

Isabelle Valle dos Anjos

**Caracterização biológica do extrato de cerdas de
Lonomia descimoni (Lepidópteros, Saturniidae) e
eficácia da soroterapia no envenenamento
experimental**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Pesquisas laboratoriais em saúde pública

Orientador: Prof. Dr. Luis Roberto de Camargo Gonçalves

São Paulo

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Anjos, Isabelle Valle dos

Caracterização biológica do extrato de cerdas de *lonomia descimoni* (Lepidópteros, *Saturniidae*) e eficácia da soroterapia no envenenamento experimental/ Isabelle Valle dos Anjos. -2019.

Dissertação (Mestrado em Ciências) - Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças, São Paulo, 2019.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública.

Orientação: Prof. Dr. Luis Roberto de Camargo Gonçalves.

1. Envenenamento/fisiopatologia.
2. Antivenenos/envenenamento.
3. Transtornos da coagulação sanguínea/terapia.
4. Imunização passiva/utilização.
5. Peçonhas/envenenamento.
6. Toxinas biológicas/fisiologia.

SES/CCD/CD-395/2019

Elaborada por Renan Matheus Predasoli CRB 8/9275

Dedico esse trabalho aos meus pais
Salvador e Joelle, que sempre me
incentivaram a estudar. Sem eles nada
disso seria possível.

Dedico também a minha avó Tereza
que cuidou de mim toda a minha
infância e adolescência. Obrigada por
todo amor dedicado.

“Em seu laboratório, um cientista não é apenas um técnico, ele também é uma criança colocada diante de fenômenos naturais que o impressionam como um conto de fadas.”

Marie Curie

Agradecimentos

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus que me capacitou, protegeu, sustentou, fortaleceu e foi minha provisão nessa caminhada, sem Ele nada disso seria possível.

Agradeço ao meu orientador, Dr. Luis, por todo o conhecimento compartilhado nessa caminhada, pelo apoio, orientação, conselhos, conversas e paciência com as minhas brincadeiras e danças pelo laboratório.

Sou grata pela minha co-orientadora, Dra. Ida pela oportunidade que me deu na iniciação científica e todo o conhecimento compartilhado desde então nessa caminhada até o mestrado, pelas conversas, histórias, conselhos e todo auxílio até aqui.

Sou grata pelos grandes amigos que fiz no Laboratório de Fisiopatologia do Instituto Butantan, que se tornaram uma segunda família para mim, por aguentarem minhas crises de ansiedade, pela ajuda quando eu mais precisei, por rirem comigo das besteiras que eu faço, pelo papo cabeça e pelas zoeiras.

Agradeço a todos os funcionários do Laboratório de Fisiopatologia do Instituto Butantan que sempre nos ajudam no dia a dia.

Sou grata pelos amigos que fiz na CCD e pelos professores excelentes que tive, que sem sombra de dúvida acrescentaram imensamente na minha formação como pessoa e como cientista.

Sou grata a minha família que me apoiou e me sustentou em muitos momentos. E aos amigos de longas datas que mesmo distante estão sempre próximos, obrigada Jefferson, Zelita e Verônica. Agradeço pelos amigos que

entraram na minha vida recentemente, principalmente o Felipe que em tão pouco tempo se tornou um grande amigo!

Sou grata por todas as pessoas que conheci até aqui, por tudo que me aconteceu e por todo o conhecimento e crescimento que tive. Gratidão!

Agradeço a CAPES pelo suporte financeiro e a Fundação Butantan por nos disponibilizar o soro antilonômico.

Resumo

Nas Américas são descritas ao menos 12 espécies de lagartas do gênero *Lonomia*. Destas, existem relatos de envenenamentos graves por contato com lagartas *L. obliqua* e *L. achelous*, caracterizados por síndrome hemorrágica, com coagulopatia de consumo, insuficiência renal aguda e, em alguns casos, hemorragia intracraniana e morte. No Brasil, o Instituto Butantan desenvolveu um antiveneno utilizando como antígeno o extrato de cerdas de lagartas *L. obliqua*. No entanto, esse antiveneno tem sido utilizado em outros países da América do Sul, como Peru, Guiana Francesa, Venezuela e Colômbia, no tratamento do envenenamento causado por *Lonomia* de outras espécies. Na Colômbia, estudos realizados com as espécies *L. orientoandensis* e *L. casanarensis* demonstraram que ambas possuem toxinas com atividades potencialmente capazes de causar acidentes característicos do lonomismo. Além destas lagartas, a *L. descimoni* ainda não teve suas toxinas caracterizadas quanto às suas atividades biológicas, ou a sua neutralização pelo soro antilonômico produzido no Brasil, sendo este o objetivo desse trabalho. Foram avaliadas as atividades coagulante, fosfolipásica, hialuronidásica e desfibrinogente, sempre comparando-se com as mesmas atividades presentes no extrato obtido de lagartas *L. obliqua*. Foi também determinado o reconhecimento imunológico e o poder neutralizante do soro antilonômico. Os resultados demonstraram que o extrato de *L. descimoni* possui ação coagulante, fosfolipásica e hialuronidásica, porém significativamente menos intensas que as observadas no extrato de *L. obliqua*. Além disso, o extrato de *L. descimoni* não possui atividade fibrinolítica. Quanto à ação desfibrinogente, o extrato de *L. descimoni* foi capaz de induzir envenenamento experimental, com queda nos níveis de fibrinogênio e com hemoglobinúria apenas quando foi injetado pela via intravenosa nos ratos. O extrato de *L. obliqua* causa esses mesmos efeitos quando injetados nos animais pela via intradérmica. O soro antilonômico reconheceu as toxinas presentes no extrato de *L. descimoni* e neutralizou a atividade coagulante

desse extrato. Nossos resultados indicam que as lagartas *Lonomia descimoni* possuem toxinas com atividades mais fracas que as da *L. obliqua*, porém com potencial de causar envenenamento. Ademais, o soro antilonômico foi capaz de reconhecer e neutralizar as proteínas presentes no extrato de *L. descimoni*.

Palavras-chaves: *Lonomia descimoni*. Soro antilonômico. Envenenamento. *Saturniidae*.

Abstract

At least 12 species of caterpillars of *Lonomia* genus are described in the Americas. Of these, there are reports of severe envenomation by contact with *L. obliqua* and *L. achelous* caterpillars, characterized by hemorrhagic syndrome, consumption coagulopathy, acute renal failure and, in some cases, intracranial hemorrhage and death. In Brazil, the Butantan Institute developed an antivenom using as antigen the *L. obliqua* caterpillar bristles extract. However, this antivenom has been used in other countries of South America, such as Peru, French Guiana, Venezuela and Colombia, in the treatment of envenomation caused by other species of *Lonomia*. In Colombia, studies with the species *L. orientoandensis* and *L. casanarensis* have been showing that these species have toxins with activities potentially capable of causing accidents characteristic of lonomism. Besides these, *L. descimoni* caterpillars have not yet had their toxins characterized as to their biological activities, or to their neutralization by the caterpillar antivenom produced in Brazil, which is the objective of this work. The coagulant, phospholipase, hyaluronidase, fibrinolytic and defibrinogenant activities were evaluated, always comparing with the same activities present in the extract obtained from *L. obliqua* caterpillars. Immune recognition and the neutralizing ability of caterpillar antivenom were also determined. The results showed that the extract of *L. descimoni* has a coagulant, phospholipase and hyaluronidase activity, but significantly less intense than those observed in *L. obliqua* extract. Further, *L. descimoni* bristle extract have no fibrinolytic activity. As for the defibrinogenant activity, *L. descimoni* extract was able to induce experimental envenomation, with a decrease in fibrinogen and hemoglobinuria only when it was injected intravenously in rats. The extract of *L. obliqua* causes these same effects when injected into the animals by the intradermal route. The caterpillar antivenom recognized the toxins present in the extract of *L. descimoni* and neutralized the coagulant activity of this extract. Our results indicate that the *Lonomia descimoni* caterpillars possess toxins with weaker activities than those of *L. obliqua*, but with the potential to

cause envenomation. Moreover, the caterpillar antivenom was able to recognize and neutralize the proteins present in *L. descimoni* bristle extract.

Keywords: *Lonomia descimoni*. Caterpillar antivenom. Envenomation. Saturniidae.

Lista de Abreviaturas

- CTAB** – Brometo de cetrimônio
- CEUA IB** – Comissão de Ética em uso de Animais do Instituto Butantan
- DE** – Dose eficaz
- DMC** – Dose mínima coagulante
- DMD** – Dose mínima desfibrinogenante
- FII** – Fator dois (protrombina)
- FV** – Fator cinco
- FVII** – Fator sete
- FVIII** – Fator oito
- FIX** – Fator nove
- FX** – Fator dez
- FXI** – Fator onze
- FXIII** – Fator treze
- FvW** – Fator de von Willebrand
- FT** – Fator tissular
- IgG** – Imunoglobulina G
- i.v.** – Intravenosa
- i.d.** - Intradérmica
- LDSC** – *Lonomia descimoni*
- LOB** – *Lonomia obliqua*
- NR** – Não reduzido
- OPD** – Ortofenilenodiamina
- PBS** – Tampão fosfato-salina
- PDF** – Produto de degradação de fibrina
- R** – Reduzido
- T.A.** – temperatura ambiente
- TC** – Tempo de coagulação
- TP** – Tempo de protrombina
- TTPa** – Tempo de tromboplastina parcial ativada
- TT** – Tempo de trombina

URT – Unidades redutoras de turbidez

Lista de símbolos

μL – Microlitro

μg – micrograma

mL – Mililitro

mM – Milimolar

mg - miligramas

nM –Nanomolar

ng -Nanograma

NaCl – Cloreto de sódio

Na₂CO₃ – bicabornato de sódio

NaOH – Hidróxido de sódio

CaCl₂ – Cloreto de cálcio

CuSO₄ – Sulfato de cobre II

dL – Decilitro

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

H₂SO₄ – Ácido sulfúrico

Lista de tabelas

Tabela 1 - Evolução do caso de pacientes acidentados com lagartas no Brasil entre 2007 e 2017.....	24
Tabela 2 – Titulação de anticorpos pelo método de ELISA utilizando como antígenos os extratos de cerdas de <i>L. obliqua</i> e <i>L. descimoni</i> na concentração de 10 µg/mL.....	49

Lista de figuras

- Figura 1.** Número total de notificação de acidentes por lagartas que ocorreram no Brasil de acordo com mês desde 2007 até o ano de 2017. Fonte: Ministério da Saúde/SVS – Sistema de Informação de Agravos de Notificação – Sinan.....20
- Figura 2.** Número total de notificação de acidentes por lagartas no Brasil de acordo com a região desde o ano de 2007 até o ano de 2017. Fonte: Ministério da Saúde/SVS – Sistema de Informação de Agravos de Notificação – Sinan.....21
- Figura 3.** Número total de notificação de acidentes por lagartas no Brasil desde o ano de 2007 até o ano de 2017. Fonte: Ministério da Saúde/SVS – Sistema de Informação de Agravos de Notificação – Sinan.....23
- Figura 4.** Ilustração esquemática das vias intrínseca e extrínseca da cascata da coagulação (adaptado de Mann, Brummel, and Butenas 2003).....27
- Figura 5.** Lagarta *Lonomia obliqua* (Foto de Roberto H. P. Moraes)..... 27
- Figura 6.** Lagarta *Lonomia descimoni* (Foto de Giovanni Randazzo).....31
- Figura 7.** Preparação do extrato de cerdas de *Lonomia* (Fotos de Letícia Delphino/ Instituto Butantan).....35
- Figura 8.** Quantidade de proteína dos extratos de cerdas de *L. obliqua* (LOB) e *L. descimoni* (LDSC) determinados por BCA em triplicata. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão. Diferença estatística significativa para $p < 0,05$ * entre o extrato de cerdas de LOB e LDSC.....43
- Figura 9.** Dose mínima coagulante dos extratos de cerdas de *L. obliqua* (LOB) e *L. descimoni* (LDSC) expressa em $\mu\text{g/mL}$. O ensaio foi feito em triplicata e os dados estão expressos em média \pm desvio padrão. Diferença estatística significativa para $p < 0,0001$ * entre o extrato de cerdas de LOB e LDSC.....44
- Figura 10.** Dose eficaz (DE) dos extratos de cerdas de *L. obliqua* (LOB) e *L. descimoni* (LDSC) expressa em μL de soro/mg de extrato. O ensaio foi feito em triplicata e os dados estão expressos em média \pm desvio padrão.

