C. L.; BLUMENFELD-BOSCH, N.; TORRES, A.; GOSTEIN, C.; NOUEL, A.; ARGUELLO, A.; CARJAVAL, Z.; GUERRERO, B.; OJEDA, A.; RODRIGUEZ, A. - Six new cases of caterpillar bleeding syndrome. **Thromb Haemost**, **67**: 402-7, 1992.
- AROCHA-PIÑANGO, C. L. MARCHI, R.; CARVAJAL, V.; GUERRERO, B. - Invertebrate compounds acting on the hemostatic mechanism. **Blood Coagul Fibrinolysis**, **10**: 43-68, 1999.
- AROCHA-PIÑANGO, C. L.; MARSH, N. A.; ROBINSON, D. – A fibrinolytic agent from a saturnid caterpillar. Partial purification and characterization. Partial isolation and purification. **Thromb Diath Haemost**, **29**: 135-42, 1973.
- AROCHA-PIÑANGO, C. L.; MARVAL, E.; GUERRERO, B. - *Lonomia* genus caterpillar toxins: biochemical aspects. **Biochimie**, **82**: 937-42, 2000.
- AROCHA-PINANGO, C. L.; BLUMENFELD-BOSCH, N.; NOUEL, A. L.; TORRES, A.; PERALES, J.; ALONSO, M. E.; RODRIGUEZ, S.; CARVAJAL, Z. A.; OJEDA, A. ; TASSAYCO, M. L.; CHITTY, W. – Fibrinolytic and procoagulant agents from a Saturniidae moth caterpillar. In: PIRKLE H.; MARKLAND F. S.,

eds. **Haemostasis and animal venoms**, New York, Marcel Dekker, pp. 223-40, 1988.

AROCHA-PIÑANGO, C. L.; PEPPER, D. S. - Studies of a fibrinolytic enzyme from the larvae of *Lonomia achelous* (Cramer) using chromogenic peptide substrates. **Thromb Haemost**, **46**: 710-13, 1981.

AROCHA-PIÑANGO, C. L.; PERALES, J.; GORZULA, S. - Fibrinolytic agents in the biological fluids of a caterpillar. **Acta Cient Venez**, **28**: 284-89, 1977.

AROCHA-PIÑANGO, C. L.; PERALES, J.; CARVAJAL, Z. - Studies on the degradation of fibrinogen by proteolytic enzymes from the larvae of *Lonomia achelous* (Cramer). **Thromb Haemost**, **45**: 233-36, 1981.

BETTINI, S. (ed.) – **Arthropod venoms**. Berlin, Springer Verlag, 1978.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional da Saúde - **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. Brasília, 1998, p. 131.

CARVAJAL, Z.; AROCHA-PINANGO, C. L. – Estudio zimográfico de las fracciones purificadas del veneno de la *Lonomia achelous*. **Rev Iberoamer Tromb Hemostas**, **4**: 182-4, 1991.

COLL-SANGRONA, E.; AROCHA-PIÑANGO, C. L. - Fibrinolytic action on fresh human clots of whole body extracts and two semipurified fractions from *Lonomia achelous* caterpillar. **Braz J Med Biol Res**, **31**: 779-84, 1998.

CRUZ-HÖFLING, M. A. & HYSLOP, S. – Light and scanning electron microscopy of the venom spicules of *Lonomia obliqua* Walker caterpillars (Saturniidae). In: **Reunião Científica Anual do Instituto Butantan**, 4-8 de dezembro de 2000,

DIAS DA SILVA, W.; ROCHA CAMPOS, A. C. M.; GONÇALVES, L. R. C.; SOUZA- E-SILVA, M. C.; HIGASHI, H. G.; YAMAGUSHI, I. K.; KELEN, E. M. A. – Development of an antivenom against toxins of *Lonomia obliqua* caterpillars. **Toxicon**, **34**: 1045-49, 1996.

DONATO, J. L.; MORENO, R. A.; HYSLOP, S.; DUARTE, A.; ANTUNES, E.; LE BONNIEC, B. F.; RENDU, F.; DE NUCCI, G. – *Lonomia obliqua* caterpillar spicules trigger human blood coagulation via activation of Factor X and prothrombin. **Thromb Haemost**, **79**: 539-42, 1998.

DUARTE, A. C.; CAOVILO, J.; HERMMAN, F.; RENNER, L. O.; SANTOS, S. R.; TEFILLI, A. P.; RODRIGUES, C.; BUTZKE, L. M. W. – Hemorragia gengivo-jugal pós contato com *Lonomia obliqua*. **Rev Méd HSVP**, **9**: 52-4, 1997.

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

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

FAN, W. H. - Ensaio clínico em três fases para avaliação de um antiveneno específico no tratamento da síndrome hemorrágica causada por lagartas do gênero *Lonomia*. Campinas, 2002. [Tese – Doutorado - Universidade Estadual de Campinas].

FRAIHA NETO, H. I.; BALLARINI, A. J.; LEÃO, R. N. Q.; COSTA JÚNIOR, D.; DIAS, L. B. – Síndrome hemorrágica por contato com larvas de mariposa

(Lepidoptera, Saturniidae). **Man Inst Evandro Chagas Fund Serv S Pública**, 2: 811-20, 1986.

FRAIHA NETO, H.; COSTA Jr., D.; QUEIROZ DE LEÃO, R. N.; BALLARINI, A. J.
– Acidentes hemorrágicos por larvas de *Lonomia*. In: **Plantas venenosas e animais peçonhentos** (SCHVARTSMAN, S, ed.). São Paulo, Sarvier, 1992, p. 241-4.