Diferença estatística significativa para $p < 0,0001^*$ entre o extrato de cerdas de LOB e LDSC.....45

Figura 11. Atividade fosfolipásica dos extratos de cerdas de *L. obliqua* (LOB) e *L. descimoni* (LDSC) na concentração de 5 µg/mL. A leitura foi feita após 1 hora de incubação a 37°C. . O ensaio foi feito em triplicata e os dados estão expressos em média ± desvio padrão. Diferença estatística significativa para $p < 0,05^*$ entre o extrato de cerdas de LOB e LDSC.....45

Figura 12. Atividade hialuronidásica dos extratos de cerdas de *L. obliqua* (LOB) e *L. descimoni* (LDSC) expressa com quantidade de extrato necessária para hidrolisar 50 % do ácido hialurônico, então expressa como unidades redutoras de turbidez (URT). O ensaio foi feito em triplicata e os dados estão expressos em média ± desvio padrão. Diferença estatística significativa para $p < 0,0001^*$ entre o extrato de cerdas de LOB e LDSC.....46

Figura 13. A atividade fibrinolítica do veneno de *L. obliqua* (LOB) (n=5) e *L. descimoni* (LDSC) (n=5) foi mensurada medindo os halos de hidrólise em placas de fibrina-agarose. Foi utilizado como controle negativo solução salina 0,85 % e como controle positivo utilizamos 10 µg de veneno de *Bothrops atrox*. Os dados estão expressos em média ± desvio padrão. Diferença estatística significativa para $p < 0,0001^*$ em relação a LOB 50 µg, # em relação ao controle positivo, @ em relação ao controle negativo.....47

Figura 14. Perfil proteico e capacidade de reconhecimento do soro antilonômico. A) Western blotting do extrato de cerdas de *L. obliqua* (LOB) e *L. descimoni* (LDSC)(20 µg de proteína de cada extrato) em membrana de nitrocelulose. Incubado primeiro com antiveneno e subsequentemente incubado com IgG anti-horse conjugado com peroxidase. B) Gel de eletroforese em SDS-Page a 12% com 20 µg de proteína do extrato de cerdas de *L. obliqua* (LOB) e *L. descimoni* (LDSC) na forma não reduzida e corado com Comassie Blue. MM: marcadores moleculares de massa; NR: não reduzido; R: reduzido; Lob: *L. obliqua* e Ldsc: *L. descimoni*.....48

Figura 15. Dados hematológicos de animais envenenados com extrato de cerdas de *L. descimoni* com 12,5 µg/animal (n=3), 25 µg/animal (n=3), 50 µg/animal (n=3) via i.v., 150 µg/animal via i.d. (n=3), e os animais controle

(n=3) em que nada foi injetado. O sangue foi coletado 1 hora após a inoculação do extrato, exceto os animais que foram injetados via intradérmica que foi coletado 2 horas depois. Os resultados são expressos em média \pm erro padrão da média. Diferença estatística significativa para $p < 0,05$. * em relação ao grupo controle, & em relação ao grupo que foi injetado 50 $\mu\text{g}/\text{animal}$ e # em relação a grupo que foi injetado 25 $\mu\text{g}/\text{animal}$50

Índice

1.	INTRODUÇÃO.....	19
1.1.	ENTOMOLOGIA.....	19
1.1.	ASPECTOS CLÍNICOS DO ENVENENAMENTO POR <i>LONOMIA</i>	22
1.2.	HEMOSTASIA E COAGULAÇÃO.....	25
1.3.	FISIOPATOLOGIA DO ENVENENAMENTO POR <i>LONOMIA OBLIQUA</i>	27
1.4.	FISIOPATOLOGIA DO ENVENENAMENTO POR <i>LONOMIA ACHELOUS</i>	29
1.5.	O SORO ANTILONÔMICO	30
1.6.	A LAGARTA <i>LONOMIA DESCIMONI</i>	31
2.	OBJETIVOS.....	33
2.1.	OBJETIVOS GERAIS.....	33
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
3.	MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1.	EXTRATO DE CERDAS DAS LAGARTAS DO GÊNERO <i>LONOMIA</i>	34
3.2.	SORO ANTILONÔMICO	35
3.3.	DOSAGEM DE PROTEÍNA.....	35
3.4.	DETERMINAÇÃO DA DOSE MÍNIMA COAGULANTE	36
3.5.	DETERMINAÇÃO DA DOSE EFICAZ DE ANTIVENENO	37
3.6.	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA	37
3.7.	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE HIALURONIDÁSICA.....	38
3.8.	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE FIBRINOLÍTICA	38
3.9.	ELETROFORESE E WESTERN BLOTTING	39
3.10.	TITULAÇÃO DE ANTICORPO	40
3.11.	ANIMAIS DE LABORATÓRIO	40
3.12.	COLETA DE AMOSTRA DE SANGUE EM RATOS	40
3.13.	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DESFIBRINOGENANTE	41
3.14.	DETERMINAÇÃO DO NÍVEL DE FIBRINOGENO PLASMÁTICO	41
3.15.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	42
4.	RESULTADOS	43
4.1.	DOSAGEM DE PROTEÍNA DOS EXTRATOS	43
4.2.	DETERMINAÇÃO DA DOSE MÍNIMA COAGULANTE E DA DOSE EFICAZ	43
4.3.	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA	45
4.4.	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE HIALURONIDÁSICA.....	46
4.5.	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE FIBRINOLÍTICA	46

4.6.	ELETROFORESE E WESTERN BLOTTING	47
4.7.	TITULAÇÃO DE ANTICORPO	48
4.8.	DETERMINAÇÃO DA DOSE MÍNIMA DESFIBRINOGENANTE	49
5.	DISCUSSÃO.....	51
6.	CONCLUSÃO	54
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

1. Introdução

1.1. Entomologia

A ordem *Lepidoptera* constitui uma das maiores dentro da classe *Insecta*. Essa ordem é conhecida por possuir asas escamosas na fase adulta, tendo como exemplos mariposas e borboletas. Esses insetos podem ser diferenciados na fase adulta quanto ao período que são ativos. As borboletas geralmente são diurnas e as mariposas são noturnas. Quanto ao ciclo biológico, os Lepdópteros se desenvolvem por holometabolía, ou seja, o ciclo biológico destes insetos se dá em 4 fases: o ovo, larva (também conhecida como lagarta ou lagarta), pupa e adulto (Moraes, 2003). A fase larval ainda possui 6 fases, também conhecido como instares de desenvolvimento larval.

A importância dessa ordem em saúde pública se deve aos distúrbios causados em humanos em contato acidental com essas lagartas. O contato acidental com as larvas desta ordem recebe o nome de erucismo, enquanto que o contato acidental com mariposas é chamado de lepidopterismo, sendo este último o mais raro. São conhecidos diversos Lepdópteros causadores de acidente no Brasil pertencentes à Família *Megalopygidae*, *Saturniidae*, *Limacodidae* e *Arctiidae*. A maioria destes animais são capazes de causar apenas a dermatite urticante, os sintomas são dor imediata, edema e eritema. (Moraes, 2003).

Dentro da família *Saturniidae* são conhecidas 12 espécies do gênero *Lonomia* (L.) (Lemaire, 2002), mas até o momento existem descrições de acidentes com distúrbios hemostáticos causados pelo contato com duas delas, a *L. obliqua* e a *L. achelous* (Kelen; Picarelli; Duarte 1995). Lagartas do gênero *Lonomia* são encontradas por todo o continente Americano, desde o México até o sul do Brasil e os acidentes ocorrem principalmente no verão entre dezembro e março, diminuindo drasticamente nos meses de inverno, entre junho e outubro, como está apresentado na Figura 1.

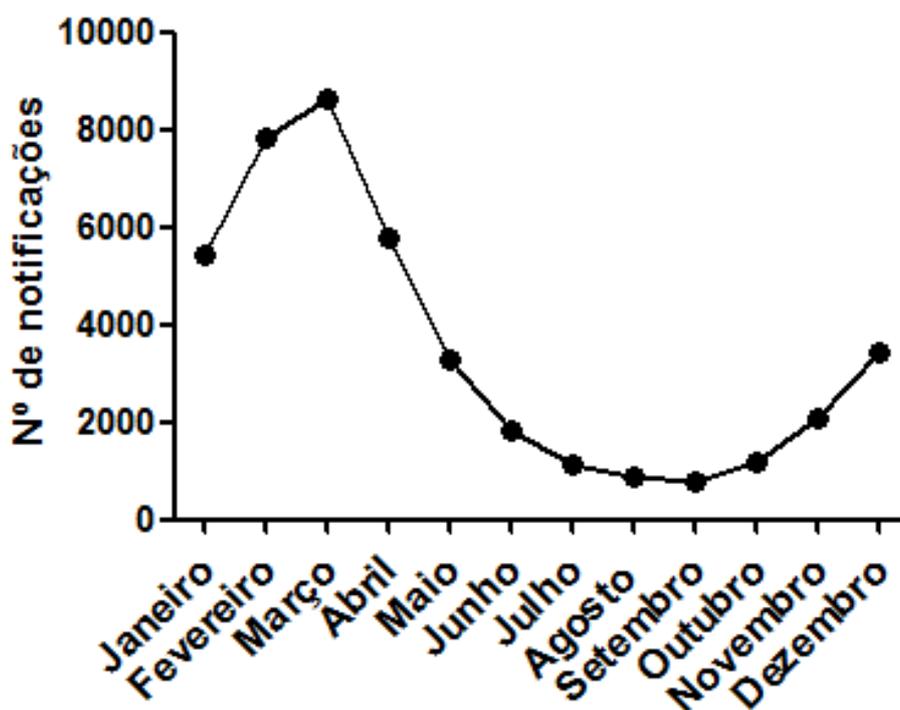


Figura 1. Número total de notificação de acidentes por lagartas que ocorreram no Brasil de acordo com mês desde 2007 até o ano de 2017. Fonte: Ministério da Saúde/SVS – Sistema de Informação de Agravos de Notificação – Sinan.

Os acidentes por lagartas ocorrem em todas as regiões do Brasil com predominância na Região Sul e Sudeste do país como mostra a Figura 2. Dentro da região Sudeste do Brasil, os estados com maior número de notificações de acidentes com lagartas são o estado de Minas Gerais com 1.095 notificações em 2017 e o estado de São Paulo com 689 notificações no mesmo ano. Apesar de serem as regiões com menor número de acidentes, a região Norte e Nordeste tiveram um aumento importante no número de notificações. No Nordeste foi registrado um total de 181 notificações de acidentes em 2007 e em 2017 foram registrados 496 acidentes. Já na região Norte, os números subiram de 78 para 233 notificações de 2007 para 2017 (Dados do Sinan).

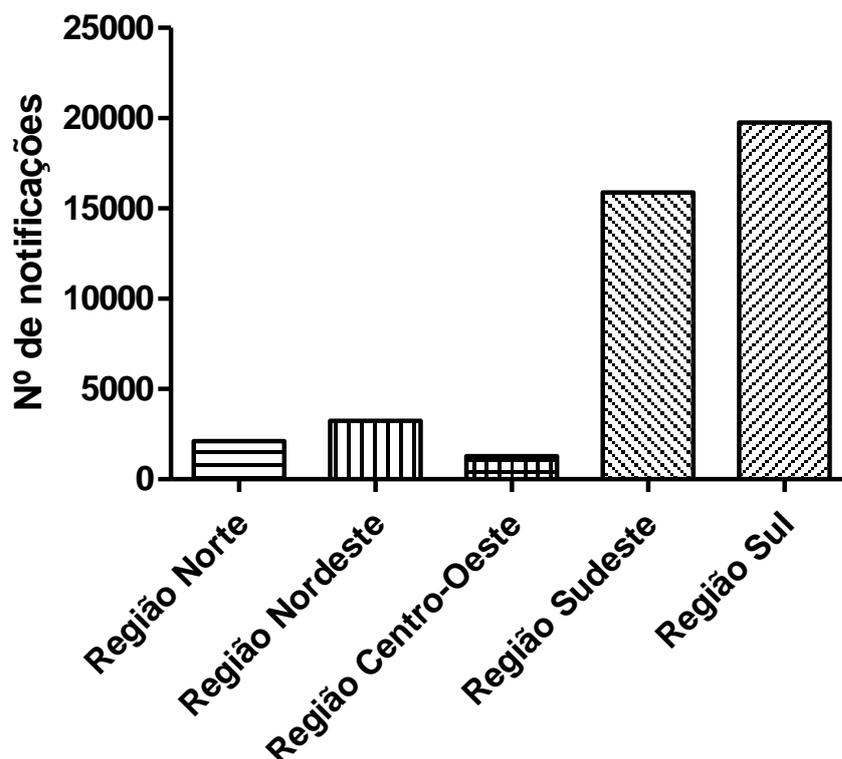


Figura 2. Número total de notificação de acidentes por lagartas no Brasil de acordo com a região desde o ano de 2007 até o ano de 2017. Fonte: Ministério da Saúde/SVS – Sistema de Informação de Agravos de Notificação – Sinan.

Devido ao hábito gregário e sua cor marrom esverdeada que a camufla nos troncos das árvores, os acidentes com *Lonomia* ocorrem quando as pessoas acidentalmente tocam as lagartas exercendo certa pressão de maneira a introduzir as cerdas na pele (Fan and Duarte, 2003; Sano-Martins *et al.*, 2018). Os acidentes por *Lonomia* geralmente ocorrem quando as lagartas estão no final do desenvolvimento larval, entre o 5º e o 6º instar. Nessa fase as lagartas se encontram em grupos de 100 ou mais exemplares nos troncos das árvores próximas do solo para empuparem (Moraes, 2003).

As cerdas das lagartas do gênero *Lonomia* são do tipo scoli com espinho, ou seja, são cerdas ou tegumentos com formato de um pinheiro com um tronco central e várias ramificações (Moraes, 2003). Estas cerdas são envolvidas externamente por uma cutícula de quitina e internamente por um tecido epitelial semelhante ao epitélio da lagarta. Em uma região

subapical constricta foi descrita uma glândula produtora de veneno. A região apical é acelular e responsável por armazenar a toxina, tornando-se rígida. Por isso, a ponta da cerda se quebra facilmente ao sofrer pressão, liberando assim, a toxina armazenada no seu interior. No entanto, não são todas as cerdas que possuem glândula produtora de toxina. Foi observado que em algumas cerdas possuem líquidos esverdeados ou alaranjados. O líquido de cor verde tem maior semelhança com a hemolinfa, enquanto que o extrato laranja tem pouca semelhança com a hemolinfa, provavelmente por ser secretado por esta glândula (Spadacci-Morena *et al.*, 2016).

1.1. Aspectos clínicos do envenenamento por *Lonomia*

O primeiro contato acidental com o gênero *Lonomia* foi registrado em 1967 na Venezuela (Arocha-Piñango and Layrisse, 1967). Os sintomas variam de acordo com a gravidade do envenenamento (Fan and Duarte, 2003). Os sintomas mais comuns são queimação local, dor, dermatite, cefaleia, hematêmese, diátese hemorrágica, equimoses, hematúria, melena, metrorragia, gengivorragia e epistaxe. Hemorragia intracerebral e insuficiência renal aguda são as complicações mais severas deste tipo de envenenamento (Arocha-Piñango and Layrisse, 1967; Duarte *et al.*, 1996; Arocha-Piango, Marval and Guerrero, 2000; Zannin *et al.*, 2003; Kowacs *et al.*, 2006; Schmitberger *et al.*, 2013; Sano-Martins *et al.*, 2017). Os testes laboratoriais dos pacientes acidentados com *L. obliqua* geralmente mostram anemia leve, leucocitose, tempo de protrombina (TP), tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) e tempo de trombina (TT) prolongados, hipofibrinogenemia, diminuição do Fator V (FV), FXIII, plasminogênio e α 2-antiplasmina. Além de aumento de FVIII, FvW, PDF e D-dímero. Os níveis de FVII, protrombina e proteína C variam em alguns pacientes (Sano-Martins *et al.*, 2017).

Não existem métodos diagnósticos específicos, por isso o diagnóstico é feito na anamnese identificando o agente e observando os distúrbios hemostáticos. O monitoramento do paciente após a entrada deve

ser feito por meio de exames como tempo de coagulação (TC), TP, TTPa e nível de fibrinogênio plasmático. A incoagulabilidade sanguínea não é detectada imediatamente após o contato, mas depois de algumas horas (Fan and Duarte, 2003).

Além do mais, é raro o paciente levar o animal e mais difícil ainda é identificar a espécie causadora do envenenamento. Pois a identificação das lagartas do gênero *Lonomia* é feita apenas pela genitália da lagarta macho por um entomologista, dificultando assim a correlação do acidente com a espécie do gênero *Lonomia* (Lemaire, 2002).

O número de acidentes com lagartas tem aumentado gradativamente nos últimos anos, chegando a 5.113 números de notificações em 2017 (Figura 3). Entretanto, não é possível avaliar a quantidade de acidentes notificados com o gênero *Lonomia*. A maioria dos casos de envenenamento notificados evoluem para a cura, com baixo número de óbito pelo agravo do envenenamento (Tabela 1).

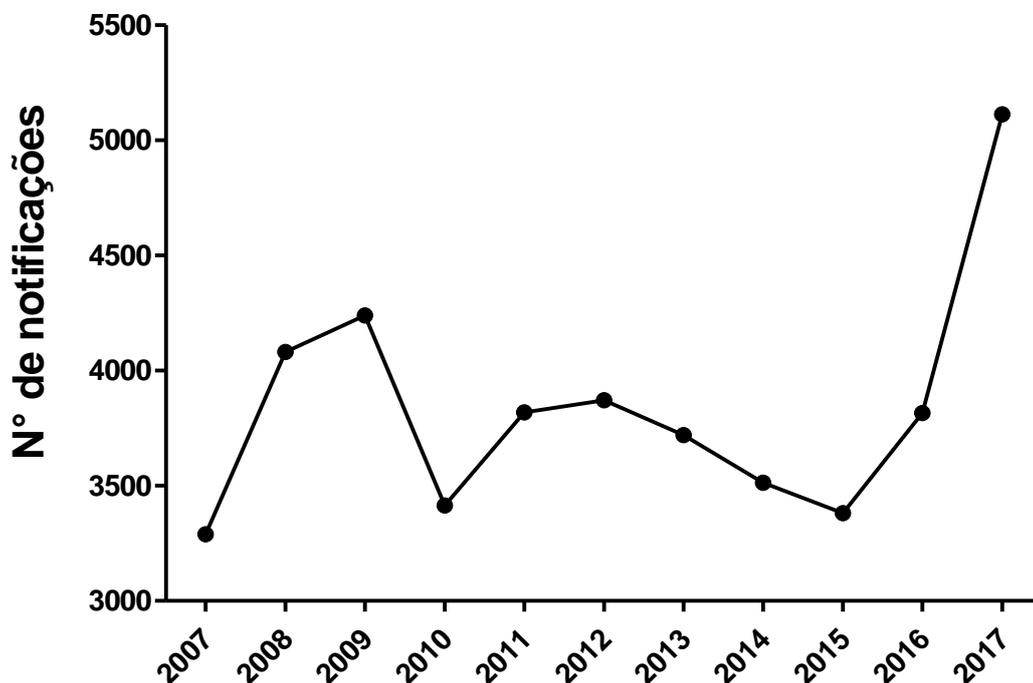


Figura 3. Número total de notificação de acidentes por lagartas no Brasil desde o ano de 2007 até o ano de 2017. Fonte: Ministério da Saúde/SVS – Sistema de Informação de Agravos de Notificação – Sinan.

Tabela 1 - Evolução do caso de pacientes acidentados com lagartas no Brasil entre 2007 e 2017.

Evolução dos casos	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	Total
TOTAL	3.290	4.081	4.240	3.414	3.819	3.871	3.720	3.513	3.381	3.816	5.113	42.282
Ign/Branco	143	187	287	214	175	217	176	182	155	214	362	2.312
Cura	3.147	3.890	3.952	3.198	3.640	3.652	3.542	3.331	3.226	3.600	4.746	39.948
Óbito pelo agravo notificado	-	4	1	2	4	2	2	-	-	2	5	22

Fonte: Ministério da Saúde/SVS – Sistema de Informação de Agravos de Notificação – Sinan.

1.2. Hemostasia e coagulação

A hemostasia normal é uma série de processos fisiológicos que ocorrem para manter o sangue no estado líquido, sem coágulos e dentro dos vasos sanguíneos. Em casos de lesão vascular, ocorre uma série de processos para induzir um tampão hemostático rápido e restrito ao local da lesão. Esses processos são regulados pelos vasos sanguíneos, plaquetas e fatores de coagulação (Robbins & Cotran, 2005).

Na fase inicial do dano tecidual, ocorre o rompimento da estrutura vascular que leva a um breve período de vasoconstrição arteriolar induzidos por fatores como a endotelina e mecanismos neurogênicos reflexos. A lesão expõe a matriz extracelular, que é altamente trombogênica, que possibilita a adesão e ativação das plaquetas, levando a liberação de grânulos secretórios que recrutam mais plaquetas para o local da lesão, formando assim o tampão primário (Mann, Brummel and Butenas, 2003; Robbins & Cotran, 2005).

Com a exposição da matriz extracelular, se dá início a fase de amplificação com a exposição de fator tissular (FT), ou fator tecidual, iniciando assim a via extrínseca da cascata de coagulação (Mann, Brummel and Butenas, 2003). A cascata de coagulação é basicamente uma cascata de conversões enzimáticas das pró-enzimas inativas, ou zimogênios, em fatores ativados. Cada uma dessas reações resulta em um complexo formado por uma enzima (um fator de coagulação ativado), um substrato (pró-enzima do fator de coagulação) e um cofator ativado, que acelera a reação, assim como mostra a Figura 4. Essas enzimas são reunidas em um complexo fosfolipídico e contidos juntos por íons cálcio (Robbins & Cotran, 2005).

O FT ao ser exposto é ativado, expressando em sua membrana o receptor de ligação com o FVII, quando ativados e unidos no complexo, ativam o FIX e FX em pequena quantidade, que são a via comum entre a via intrínseca e extrínseca da coagulação. O FIX quando ativado, ativa também seu cofator, o FVIII, que vão aumentar a ativação do complexo pró-

trombinase. Por sua vez o FX ativado, cliva seu cofator transformando-o em FV ativado (FVa), que unidos formam o complexo pró-trombinase. Este complexo cliva o FII, também conhecido como protrombina, transformando em trombina que cliva o fibrinogênio solúvel no plasma transformando-o em fibrina insolúvel que se deposita sobre o tampão hemostático, criando o tampão hemostático secundário, que é estabilizado pelo FXIII. A trombina ao ser ativada também dá início a retroalimentação da cascata de coagulação ativando mais FVIII, FIX, FX, FXI e FXIII, intensificando assim a geração de fibrina (Mann, Brummel and Butenas, 2003).

Já na fase de ativação da via fibrinolítica, que possui 3 anticoagulantes naturais: as Antitrombinas (inibem a atividade da trombina e dos fatores IXa, Xa, XIa e XIIa), proteínas C e S (inativam fatores Va e VIIIa), e o inibidor da via do fator tecidual (IVFT) que se liga ao complexo formado pelo FT e FVIIa e os inativa, limitando rapidamente a cascata de coagulação (Mann, Brummel and Butenas, 2003; Robbins & Cotran, 2005).

Concomitantemente, o tamanho do coágulo é limitado pela cascata fibrinolítica com ativação inicial da plasmina, que é derivada da clivagem de seu precursor, o plasminogênio. Este pode ser clivado por dois tipos de ativadores: o primeiro é o ativador de plasminogênio tipo uroquinase (presente em vários tecidos e no plasma) e o outro é o ativador tipo tecidual (é sintetizado principalmente pelas células endoteliais). A plasmina cliva a fibrina interferindo com a sua polimerização, limitando o coágulo ao local da lesão (Robbins & Cotran, 2005)

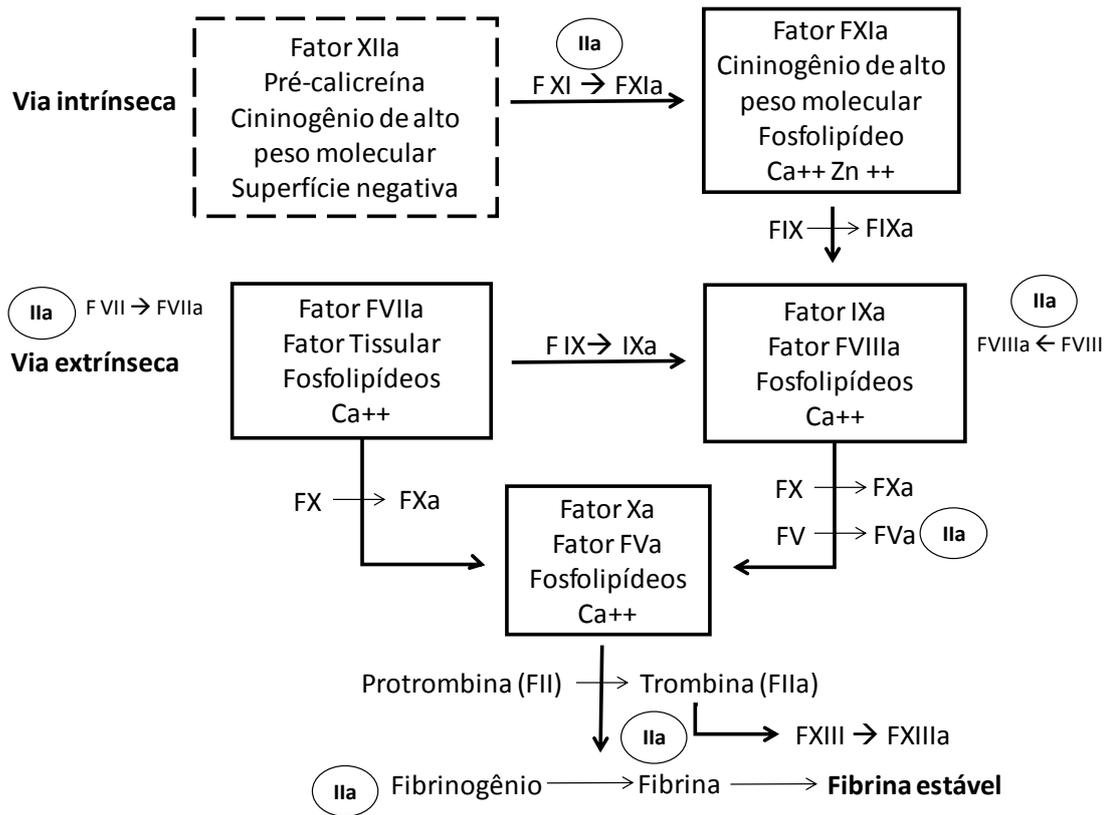


Figura 4. Ilustração esquemática das vias intrínseca e extrínseca da cascata da coagulação (adaptado de Mann, Brummel, and Butenas 2003)

1.3. Fisiopatologia do envenenamento por *Lonomia obliqua*



Figura 5. Lagarta *Lonomia obliqua* (Foto de Roberto H. P. Moraes)

A *L. obliqua* é endêmica do Brasil, podendo ser encontrada no estado da Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Contudo, também pode ser encontrada no Uruguai em Cerro Largo, Maldonado e Paysandú (Lemaire, 2002).

Essa lagarta possui uma toxina do tipo serino proteases ativadora de protrombina cálcio dependente, conhecida como Lopap e uma hemolina também conhecida como Losac, ativadora de FX independente de cálcio (Donato *et al.*, 1998; Reis *et al.*, 1999).

Há uma toxina com atividade semelhante à fosfolipase A₂, responsável pela atividade hemolítica do extrato (Seibert *et al.*, 2006). Uma outra toxina foi descrita com atividade fibrinogenolítica chamada Lonofibrase, capaz de degradar as cadeias α e β do fibrinogênio, e clivar a fibrina produzindo fragmentos diferentes dos produzidos pela clivagem causada pela plasmina (Pinto *et al.* 2004).

Além disso, foram descritas atividade hialuronidásica, efeito nociceptivo e efeito edematogênico através da ativação do sistema calicreína-cinina (De Castro Bastos *et al.*, 2004; Gouveia *et al.*, 2005; Bohrer *et al.*, 2007). Recentemente foi demonstrado que, a ativação da calicreína pelo extrato de *L. obliqua* pode levar ao desenvolvimento de insuficiência renal aguda, que é a principal complicação e causa de morte do envenenamento pelo gênero *Lonomia* (Berger *et al.*, 2019).

Foi demonstrado que o extrato de *L. obliqua*, em doses que não causam hemorragia sistêmica, aumenta o rolamento e adesão de leucócitos, aumenta a expressão de E-selectina e VCAM-1, causando modificações no citoesqueleto de células endoteliais, bem como a ativação de NF- κ B, demonstrando uma ativação do perfil pró-inflamatório da célula endotelial (Fritzen *et al.*, 2005; Nascimento-Silva *et al.*, 2012; Heinen *et al.*, 2014).