GUERRERO, B.; AROCHA-PINANGO, C. L. – Activation of human prothrombin by the venom of *Lonomia achelous* (Cramer) caterpillars. **Thromb Res**, 66: 169-78, 1992.

GUERRERO, B.; AROCHA-PINANGO, C. L.; GIL, S. J. A. - *Lonomia achelous* caterpillar venom (LACV) selectively inactivates blood clotting factor XIII. **Thromb Res**, 87: 83-93, 1997.

GUERRERO, B.; GIL, S. J. A.; PERALES, J.; AROCHA-PINANGO, C. L. – Effect on platelet FXIII and partial characterization of Lonomin V, a proteolytic enzyme from *Lonomia achelous* caterpillar venom. **Thromb Res**, 93: 243-52, 1999.

HOMMEL, D.; BOUCHAREINE, L.; HULIN, A. – Envenenation par une chenille de lépidoptère; *Lonomia achelous*. Revue de la littérature. À propos de deux cas em Guyane Française. **Sem Hop Paris**, 71: 9-12, 1995.

KAWAMOTO, F. & KUMADA, N. – Biology and venom of Lepidoptera. In: **Handbook of natural toxins. Vol. 2. Insect poisons, allergens and other invertebrate venoms**. (TU, A.T., ed.), New York, Marcel Dekker, pp. 291-330, 1984.

- KELEN, E. M. A.; DUARTE, A. C.; TOMY, S. C.; SANO-MARTINS, I. S.; CASTRO S, C. B.; GUERRERO, B.; AROCHA-PINANGO, C. L. - Acquired hemorrhagic syndrome from contact with a caterpillar (*Lonomia obliqua* Walker 1855, Saturniidae). **Toxicon**, **34**: 146, 1996.
- KELEN, E. M. A.; PICARELLI, Z. P.; DUARTE, A. C. - Hemorrhagic syndrome induced by contact with caterpillars of the genus *Lonomia* (Saturniidae, Hemileucinae). **J Toxicol - Toxin Rev**, **14**: 283-308, 1995.
- LEMAIRE, C. Descriptions d'Attacidae nouveaux d'Amerique Centrale e du Sud. (Lep.). I. Descriptions preliminaires de 16 espèces nouvelles du genre *Lonomia* Walker. **Bull Soc Entomol France**, **76**: 197-205, 1972a.
- LEMAIRE, C. – Révision du genre *Lonomia* Walker (Lep., Attacidae). **Ann Soc Entomol Fr**, **8**: 767-861, 1972b.
- LORINI, L. M. & CORSEUIL, E. – Aspectos morfológicos de *Lonomia obliqua* Walker (Lepidoptera: Saturniidae). **Neotrop Entomol**, **30**: 373-78, 2001.
- LUCCAS, S. – Perigo: esta lagarta pode matar. **Guia Rural**, **3**: 29-33, 1991.
- MARQUES, L. A. M. - Estudo imunoquímico do veneno da lagarta *Lonomia obliqua* e desenvolvimento de um ELISA ("Enzyme-linked immunosorbent assay") para detecção do veneno. Campinas, 1999 [Dissertação – Mestrado - Universidade Estadual Campinas].
- MARQUES, L. A. M; PANUNTO, P. C.; MELLO, S. M.; ZANIN, M.; HYSLOP, S. – An enzyme-linked immunosorbent assay for venom from caterpillars of the saturnid moth *Lonomia obliqua*. **Toxicon**, in preparation.

MARQUES, L. A. M.; PANUNTO, P. C.; HYSLOP, S. – An immunological investigation of venom from caterpillars of the saturnid moth *Lonomia obliqua*. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, submetid.

REIS, C. V.; PORTARO, F. C.; ANDRADE, S. A.; FRITZEN, M.; FERNANDES, B. L.; SAMPAIO, C. A.; CAMARGO, A. C.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. - A prothrombin activator serine protease from the *Lonomia obliqua* caterpillar venom (Lopap) Biochemical characterization. **Thromb Res**, **102**: 427-36, 2001a.

REIS, C. V.; FARSKY, S. H.; FERNANDES, B. L.; SANTORO, M. L.; OLIVA, M. L.; MARIANO, M.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. – *In vivo* characterization of Lopap, a prothrombin activator serine protease from the *Lonomia obliqua* caterpillar venom. **Thromb Res**, **102**: 437- 43, 2001b.

ROCHA-CAMPOS, A. C. M.; GONÇALVES, L. R. C.; HIGASHI, H. G.; YAMAHUSHI, I. K.; FERNANDES, I.; OLIVEIRA, J. E.; RIBELA, M. T. C. P.; SOUZA-E-SILVA, M. C. C.; DIAS DA SILVA, W. - Specific heterologous F(ab')₂ antibodies revert blood incoagulability resulting from envenoming by *Lonomia obliqua* caterpillars. **Am J Trop Med Hyg**, **64**: 283-9, 2001.

TU, A.T. (ed.) – **Handbook of natural toxins. Vol. 2. Insect poisons, allergens and other invertebrate venoms.** New York, Marcel Dekker, 1984.

VEIGA, A. B. G.; BLOCHTEIN, B.; GUIMARÃES, J. A. - Structures involved in production, secretion and injection of the venom produced by the caterpillar *Lonomia obliqua* (Lepdoptera, Saturniidae). **Toxicon**, **39**: 1343-51, 2001.