No envenenamento experimental em ratos com extrato de *L. obliqua*, foram observadas lesões hemorrágicas, necrose muscular e hemossiderose no baço (Berger *et al.*, 2013). Nos rins foi descrito aumento de proteínas

envolvidas em estresse oxidativo, infiltrado inflamatório, hemossiderose e dano tecidual (Berger *et al.*, 2015).

Desta maneira, o extrato de cerdas de *L. obliqua* causa formação de trombina intravascular levando a coagulopatia por consumo com ativação da fibrinólise (Arocha-Piñango & Guerrero 2002).

1.4. Fisiopatologia do envenenamento por *Lonomia achelous*

A *L. achelous* pode ser encontrada na Venezuela, Trinidad e Tobago, Guiana Francesa, Suriname, Equador, Peru e Bolívia (Lemaire, 2002).

Os sintomas do envenenamento por *L. achelous* são similares ao observado em *L. obliqua* devido à atividade coagulante que ambas possuem, levando à coagulação intravascular disseminada (Carrijo-Carvalho and Chudzinski-Tavassi, 2007). Porém, o mecanismo de ação das toxinas são diferentes, visto que a *L. achelous* possui toxinas pró-coagulantes e anticoagulantes.

As atividades coagulantes conhecidas do extrato de *Lonomia achelous* são compostas por ativadores de protrombina (conhecido como Lonomin III) e ativadores de FX (Lonomin IV), que ainda não foram totalmente caracterizados e também uma metaloproteinase ativadora de FV (Lonomin VI:a) (Arocha-Piñango; Guerrero, 2003; Guerrero, 1992; López; Arocha-Piñango, 2000).

Quanto à atividade anticoagulante descrita, há uma serino protease tipo uroquinase, conhecida como Lonomin I, e outra tipo calicreína (Lonomin VII) (Arocha-Pinango and Pepper, 1981), e um inibidor de FV (Lonomin VI:i) (López, Gil and Arocha-Piñango, 2000).

Há outras duas serino proteases denominadas Achelase I e II que possuem atividade fibrinolítica direta (Amarant *et al.*, 1991). O extrato de cerdas de *L. achelous* também contém uma protease que degrada FXIII e fibronectina (Lonomin V), que compromete a coagulação e agregação plaquetária. (Guerrero *et al.*, 1999; Lucena *et al.*, 2008). Há também uma

toxina denominada Lonomin II responsável por degradar a cadeia α de fibrinogênio rapidamente, gerando fragmentos distintos dos fragmentos gerados pela plasmina e tripsina,

O extrato de cerdas de *L. achelous* é capaz de causar atividade fibrinolítica primária, bem como a formação de trombina intravascular (Arocha-Piñango and Guerrero, 2002).

1.5. O soro antilonômico

Em 1989 foram registrados os primeiros casos de acidentes com *L. obliqua* no sul do Brasil, que logo tomou proporções epidêmicas (Kelen; Picarelli; Duarte 1995). O aumento dos acidentes provavelmente foi devido a algum desequilíbrio ecológico, como por exemplo, a diminuição ou extinção de algum inimigo natural, além do desmatamento crescente (Moraes, 2002).

Na década de 1980, o tratamento para envenenamento por *Lonomia* consistia na administração de concentrado de hemácias, crioprecipitado, sangue total e antifibrinolíticos, tais como aprotinina e épsilon amino capróico (Guerrero *et al.*, 2001). No entanto, esse tratamento pode provocar o agravamento do envenenamento, pois fornece mais fatores de coagulação sem a neutralização das toxinas na corrente sanguínea. No caso do envenenamento experimental por *L. obliqua*, foi verificado que a administração de antifibrinolíticos na fase inicial do envenenamento pode causar o aumento na letalidade (Gonçalves *et al.*, 2007).

Por conseguinte, no ano de 1994 o Instituto Butantan produziu o soro antilonômico, que consiste em frações $F(ab')_2$ de imunoglobulinas específicas obtidas de plasma de cavalos hiperimunizados com extrato de cerdas de *L. obliqua* (Dias Da Silva *et al.*, 1996).

Desde a produção do soro antilonômico e sua utilização como tratamento, houve diminuição do número de complicações e óbitos, comprovando sua eficácia em neutralizar os efeitos do envenenamento (Fan and Duarte, 2003).

Há também registro de casos de envenenamento por outras espécies do gênero *Lonomia* em diversos países da América do Sul, como Colômbia, Peru e Guiana Francesa, em que o soro antilonômico produzido no Brasil foi administrado empiricamente e os pacientes se recuperaram. Assim como há outros que foram a óbito, provavelmente pela gravidade do envenenamento (Pineda *et al.*, 2001; Peña-Vásquez *et al.*, 2016; Mayence *et al.*, 2018)

1.6. A lagarta *Lonomia descimoni*



Figura 6. Lagarta *Lonomia descimoni* (Foto de Giovanni Randazzo)

A *L. descimoni* (Figura 6) foi primeiramente descrita por Lemaire e pode ser encontrada na região da Floresta Amazônica, na Venezuela, Guiana Francesa, Colômbia, Equador, Peru e no Brasil essa lagarta pode ser encontrada no estado do Pará (Lemaire, 2002). Contudo, não há caracterização biológica do extrato de cerdas desta espécie nem há qualquer registro de contato acidental.

Recentemente, foram descritas duas lagartas do gênero *Lonomia* com potencial importância médica, são elas a *L. casanarensis* e a *L. orientoandensis*, encontradas na Floresta Amazônica da Colômbia. Os animais injetados com o extrato de cerdas destas espécies apresentaram plaquetopenia, hipofibrinogenemia e alteração do TC duas horas após o envenenamento (Sano-Martins *et al.*, 2018).

A lagarta *L. descimoni* faz parte de um gênero de importância médica. As colônias desta espécie foram coletadas na região da Floresta Amazônica colombiana, local onde também foi descrito a presença de *L. achelous*, *L. casenarensis* e *L. orientoandensis*. Além de ser uma das lagartas que habitam a região Norte do Brasil, onde também há relatos de acidentes com o gênero *Lonomia* (Santos *et al.*, 2017). Por isso, é necessário um estudo a respeito da composição destas toxinas e suas implicações aos humanos, pois com o aumento do desmatamento a tendência é que aumente o contato acidental de humanos com animais peçonhentos.

Além disso, é importante avaliar se o soro antilonômico produzido pelo Instituto Butantan é capaz de reconhecer e neutralizar as atividades biológicas do extrato de cerdas dessa espécie, porque caso não seja capaz, seria necessário adicionar o extrato de cerdas da lagarta *L. descimoni* no pool de antígenos utilizado para produção do soro antilonômico.

2. Objetivos

2.1. Objetivos Gerais

Determinar as atividades biológicas que o extrato de cerdas de *Lonomia descimoni* possui comparativamente com as atividades descritas no extrato de cerdas de *Lonomia obliqua* e avaliar o poder neutralizante do antiveneno.

2.2. Objetivos específicos

- ✓ Fazer a caracterização biológica do extrato de cerdas de *Lonomia descimoni* em comparativo com as atividades descritas no extrato de cerdas de *L. obliqua*;
- ✓ Avaliar se o soro antilonômico é capaz de reconhecer e neutralizar as toxinas presentes no extrato de cerdas de *L. descimoni in vitro* e *in vivo*.

3. Material e métodos

3.1. Extrato de cerdas das lagartas do gênero *Lonomia*

Para o estudo da caracterização biológica do extrato de cerdas de *L. descimoni*, utilizamos o extrato de cerdas de *L. obliqua* como um controle e um comparativo, pois essa espécie possui suas atividades biológicas bem descritas.

Foram coletadas várias colônias de lagartas *L. descimoni* próximo ao município de Tanimboca, Villa Eliana e Aguilas del viento, na Colômbia, durante o mês de Setembro de 2015. Os extratos foram preparados por nossos colaboradores da Universidad de Los Andes logo após as coletas nesses municípios e mantidos congelados até o momento de transporte.

O pool do extrato de cerdas de ambas as espécies foi preparado de acordo com Dias Da Silva et al. (1996) representado na Figura 7. As lagartas foram anestesiadas com CO₂ e as espículas foram cortadas na base do tegumento. Em seguida, foi feito um macerado que foi preparado a 10 % (m/v) em PBS pH 7,4 e foi centrifugado a 2100 g por 10 minutos a 4°C. O extrato de cerdas foi transportado congelado até o Instituto Butantan e mantido a – 80 °C até o momento de uso.

Determinamos a quantidade de proteína e atividade coagulante de todos os lotes individualmente, mas utilizamos apenas o lote vindo de Villa Eliana para determinar as demais atividades por ser o extrato com maior atividade coagulante. O extrato de cerdas de *L. obliqua* foi fornecido pelo Instituto Butantan (Lote: 036, 081 e 022). Todas as lagartas coletadas estavam em colônias com 50 a 100 indivíduos e entre o 5º e o 6º instar do desenvolvimento larval.



Figura 7. Preparação do extrato de cerdas de *Lonomia* (Fotos de Letícia Delphino/Instituto Butantan)

3.2. Soro antilonômico

O soro antilonômico utilizado é composto por frações $F(ab')_2$ de imunoglobulinas específicas obtidas de plasma de cavalos hiperimunizados com extrato de cerdas de *L. obliqua* (Lote:1304060). O antiveneno foi fornecido pelo Instituto Butantan, sendo que, cada frasco-ampola de antiveneno contém 10 mL, que neutralizam no mínimo 3,5 mg de extrato de cerdas de *L. obliqua* (soroneutralização em camundongos Balb-C).

3.3. Dosagem de proteína

Nos casos em que o extrato apresentou algum resíduo, centrifugamos a 2000 g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi separado

e utilizado para o procedimento. A dosagem de proteína dos extratos foi feita pelo método colorimétrico do ácido bicinconínico (BCA) (Smith et al., 1985), utilizando como padrão a albumina bovina, partindo da concentração de 2 mg/mL até a concentração 0,031 mg/mL, mantendo razão de dois. Em uma placa de 96 poços adicionamos em triplicata 10 µL do extrato (diluído 1:10) e padrão em diferentes poços e, em seguida, adicionamos 200 µL de mistura reativa de ácido bicinconínico e CuSO₄. A placa foi aquecida em micro-ondas por 25 segundos na presença de um erlenmeyer contendo 200mL de água destilada. Depois a placa foi mantida a 37°C por 5 minutos em placa aquecedora. A leitura foi feita em leitor de placa da marca ThermoScientific (modelo Multiskan EX) com absorvância de 570 nm. A curva padrão foi feita no software Curve Expert 1.4. A quantidade de proteína determinada nessa metodologia foi utilizada nas demais metodologias para determinar as concentrações e doses de veneno utilizadas.

3.4. Determinação da dose mínima coagulante

A dose mínima coagulante (DMC) corresponde à menor concentração de proteína do extrato que coagula o plasma em 60 segundos.

A DMC foi determinada seguindo a metodologia de Theakston & Reid (1983). Resumidamente, o extrato de cerdas de *L. obliqua* e *L. descimoni* foi diluído em razão de 2 com solução salina e em seguida, 300 µL desse extrato diluído foi adicionado a 300 µL de CaCl₂ 25 mM. No coagulômetro foram incubados 100 µL de plasma de rato citratado por 2 minutos a 37 °C, depois foi adicionado 100 µL de extrato diluído com solução salina e CaCl₂ 25 mM e o TC foi cronometrado. O teste foi feito em triplicata no coagulômetro Start Diagnostica Stago (França). A DMC foi obtida em uma curva de dose-resposta feita no software Instat 3, sendo que no eixo X está a concentração do extrato de cerdas em Log e no eixo Y está o tempo de coagulação em segundos.

3.5. Determinação da dose eficaz de antiveneno

A dose eficaz (DE) é a razão de μL de soro/mg de extrato em que o tempo de coagulação corresponde a três vezes o tempo de coagulação do plasma com extrato e sem soro.

Este procedimento foi feito conforme o protocolo de Gené et al. (1989). A concentração de extrato foi o equivalente a 2xDMC e foram feitas diluições do soro antilonômico correspondentes à: 1000, 500, 250, 125, 62,5 e 31,2 μL de soro/ mg de extrato, esta mistura foi incubada por 30 minutos a 37° C. Nas cubetas foram pipetados 100 μL de plasma, 50 μL da mistura de extrato com soro e 50 μL de CaCl_2 25 mM e o tempo de coagulação foi determinado em coagulômetro Start Diagnostica Stago (França). A curva de dose-resposta foi feita no software Instat 3.

3.6. Determinação da atividade fosfolipásica

A atividade fosfolipásica foi determinada pelo método de Holzer & Mackessy (1996). Primeiro os extratos foram diluídos a 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteína em solução salina 150 mM. Em seguida, foram pipetados em uma placa de 96 poços 20 μL dos extratos de cerdas diluído, 20 μL do substrato para fosfolipase ([4nitro-3(octanoyloxy) benzoicacid] 3 mM) e 100 μL da solução tampão (Tris 10 mM, CaCl_2 10 mM, NaCl100mM, pH 8,0). Como branco foi utilizado salina no lugar da amostra. Em seguida a placa foi homogeneizada e incubada a 37 °C por 1 hora. Passado o tempo, a reação foi bloqueada com Triton X-100 2,5%. A leitura foi feita em leitor de placa da marca ThermoScientific (modelo Multiskan EX) em absorvância de 425 nm. A atividade específica é dada através da seguinte equação:

$$\text{nmoles/min/mg de veneno} = \frac{\text{D.O.} \times 25,8}{\text{Concentração do veneno}}$$

3.7. Determinação da atividade hialuronidásica

A atividade hialuronidásica foi determinada pelo método de Pukrittayakamee et al., 1988. Primeiramente foi feita uma curva com os extratos de cerdas partindo da concentração 2 mg/mL até 0,25 mg/mL em tampão acetato (acetato de sódio 0,2 M com NaCl 0,15 M, pH 6,0 – pH corrigido com ácido acético concentrado). Em uma placa de 96 poços foi pipetado em triplicata 10 µL do extrato diluído e 40 µL de solução de ácido hialurônico 0,5 mg/mL, a placa foi incubada por 15 minutos a 37°C e em seguida a reação foi parada com a adição de 150 µL de CTAB (2,5 % de CTAB em NaOH 2%). Como branco foram pipetados 50 µL de tampão acetato e 150 µL de CTAB. Como controle de 100% de turbidez foi utilizado 10 µL de tampão acetato, 40 µL de ácido hialurônico e 150 µL de CTAB. A leitura foi feita em leitor de placa da marca ThermoScientific (modelo Multiskan EX) em 400 nm de absorvância. A atividade hialuronidásica foi expressa como a quantidade de veneno necessária para hidrolisar 50% do ácido hialurônico, então expressa como unidades redutoras de turbidez (URT).

3.8. Determinação da atividade fibrinolítica

Foi feito 10 mL de uma solução de fibrinogênio humano livre de plasminogênio (3 g/L, Calbiochem - Alemanha) em tampão Tris-HCl (0,05 M, pH 7,3 contendo NaCl 0,2 M e CaCl₂ 0,05 M). Em seguida, 40 µL de trombina bovina (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) na concentração de 2 U/mL e 10 mL de uma solução pré-aquecida de agarose *low melting* 2% (ThermoFisher, Estados Unidos) diluída também em tampão Tris-HCl, foram adicionadas a solução de fibrinogênio. Essa mistura foi homogeneizada e colocada em uma placa de petri 9,0 x 1,5 cm lisa contendo 500 µL de CaCl₂ 1 M, que foi mantida em temperatura ambiente por 1 hora até a solidificação. Na placa de fibrina-agarose, foram feitos poços para a aplicação de diferentes concentrações de extrato de *L. descimoni* e *L. oblíqua* (50, 25 e 10 µg em 20 µL de salina 0,085 %). Como controle negativo foi usada solução salina

0,85% e como controle positivo foi utilizado o veneno de *Bothrops atrox* na concentração de 10 µg. A placa foi incubada em câmara úmida durante 24 horas a 37 °C. O halo de lise foi mensurado em mm². (Jespersen & Astrup 1983).

3.9. Eletroforese e Western Blotting

Primeiramente, os extratos de *L. obliqua* e *L. descimoni* foram diluídos a 20 µg. As amostras foram preparadas em condições redutoras (com 2-mercaptoetanol) e não redutoras (sem 2-mercaptoetanol). Sendo que apenas a amostra reduzida foi fervida por 7 minutos a 95°C. As amostras foram submetidas a eletroforese SDS-PAGE em gel de corrida com 12 % de acrilamida e gel de aplicação com 5 % de acrilamida. A corrida foi feita em sistema MightSmall II SE250/SE260 com 30 mA no gel de aplicação e 60 mA no gel de corrida. Um dos géis foi corado com Comassie Blue e o outro gel foi utilizado para Western Blotting.

A transferência para a membrana de nitrocelulose foi feita em cuba de transferência semi-seca (BioRad) a 15 Volts por 2 horas. Em seguida a membrana foi bloqueada com leite desnatado 0,5% em tampão de lavagem (PBS pH 7,4; Tween 20 0,5%) por 1 hora em temperatura ambiente (T.A.) sob agitação constante e logo em seguida foram lavadas com tampão de lavagem (3 vezes de 5 minutos sob agitação constante). Após o bloqueio e as lavagens, a membrana foi incubada *overnight* a 4°C com soro antilonômico diluído 1:5000, depois lavada novamente e incubada por 2 horas em T.A. sob agitação constante com IgG de coelho “anti-horse” (Sigma Aldrich) diluído 1:1000. A reação foi revelada com o substrato cromógeno [Imidazol 0,1 M pH 7,0, CoCl₂ 0,2 M, H₂O₂ 30% e 3,3’ diaminobenzidina(tetra-hidrocloro) 5 mg] e interrompida lavando membrana em água corrente (Harlow 1988).

3.10. Titulação de anticorpo

Para este ensaio foi utilizado o método de ELISA direto. Primeiramente placas Nunc Maxisorp foram sensibilizadas com 100 µL de extrato de cerdas na concentração de 10 µg/mL diluído em tampão carbonato (Na_2CO_3 15 mM, NaHCO_3 35 mM, pH 9,6) e incubada overnight a 4°C em câmara úmida. Em seguida a placa foi lavada 3 vezes por 5 minutos com tampão de lavagem (PBS pH 7,4 e Tween 20 0,05%) e bloqueada com BSA 3% diluído em tampão carbonato pH 9,6. Depois disso, a placa foi lavada novamente com tampão de lavagem como descrito anteriormente e, logo em seguida, foi adicionado o soro antilonômico (100 µL/poço) partindo da diluição 1:1000 até 1:2048000, mantendo razão de dois. O soro foi incubado por 1 hora a 37°C em câmara úmida. Após a incubação e as lavagens (3 vezes por 5 minutos), foi adicionado a IgG de coelho “anti-horse” (Sigma Aldrich) diluído 1:10000 (100 µL/poço). Por final, foi adicionado 100µL de substrato cromogênico (10 mg de OPD diluído em 10 mL tampão citrato pH 5,0) e após 5 minutos a reação foi interrompida com 50 µL/poço de H_2SO_4 30%. A leitura foi feita a 492 nm em leitor de placa da marca ThermoScientific (modelo Multiskan EX).

3.11. Animais de laboratório

Foram utilizados Ratos Wistar machos com peso entre 250 g a 300 g provenientes do Biotério Central do Instituto Butantan (CEUAIB n°6021261016). Durante todo o procedimento os animais tiveram acesso irrestrito a comida e água.

3.12. Coleta de amostra de sangue em ratos

Após os ensaios de envenenamento, os animais foram anestesiados via inalatória com isoflurano (Cristália, São Paulo) e o sangue foi coletado pela aorta abdominal com seringas plásticas de 10 mL. Após a coleta os animais foram imediatamente eutanasiados por deslocamento cervical.

Uma parte do sangue coletado foi distribuído em eppendorfs contendo 10 µL de EDTA 10% para hemograma em contador de células (Mindray BC-2800VET). Para neutralizar a ação do extrato no sangue foram adicionados 10 µL de soro antilonômico para cada mL de sangue.

Outra parte foi distribuída em tubos falcon contendo citrato de sódio 4,7% (1 parte de anticoagulante para 9 partes de sangue) com soro antilonômico na mesma proporção citada anteriormente. Este tubo foi centrifugado a 2000 g por 15 minutos a 4° C para obtenção de plasma. Em seguida, o plasma foi aliquoteado e congelado para dosar fibrinogênio.

3.13. Determinação da atividade desfibrinogenante

Este procedimento foi feito de acordo com Dias Da Silva et al. (1996). A dose mínima desfibrinogenante (DMD) é a menor dose de extrato que incoagulabiliza o sangue do rato em até 2h de envenenamento.

Para determinar essa dose foram utilizados 3 ratos Wistar para cada dose de extrato de *L. descimoni* a ser testada (12,5; 25 e 50 µg/rato). Essas doses de extrato de *L. descimoni* foram injetadas pela via intravenosa e após 1 hora o sangue destes animais foi coletado. Para testar o envenenamento pela via intradérmica, utilizamos 150 µg/rato (n=3) e o sangue foi coletado após 2 horas.

No momento da coleta, foi determinado o tempo de coagulação (TC). Para tanto, 1 mL de amostra de sangue foi colocado em um tubo de ensaio de vidro e mantido a 37 °C. A coagulabilidade do sangue foi verificada em intervalos de 1 minuto, o sangue que não coagulou em até 10 minutos foi considerado incoagulável (Theakston and Reid, 1983; Gené *et al.*, 1989).

3.14. Determinação do nível de fibrinogênio plasmático

A metodologia usada foi desenvolvida por Ratnoff and Menzie (1951). Primeiramente foi feito uma curva padrão de tirosina com concentrações a partir de 0,0125 até 0,125 mg de tirosina em tubos falcon

de 45 mL, em seguida foram adicionados 7 mL de água destilada, 250 µL de NaOH 10%, 750 µL de Na₂CO₃ 20% e 250 µL de reagente fenólico (Sigma), respectivamente. Após 30 minutos foi feita a leitura a 650nm em espectrofotômetro da marca Ultrospec (modelo 2100).

Para a dosagem de fibrinogênio do plasma dos ratos também foram utilizados tubos falcon de 45 mL. Onde foram colocados 0,5 mL de vidro moído, 500 µL de plasma, 10 mL de salina e 69 µL de trombina (720U). Esta mistura ficou em repouso por 15 minutos a 37°C para a formação do coágulo. Após este tempo, foi centrifugado a 1800 g por 5 minutos em temperatura ambiente e o coágulo foi espremido e lavado 2 vezes com 10 mL de salina. Após as lavagens, o sobrenadante foi descartado e 1mL de NaOH 10% foi adicionado, os tubos foram levados ao banho-maria fervente por 10 minutos. Após o tempo determinado os tubos foram retirados e depois que esfriaram foi adicionado 7 mL de água destilada, 3 mL de Na₂CO₃ 20%, e 1 mL de reagente fenólico. Em um tubo de 45 mL foi feito o branco, pipetando 7 mL de água destilada, 1 mL de NaOH 10%, 3 mL Na₂CO₃ 20% e 1 mL de reagente fenólico. Após 30 minutos, a leitura foi feita em espectrofotômetro da marca Ultrospec (modelo 2100) a 650nm.

3.15. Análise Estatística

Quando necessário, os resultados foram expressos como média ± desvio padrão. Diferenças entre as espécies nos ensaios de caracterização biológica foram comparadas utilizando a distribuição gaussiana seguida pelo teste t pareado. Para as análises de envenenamento experimental utilizamos a análise de variância ANOVA de uma via seguida pelo teste Tukey. Foram considerados significantes os resultados com $p < 0,05$. As análises estatísticas foram feitas no software GraphPad InStat versão 3.01. Os gráficos foram feitos no GraphPad Prisma versão 5.03.

4. Resultados

4.1. Dosagem de proteína dos extratos

Com base em nosso resultado apresentado na Figura 8, podemos afirmar que a quantidade de proteína encontrada no pool de *L. descimoni* (2.50 ± 0.24) é significativamente menor quando comparado com a quantidade de proteína encontrada no pool de *L. obliqua* (3.24 ± 0.39).

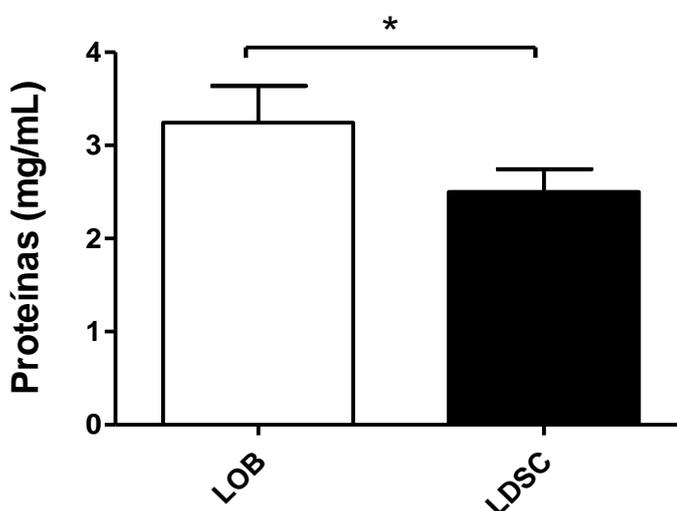


Figura 8. Quantidade de proteína dos extratos de cerdas de *L. obliqua* (LOB) e *L. descimoni* (LDSC) determinados por BCA em triplicata. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão. Diferença estatística significativa para $p < 0,05$ * entre o extrato de cerdas de LOB e LDSC.

4.2. Determinação da dose mínima coagulante e da dose eficaz

Na Figura 9 podemos observar que foi preciso uma concentração muito menor de proteínas do extrato de cerdas de *L. obliqua* ($0,5 \pm 0,02$) para coagular o plasma em 60 segundos enquanto que precisou de uma concentração quatro vezes maior do extrato de cerdas de *L. descimoni*

(11,25±0,03) para coagular o plasma no mesmo tempo. Assim, o extrato de *L. obliqua* é mais coagulante que o extrato de *L. descimoni*.

Após a determinação da atividade coagulante dos extratos de cerdas de *L. obliqua* e *L. descimoni*, utilizamos o lote que possuía maior atividade coagulante para os demais ensaios de atividades.

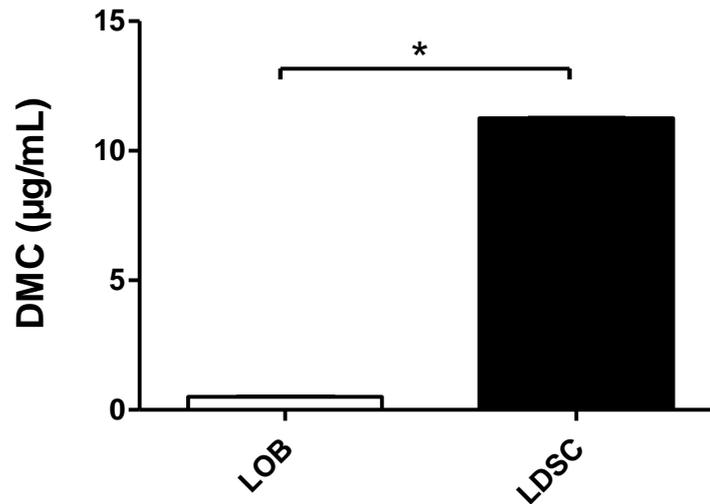


Figura 9. Dose mínima coagulante dos extratos de cerdas de *L. obliqua* (LOB) e *L. descimoni* (LDSC) expressa em µg/mL. O ensaio foi feito em triplicata e os dados estão expressos em média ± desvio padrão. Diferença estatística significativa para $p < 0,0001^*$ entre o extrato de cerdas de LOB e LDSC.

Na Figura 10 podemos observar que a DE foi menor para *L. descimoni* (66,6±6,24) do que *L. obliqua* (76,5±7,27), corroborando os dados de DMC, visto que o extrato de *L. descimoni* possui atividade coagulante reduzida, também é necessário uma menor quantidade de soro para neutralizar essa atividade.

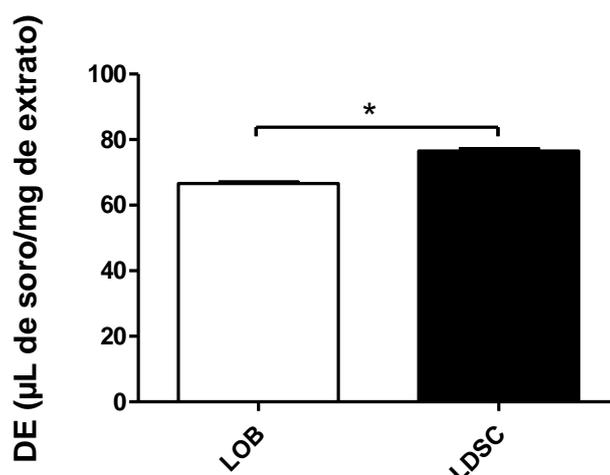


Figura 10. Dose eficaz (DE) dos extratos de cerdas de *L. obliqua* (LOB) e *L. descimoni* (LDSC) expressa em µL de soro/mg de extrato. O ensaio foi feito em triplicata e os dados estão expressos em média ± desvio padrão. Diferença estatística significativa para $p < 0,0001^*$ entre o extrato de cerdas de LOB e LDSC.

4.3. Determinação da atividade fosfolipásica

O extrato de cerdas de *L. descimoni* ($103,2 \pm 7,27$) apresentou quase metade da atividade fosfolipásica de *L. obliqua* ($58,3 \pm 6,24$), conforme o apresentado na Figura 11, confirmando assim que possui atividade fosfolipásica significativamente reduzida.

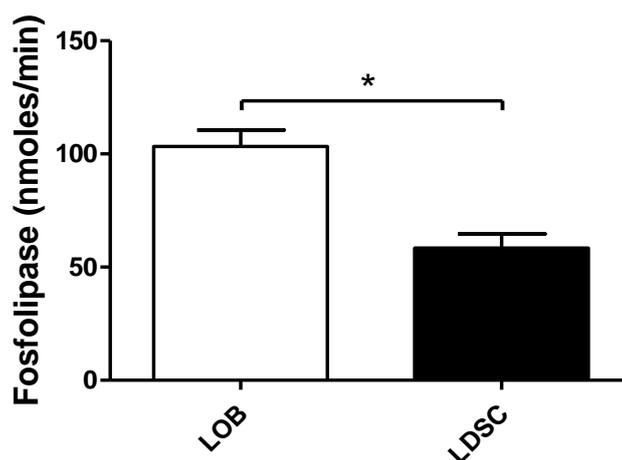


Figura 11. Atividade fosfolipásica dos extratos de cerdas de *L. obliqua* (LOB) e *L. descimoni* (LDSC) na concentração de 5 µg/mL. A leitura foi feita após 1 hora de incubação a 37°C. . O ensaio foi feito em triplicata e os dados estão expressos em média ± desvio padrão. Diferença estatística significativa para $p < 0,05^*$ entre o extrato de cerdas de LOB e LDSC.

4.4. Determinação da atividade hialuronidásica

O extrato de cerdas de *L. descimoni* possui atividade hialuronidásica reduzida ($6.60 \pm 0,10$), pois é necessário uma quantidade cerca de 3 vezes maior que o extrato de *L. obliqua* ($21,89 \pm 0,20$) para hidrolisar 50 % de ácido hialurônico. Como podemos observar na Figura 12.

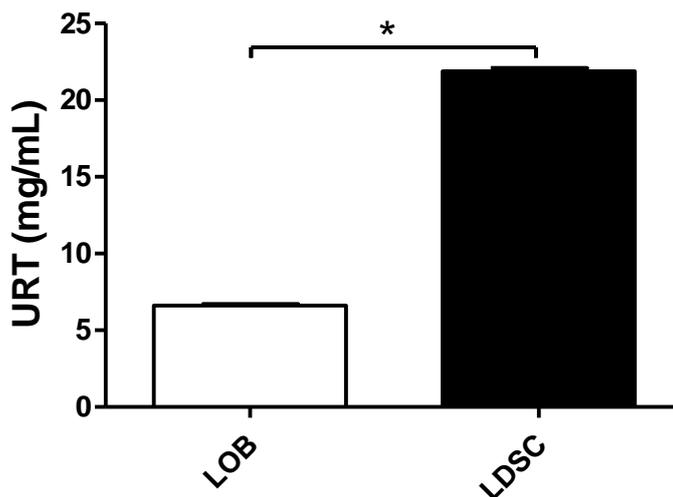


Figura 12. Atividade hialuronidásica dos extratos de cerdas de *L. obliqua* (LOB) e *L. descimoni* (LDSC) expressa com quantidade de extrato necessária para hidrolisar 50 % do ácido hialurônico, então expressa como unidades redutoras de turbidez (URT). O ensaio foi feito em triplicata e os dados estão expressos em média \pm desvio padrão. Diferença estatística significativa para $p < 0,0001^*$ entre o extrato de cerdas de LOB e LDSC.

4.5. Determinação da atividade fibrinolítica

Como mostra na Figura 13, o extrato de cerdas de *L. descimoni* não possui atividade fibrinolítica, visto que não houve diferença estatística significativa entre o extrato dessa espécie em relação ao controle negativo. Entretanto, o extrato de *L. obliqua* na concentração de 50 μ g apresentou diferença estatística significativa quando comparada com o controle negativo.

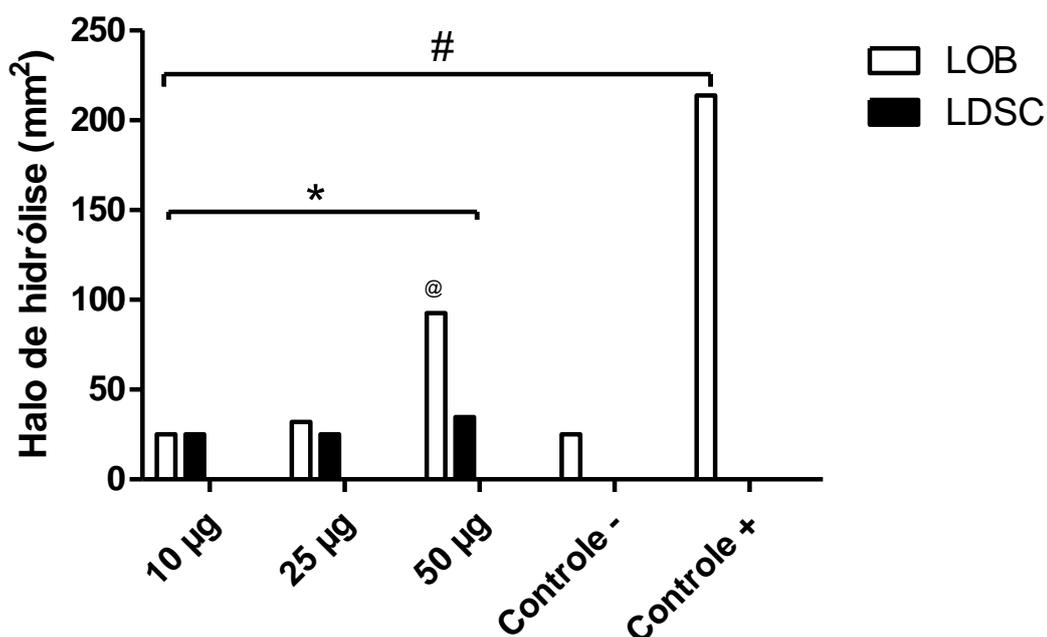


Figura 13. A atividade fibrinolítica do veneno de *L. obliqua* (LOB) (n=5) e *L. descimoni* (LDSC) (n=5) foi mensurada medindo os halos de hidrólise em placas de fibrina-agarose. Foi utilizado como controle negativo solução salina 0,85 % e como controle positivo utilizamos 10 µg de veneno de *Bothrops atrox*. Os dados estão expressos em média ± desvio padrão. Diferença estatística significativa para $p < 0,0001$ * em relação a LOB 50 µg, # em relação ao controle positivo, @ em relação ao controle negativo.

4.6. Eletroforese e Western Blotting

Podemos observar na Figura 14 que o perfil proteico das espécies do gênero *Lonomia* são bastante parecidos. O extrato de cerdas de *L. descimoni* apresentou um perfil proteico diferente apenas na região de baixa massa.

Houve neutralização cruzada, ou seja, o soro antilonômico foi capaz de reconhecer as proteínas presentes no extrato de cerdas de *L. descimoni*, confirmando assim a similaridade do perfil proteico entre as espécies.

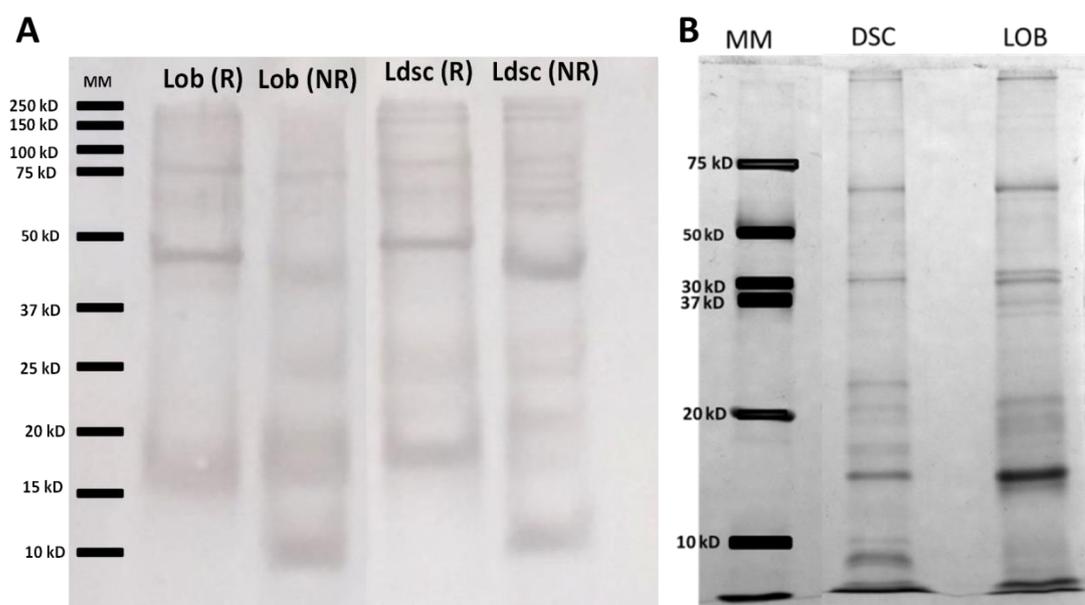


Figura 14. Perfil proteico e capacidade de reconhecimento do soro antilonômico. A) Western blotting do extrato de cerdas de *L. obliqua* (LOB) e *L. descimoni* (LDSC) (20 µg de proteína de cada extrato) em membrana de nitrocelulose. Incubado primeiro com antiveneno e subsequentemente incubado com IgG anti-horse conjugado com peroxidase. B) Gel de eletroforese em SDS-Page a 12% com 20 µg de proteína do extrato de cerdas de *L. obliqua* (LOB) e *L. descimoni* (LDSC) na forma não reduzida e corado com Comassie Blue. MM: marcadores moleculares de massa; NR: não reduzido; R: reduzido; Lob: *L. obliqua* e Ldsc: *L. descimoni*.

4.7. Titulação de anticorpo

Para quantificar antígenos que as imunoglobulinas presentes no soro seriam capazes de reconhecer no extrato de cerdas de cada espécie, foi feita a titulação de anticorpos pelo método de ELISA.

Na Tabela 2 podemos observar a titulação de anticorpos para cada espécie, demonstrando que o antiveneno reconheceu as proteínas do extrato de cerdas de *L. descimoni*. Esses dados corroboram os resultados obtidos no Western Blotting onde foi comprovada a reação cruzada do soro com os antígenos destas espécies. Tendo em conta que o extrato de cerdas de *L. obliqua* é utilizado como antígeno para a produção do antiveneno, a titulação de anticorpos para esta espécie foi maior quando comparado com a titulação de *L. descimoni*. Porém, não houve diferença estatística significativa entre a titulação de anticorpos desses extratos.

Tabela 2 – Titulação de anticorpos pelo método de ELISA utilizando como antígenos os extratos de cerdas de *L. obliqua* e *L. descimoni* na concentração de 10 µg/mL.

Espécies	Titulação de anticorpo
<i>L. obliqua</i>	1:1 024 000
<i>L. descimoni</i>	1:512 000

4.8. Determinação da dose mínima desfibrinogente

Para determinar essa dose, ratos foram separados em grupos (n=3) e cada grupo foi injetado com uma dose de extrato de cerdas de *L. descimoni* via intradérmica. Porém, nenhum dos animais dos diferentes grupos e doses desenvolveu os sinais e sintomas do envenenamento. Portanto, utilizamos as mesmas doses citadas anteriormente pela via intravenosa. Como podemos observar na Figura 15, por esta via a DMD foi de 50 µg/animal. Os animais injetados com 50 µg/animal apresentaram incoagulabilidade sanguínea e hemoglobinúria 1 hora após a inoculação, enquanto que os grupos injetados com as demais doses não apresentaram sinais de envenenamento.

Determinado isto, injetamos 3xDMD (150 µg/animal) via intradérmica em 3 ratos e mesmo após 2 horas da inoculação, estes animais não apresentaram nenhuma alteração. Na Figura 15 podemos observar que os dados de hemoglobina, hematócrito, eritrócitos, leucócitos, fibrinogênio e plaquetas, não apresentaram alteração significativa no grupo em que o extrato foi injetado via intradérmica. Por outro lado, nos animais que inoculamos o extrato de cerdas via intravenosa observamos leucocitose e hipofibrinogenemia.

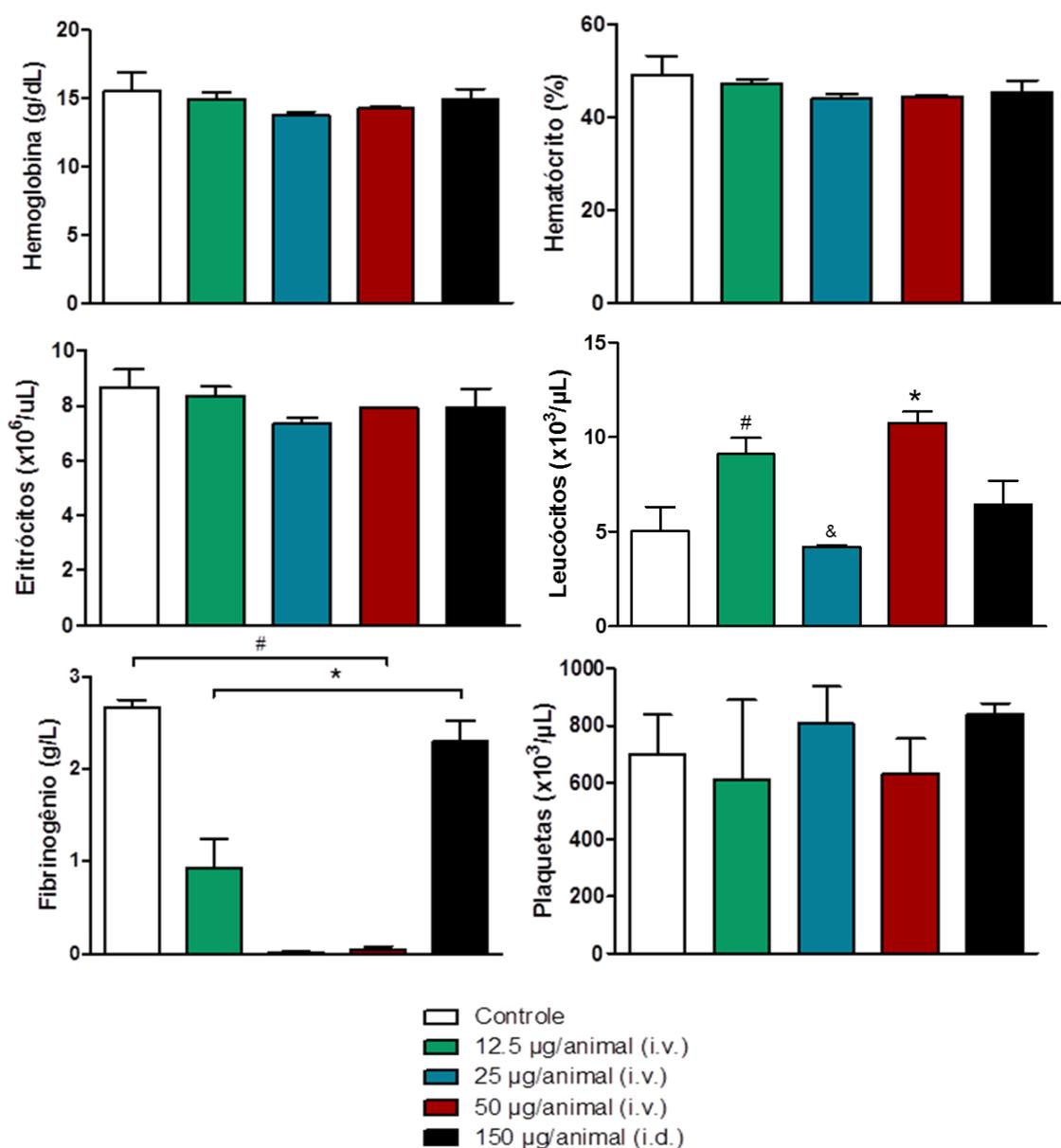


Figura 15. Dados hematológicos de animais envenenados com extrato de cerdas de *L. descimoni* com 12,5 μg/animal (n=3), 25 μg/animal (n=3), 50 μg/animal (n=3) via i.v., 150 μg/animal via i.d. (n=3), e os animais controle (n=3) em que nada foi injetado. O sangue foi coletado 1 hora após a inoculação do extrato, exceto os animais que foram injetados via intradérmica que foi coletado 2 horas depois. Os resultados são expressos em média ± erro padrão da média. Diferença estatística significativa para $p < 0,05$. * em relação ao grupo controle, & em relação ao grupo que foi injetado 50 μg/animal e # em relação a grupo que foi injetado 25 μg/animal.

5. Discussão

Esse é o primeiro estudo das atividades biológicas e de envenenamento experimental utilizando extrato de cerdas de *L. descimoni*. Utilizamos o extrato de cerdas de *L. obliqua* como um comparativo porque as atividades desse extrato já são bem descritas, e o mesmo é utilizado como antígeno para a produção do antiveneno. É de grande importância a compreensão das atividades biológicas do veneno de outras espécies do gênero, para avaliar os possíveis tratamentos em caso de acidentes com essa espécie, e também para avaliar a necessidade de incluir outras espécies do gênero no pool de antígenos para a produção de antiveneno.

Nossos resultados demonstram que há variação intraespecífica nas atividades biológicas dos extratos de cerdas de lagartas do gênero *Lonomia*. O extrato de cerdas de *L. descimoni* possui atividade coagulante, fosfolipásica e hialuronidásica significativamente menores quando comparado ao extrato de *L. obliqua*.

A eletroforese demonstrou que o perfil proteico das espécies *L. descimoni* e *L. obliqua* são semelhantes, com diferenças apenas na região de baixa massa. Além disso, o extrato de cerdas de *L. descimoni* possui menor quantidade de proteína. Nos ensaios de envenenamento experimental utilizamos a mesma concentração de proteína para extratos de cerdas de *L. obliqua* e *L. descimoni*. Todavia, nos casos de contatos acidentais com *L. descimoni*, essa espécie de lagarta possivelmente inocularia menor quantidade de toxinas ao ser pressionada, devido à menor quantidade de proteína presente nesse extrato de cerdas,

Como o veneno utilizado neste estudo é feito de um macerado de cerdas e não é liofilizado, possivelmente há diversos interferentes nessa amostra. Por isso a metodologia de BCA foi escolhida para determinar a quantidade de proteína desses venenos. Apesar de usar o mesmo princípio da técnica de Lowry, o método de BCA é mais sensível e mais tolerante com substâncias interferentes nas demais metodologias de dosagem de proteína. (Smith *et al.*, 1985).

No envenenamento experimental, o extrato de cerdas de *L. descimoni* não foi capaz de causar coagulopatia quando injetado pela via intradérmica, mas quando injetado pela via intravenosa os animais desenvolveram incoagulabilidade sanguínea e hemoglobinúria. Provavelmente porque o extrato possui uma menor atividade hialuronidásica. A hialuronidase é uma enzima que já foi descrita no extrato de cerdas de *L. obliqua* (Gouveia *et al.*, 2005), e é conhecida por ser uma facilitadora de difusão de líquidos injetáveis. Ela atua aumentando a velocidade de absorção (Ogston and Shermant, 1961) e despolimerizando reversivelmente o ácido hialurônico ao redor das células do tecido conjuntivo, reduzindo a viscosidade do tecido (Day T. D., 1950).

A atividade fosfolipásica da *L. descimoni* também demonstrou ser significativamente reduzida do que o extrato de *L. obliqua*. As cerdas das lagartas *L. obliqua* possuem uma toxina semelhante a fosfolipase A₂, que é responsável pela atividade hemolítica desta espécie (Seibert *et al.*, 2006). Nossos resultados de envenenamento experimental demonstram que os ratos que foram envenenados por via intravenosa e intradérmica não apresentaram hemólise, provavelmente devido a baixa atividade fosfolipásica encontrada no extrato de *L. descimoni*. Apesar da baixa atividade coagulante *in vitro*, quando o extrato de *L. descimoni* foi injetado pela via intravenosa em ratos causou hipofibrinogenemia. O extrato de *L. obliqua* possui toxinas pró-coagulantes que ativam FII e FX. Essas toxinas ativam a cascata de coagulação levando a um rápido consumo de fibrinogênio e fibrina (Reis *et al.*, 1999; Alvarez Flores *et al.*, 2006).

Nossos resultados de atividade fibrinolítica corroboram os dados de Amarant *et al.* (1991) que descreveu uma toxina com atividade fibrinolítica e fibrinogenolítica chamada Lonofibrase no extrato de *L. obliqua*. O extrato de cerdas desta espécie foi capaz de hidrolisar a fibrina somente em altas doses demonstrando que o extrato de fato possui atividade fibrinolítica. O extrato de cerdas de *L. descimoni* demonstrou não ter atividade fibrinolítica. Portanto, o consumo de fibrinogênio apresentado no envenenamento

experimental ocorreu secundariamente, devido a ativação da cascata de coagulação.

Além dos ensaios de atividade biológica e envenenamento experimental, avaliamos qualitativamente e quantitativamente a capacidade do soro antilonômico em reconhecer as toxinas do extrato de cerdas de *L. descimoni*. O Western Blotting demonstrou que o antiveneno foi capaz de reconhecer as proteínas presentes no extrato de cerdas de *L. descimoni* e isso foi confirmado quantitativamente pela titulação de anticorpos.

Para avaliar a capacidade do soro antilonômico em neutralizar a atividade coagulante dos extratos de cerdas de *L. obliqua* e *L. descimoni*, determinamos a dose necessária para neutralizar a atividade coagulante *in vitro*. Neste ensaio demonstramos que o soro foi capaz de neutralizar a atividade coagulante de ambas as espécies, contudo, foi preciso uma dose menor do antiveneno para neutralizar a atividade coagulante do extrato de *L. descimoni*. A hipótese seria que o extrato de *L. descimoni* possui menor quantidade de toxinas pró-coagulantes, visto que possui menor quantidade de proteína no pool. Consequentemente seria necessário uma menor quantidade de antiveneno para neutralizar essas toxinas.

Nossos dados de soroneutralização *in vitro* confirmam os resultados de um trabalho publicado recentemente no qual é demonstrado que o extrato de cerdas de *L. casanarensis* e *L. orientoandensis* são capazes de causar síndrome hemorrágica em ratos. As duas espécies causaram plaquetopenia, hipofibrinogenemia, hemólise e coagulopatia quando injetadas via intradérmica. Os animais envenenados neste estudo desenvolveram os sinais de envenenamento 2 horas após a inoculação via intradérmica. Por outro lado, os animais envenenados com extrato de cerdas de *L. obliqua* apresentaram os sinais de envenenamento 1 hora após a inoculação. Neste trabalho o soro antilonômico foi utilizado como tratamento e demonstrou ser eficaz em reconhecer e neutralizar as toxinas de *L. casanarensis* e *L. orientoandensis in vivo* (Sano-Martins *et al.*, 2018).

O conhecimento sobre o extrato de cerdas de lagartas do gênero *Lonomia* ainda é escasso. Apenas 5 das 12 espécies descritas por Lemaire

(2002) foram estudadas. Portanto não sabemos ao certo quantas espécies são capazes de causar a síndrome hemorrágica. Em casos de contato acidental, raramente o paciente leva o animal. Além do mais, é difícil identificar a espécie causadora do envenenamento, pois a identificação do gênero *Lonomia* é feita apenas pela genitália da lagarta macho por um entomologista, dificultando assim o diagnóstico do envenenamento (Lemaire, 2002).

6. Conclusão

Nas condições em que foi conduzido esse estudo, podemos concluir que o extrato de cerdas de *L. descimoni* possui atividades biológicas menos intensas quando comparada com extrato de *L. obliqua*, porém com potencial para causar envenenamento. Em adição a isto, podemos afirmar que o soro antilonômico foi capaz de reconhecer e neutralizar as proteínas presentes no extrato de cerdas de *L. descimoni in vitro*.

Referências bibliográficas

Alvarez Flores, M. P. *et al.* (2006) “Losac, a factor X activator from *Lonomia obliqua* bristle extract: Its role in the pathophysiological mechanisms and cell survival,” *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 343, pp. 1216–1223. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.03.068.

Amarant, T. *et al.* (1991) “Isolation and complete amino acid sequence of two fibrinolytic proteinases from the toxic Saturnid caterpillar *Lonomia achelous*,” *Biochimica et biophysica acta*, 1079, pp. 214–221. doi: 10.1016/0167-4838(91)90128-M.

Arocha-Piango, C. L., Marval, E. and Guerrero, B. (2000) “*Lonomia* genus caterpillar toxins: Biochemical aspects,” *Biochimie*, 82, pp. 937–942. doi: 10.1016/S0300-9084(00)01164-0.

Arocha-Piñango, C. L. and Guerrero, B. (2002) “*Lonomia* genus caterpillar envenomation: clinical and biological aspects,” *Haemostasis*, 31, pp. 288–293. doi: 10.1159/000048075.

Arocha-Piñango, C. L. and Guerrero, B. (2003) “Síndrome hemorrágico producido por contacto con orugas. Estudios clínicos y experimentales. Revisión,” *Investigacion Clinica*, 44(2), pp. 155–163.

Arocha-Piñango, C. L. and Layrisse, M. (1967) “Fibrinolysis produced by contact with a caterpillar,” *The Lancet*, 810(1966), pp. 1967–1969.

Arocha-Pinango, C. L. and Pepper, D. S. (1981) “Studies of a fibrinolytic enzyme from the larvae of *Lonomia achelous* (Cramer) using chromogenic peptide substrates,” *Thrombosis and Haemostasis*, 46(4), pp. 710–713.

Guerrero, B., Arocha-Piñango, C.L., (1992) “Activation of human Prothrombin by the venom of *Lonomia achelous* (Cramer) caterpillars,” *Thrombosis Research*, 66(c), pp. 169–177. A

Berger, M. *et al.* (2013) “Acute *Lonomia obliqua* caterpillar envenomation-induced physiopathological alterations in rats: Evidence of new toxic venom activities and the efficacy of serum therapy to counteract systemic tissue damage,” *Toxicon*. Elsevier Ltd, 74, pp. 179–192. doi: 10.1016/j.toxicon.2013.08.061.

Berger, M. *et al.* (2015) “Mechanisms of acute kidney injury induced by experimental *Lonomia obliqua* envenomation,” *Archives of Toxicology*, 89(3), pp. 459–483. doi: 10.1007/s00204-014-1264-0.

Berger, M. *et al.* (2019) “Renal and vascular effects of kallikrein inhibition in a model of *Lonomia obliqua* venom-induced acute kidney injury,” *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 13(2), pp. 1–28. doi: 10.1371/journal.pntd.0007197.

Bohrer, C. B. *et al.* (2007) “Kallikrein-kinin system activation by *Lonomia obliqua* caterpillar bristles: Involvement in edema and hypotension responses to envenomation,” *Toxicon*, 49, pp. 663–669. doi: 10.1016/j.toxicon.2006.11.005.

Carrijo-Carvalho, L. C. C.-T. and Chudzinski-Tavassi, A. M. (2007) “The venom of the *Lonomia* caterpillar: an overview,” *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*, 49(6), pp. 741–57. doi:

10.1016/j.toxicon.2006.11.033.

De Castro Bastos, L. *et al.*(2004) "Nociceptive and edematogenic responses elicited by a crude bristle extract of *Lonomia obliqua* caterpillars," *Toxicon*, 43(3), pp. 273–278. doi: 10.1016/j.toxicon.2003.12.003.

Day T. D. (1950) "Connective tissue permeability and the mode of action of hyaluronidase," *Nature*, 166(4227), pp. 785–786. doi: DAY, T. D. (1950). Connective Tissue Permeability and the Mode of Action of Hyaluronidase. *Nature*, 166(4227), 785–786. doi:10.1038/166785b0.

Dias Da Silva, W. *et al.* (1996) "Development of an antivenom against toxins of *Lonomia obliqua* caterpillars," *Toxicon*, 34(9), pp. 1045–1049. doi: 10.1016/0041-0101(96)00052-9.

Donato, J. L. *et al.* (1998) "*Lonomia obliqua* caterpillar spicules trigger human blood coagulation via activation of factor X and prothrombin," *Thrombosis and Haemostasis*, 79(8), pp. 539–542.

Duarte, A. C. *et al.*(1996) "Intracerebral haemorrhage after contact with *Lonomia* caterpillars," *The Lancet*, 348, p. 1996.

Fan, H. W. and Duarte, A. C. (2003) "Acidentes por *Lonomia*," in Cardoso, J. L. C. *et al.* (eds.) *Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. 1° edition. São Paulo: Sarvier, pp. 224–232.

Fritzen, M. *et al.* (2005) "A prothrombin activator (Lopap) modulating inflammation, coagulation and cell survival mechanisms," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 333, pp. 517–523. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.05.140.

Gené, J. a *et al.*(1989) "Comparative study on coagulant, defibrinating, fibrinolytic and fibrinogenolytic activities of Costa Rican crotaline snake venoms and their neutralization by a polyvalent antivenom.," *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*, 27, pp. 841–848. doi: 10.1016/0041-0101(89)90096-2.

Gonçalves, L. R. C. *et al.* (2007) "Efficacy of serum therapy on the treatment of rats experimentally envenomed by bristle extract of the caterpillar *Lonomia obliqua*: Comparison with epsilon-aminocaproic acid therapy," *Toxicon*, 50, pp. 349–356. doi: 10.1016/j.toxicon.2007.04.004.

Gouveia, a. I. D. C. B. *et al.*(2005) "Identification and partial characterisation of hyaluronidases in *Lonomia obliqua* venom," *Toxicon*, 45, pp. 403–410. doi: 10.1016/j.toxicon.2004.11.008.

Guerrero, B. *et al.* (1999) "Effect on platelet FXIII and partial characterization of Lonomin V, a proteolytic enzyme from *Lonomia* achelous caterpillars," *Thrombosis Research*, 93, pp. 243–252. doi: 10.1016/S0049-3848(98)00169-8.

Guerrero, B. *et al.* (2001) "Thrombolytic effect of Lonomin V in a rabbit jugular vein thrombosis model.," *Blood coagulation & fibrinolysis: an international journal in haemostasis and thrombosis*, 12(7), pp. 521–529. doi: 10.1097/00001721-200110000-00003.

Harlow D., E. L. (1988) "A laboratory manual," *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, (28), pp. 28–29. doi: 10.1016/0968-0004(89)90307-1.

Heinen, T. E. *et al.* (2014) "Effects of *Lonomia obliqua* caterpillar venom upon the proliferation and viability of cell lines," *Cytotechnology*, 66, pp. 63–74. doi: 10.1007/s10616-013-9537-7.

Holzer, M. and Mackessy, S. P. (1996) "An aqueous endpoint assay of snake venom phospholipase A₂," *Toxicon*, 34(10), pp. 1149–1155. doi: 10.1016/0041-0101(96)00057-8.

Jespersen, J. and Astrup, T. (1983) "A Study of the Fibrin Plate Assay of Fibrinolytic Agents," *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis*. Karger Publishers, 13(5), pp. 301–315. doi: 10.1159/000214769.

Kelen, E.M.A.; Picarelli, Z.P.; Duarte, A. C. (1995) "Hemorrhagic Syndrome Induced By Contact With Caterpillars," *J. Toxicol. - Toxins Reviews*, 14(3), pp. 283–308. doi: 10.3109/15569549509019465.

Kowacs, P. A. *et al.* (2006) "Fatal intracerebral hemorrhage secondary to *Lonomia obliqua* caterpillar envenoming: Case report," *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, 64(August), pp. 1030–1032. doi: 10.1590/S0004-282X2006000600029.

Lemaire, C. (2002) *Saturniidae of America: Hemileucinae*. 1st ed, *Antiquariat Geock & Evers*. 1st ed.

López, M., Gil, A. and Arocha-Piñango, C. L. (2000) "The action of *Lonomia achelous* caterpillars venom on human factor V," *Thrombosis Research*, 98, pp. 103–110. doi: 10.1016/S0049-3848(99)00209-1.

Lucena, S. *et al.* (2008) "The action of *Lonomin V* (*Lonomia achelous*) on fibronectin functional properties," *Thrombosis Research*, 121(5), pp. 653–661. doi: 10.1016/j.thromres.2007.07.005.

Mann, K. G., Brummel, K. and Butenas, S. (2003) "What is all that thrombin for?," *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 1(7), pp. 1504–1514. doi: 10.1046/j.1538-7836.2003.00298.x.

Mayence, C. *et al.* (2018) "*Lonomia* caterpillar envenoming in French Guiana reversed by the Brazilian antivenom: A successful case of international cooperation for a rare but deadly tropical hazard," *Toxicon*. Elsevier Ltd, 151, pp. 74–78. doi: 10.1016/j.toxicon.2018.06.068.

Moraes, R. H. P. (2002) *Identificação dos inimigos naturais de *Lonomia obliqua* Walker, 1855 (Lepidoptera, Saturniidae) e possíveis fatores determinantes do aumento da sua população*. Universidade de São Paulo. doi: 10.11606/D.11.2002.tde-30122002-090738.

Moraes, R. H. P. (2003) "Lepidópteros de importância médica," in Cardoso, J. L. C. *et al.* (eds.) *Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. 1^o edition. São Paulo: Sarvier, pp. 211–219.

Nascimento-Silva, V. *et al.* (2012) "A pro-inflammatory profile of endothelial cell in *Lonomia obliqua* envenomation," *Toxicon*, 60, pp. 50–60. doi: 10.1016/j.toxicon.2012.03.016.

Ogston, B. Y. A. G. and Shermant, T. F. (1961) "Effects of hyaluronic acid upon diffusion of solutes and flow of solvent," *The Journal of Physiology*, 156(1), pp. 67–74.

Peña-Vásquez, W. *et al.* (2016) "Hemorrhagic erucism due to *Lonomia* spp. In a girl: A case report," *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 33(4), pp. 819–823. doi: 10.17843/rpmpesp.2016.334.2570.

Pineda, D. *et al.* (2001) "Síndrome hemorrágico por contacto con orugas del género *Lonomia* (Saturniidae) en Casanare, Colombia: informe de

dos casos,” *Biomédica*, 21(4), pp. 328–332. doi: 10.7705/biomedica.v21i4.1125.

Pinto, A. F. M. *et al.* (2004) “Lonofibrase, a novel α -fibrinogenase from *Lonomia obliqua* caterpillars,” *Thrombosis Research*, 113, pp. 147–154. doi: 10.1016/j.thromres.2004.01.012.

Pukrittayakamee, S. *et al.* (1988) “The hyaluronidase activities of some Southeast Asian snake venoms,” *Toxicon*, 26(7), pp. 629–637. doi: 10.1016/0041-0101(88)90245-0.

Ratnoff, O. C. and Menzic, C. (1951) “A new method for the determination of fibrinogen in small samples of plasma,” *Journal of Laboratory and Clinical ...*, 37, p. 111.

Reis, C. V *et al.* (1999) “A Ca^{++} activated serine protease (LOPAP) could be responsible for the haemorrhagic syndrome caused by the caterpillar *Lonomia obliqua*. L obliqua Prothrombin Activator Protease.,” *Lancet*, 353, p. 1942. doi: 10.1016/S0140-6736(99)01777-8.

Robbins & Cotran (2005) “Disfunções hemodinâmicas, doença tromboembólica e choque,” in Richard N. Mitchell (ed.) *Patologia - Bases patológicas da doença*. 7ª edição. São Paulo: Saunders - Elsevier, pp. 125–151.

Sano-Martins, I. S. *et al.* (2017) “Hemostatic disorder induced by skin contact with *Lonomia obliqua* (Lepdóptera, Saturniidae) caterpillars,” *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 11(1), pp. 33–40. doi: 10.2337/db06-1182.J.-W.Y.

Sano-Martins, I. S. *et al.* (2018) “Effectiveness of *Lonomia* antivenom in recovery from the coagulopathy induced by *Lonomia orientoandensis* and *Lonomia casanarensis* caterpillars in rats,” *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 12(8), pp. 1–16. doi: 10.1371/journal.pntd.0006721.

Santos, J. H. A. *et al.* (2017) “Severe Hemorrhagic Syndrome After *Lonomia* Caterpillar Envenomation in the Western Brazilian Amazon: How Many More Cases Are There?,” *Wilderness & Environmental Medicine*, 28(1), pp. 46–50. doi: 10.1016/j.wem.2016.11.001.

Schmitberger, P. A. *et al.* (2013) “Probable chronic renal failure caused by *Lonomia* caterpillar envenomation,” *The journal of venomous animals and toxins including tropical diseases*, 19(1), p. 14. doi: 10.1186/1678-9199-19-14.

Seibert, C. S. *et al.* (2006) “Purification of a phospholipase A2 from *Lonomia obliqua* caterpillar bristle extract,” *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 342, pp. 1027–1033. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.02.071.

Smith, P. K. *et al.* (1985) “Measurement of protein using bicinchoninic acid,” *Analytical Biochemistry*, 150(1), pp. 76–85. doi: 10.1016/0003-2697(85)90442-7.

Spadacci-Morena, D. D. *et al.* (2016) “The urticating apparatus in the caterpillar of *Lonomia obliqua* (Lepidoptera: Saturniidae),” *Toxicon*. Elsevier Ltd, 119, pp. 218–224. doi: 10.1016/j.toxicon.2016.06.008.

Theakston, R. D. and Reid, H. A. (1983) “Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venom.,” *Bulletin of the World Health Organization*, 61(6), pp. 949–56.

Zannin, M. *et al.* (2003) "Blood coagulation and fibrinolytic factors in 105 patients with hemorrhagic syndrome caused by accidental contact with *Lonomia obliqua* caterpillar in Santa Catarina, Southern Brazil," *Thrombosis and Haemostasis*, 89(2), pp. 355–364.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Caracterização biológica do extrato de cerdas de *Lonomia descimoni* (Lepidópteros, Saturniidae) e eficácia da soroterapia no envenenamento experimental.", protocolada sob o CEUA nº 6021261016 (ID 000670), sob a responsabilidade de **Luís Roberto de Camargo Gonçalves e equipe; Isabelle Valle dos Anjos** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB) na reunião de 16/11/2016.

We certify that the proposal "Biological characterization of *Lonomia descimoni* bristle extract (Lepidópteros, Saturniidae) and efficacy of antivenom in experimental envenomation.", utilizing 110 Heterogenics rats (110 males), protocol number CEUA 6021261016 (ID 000670), under the responsibility of **Luís Roberto de Camargo Gonçalves and team; Isabelle Valle dos Anjos** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Butantan Institute (CEUAIB) in the meeting of 11/16/2016.

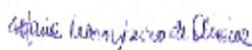
Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de 02/2017 a 02/2019 Área: [Fisiopatologia](#)

Origem:	Biotério Central	sexo:	Machos	idade:	70 a 80 dias	N:	110
Espécie:	Ratos heterogênicos			Peso:	250 a 300 g		
Linhagem:	Wistar						

Local do experimento: Laboratório de Fisiopatologia Instituto Butantan

São Paulo, 13 de março de 2019



Maria Leonor Sarmo de Oliveira
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan



Nancy Oguiura
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan