

Ana Isabel da Costa Bernuci Gouveia

**Bioprospecção de toxinas presentes na hemolinfa e extrato
de cerdas da lagarta *Lonomia obliqua***

**Dissertação apresentada como requisito
parcial à obtenção do grau de Mestre em
Biologia Celular e Molecular, Programa de
Pós-Graduação do Departamento de Biologia
Celular, Setor de Ciências Biológicas,
Universidade Federal do Paraná.**

Orientador: Prof. Dr. Silvio Sanches Veiga

Co-Orientador: Prof. Dr. Waldomiro Gremski

**Curitiba
2004**

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Silvio Sanches Veiga, do Departamento de Biologia Celular da UFPR, pela oportunidade de fazer iniciação científica em seu laboratório me proporcionando, como orientador, inestimável aprendizado técnico e científico, além de lições de vida, respeito e amizade.

Ao Prof. Dr. Waldemiro Gremski, do Departamento de Biologia Celular da UFPR, meu co-orientador, pelo exemplo de dedicação à pesquisa e à docência.

Aos amigos do Laboratório de Matriz Extracelular e Biotecnologia de Venenos Juliana Dreyfuss, Andrea, Rafael, Gustavo e Adriana que além de amigos foram como mestres para mim, uma vez que me introduziram neste universo científico me ensinando tudo com muita paciência e carinho.

Em especial às também amigas e irmãs do Laboratório de Matriz Extracelular e Biotecnologia de Venenos Olga e Márcia pela ajuda técnica e pela, imprescindível, ajuda emocional em todos os momentos.

Aos mais novos e não menos importantes amigos do Laboratório de Matriz Extracelular e Biotecnologia de Venenos Luiza, Kátia, Youssef, Simone, Elisângela, Luciéllen e Daniele por toda a ajuda experimental e pela grande amizade e convívio agradável.

Aos professores e amigos Célia Regina Cavichiolo Franco e Silvio Marques Zanata pela alegria contagiante, pelos valiosos ensinamentos e pelo exemplo de profissionalismo.

Aos Professores do Curso de Pós-Graduação do Departamento de Biologia Celular, pelos ensinamentos que contribuíram para meu crescimento intelectual e pessoal.

Aos amigos do Curso de Pós-Graduação do Departamento de Biologia Celular da UFPR pela agradável convivência durante estes anos.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação do Departamento de Biologia Celular pelo empenho na melhoria deste curso.

À Secretária do Curso de Pós-Graduação do Departamento Biologia Celular, Marlene B. de Camargo, pela incansável disposição.

Ao Biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR e seus funcionários pelo fornecimento e manutenção dos animais utilizados direta ou indiretamente neste trabalho.

A bióloga responsável pelo Centro de Informações Toxicológicas da Secretaria de Estado da Saúde do Paraná, Gisélia Rúbio, pelo fornecimento das lagartas.

A bióloga, Solange Regina Malkowski, funcionária do Museu de História Natural de Curitiba, por possibilitar visitas de campo ao Parque Iguazu (Zoológico Municipal de Curitiba) em busca de exemplares de lagartas.

À CAPES, CNPq, Fundação Araucária e Paraná Tecnologia pelo suporte financeiro.

Aos meus pais João Batista e Zilda, pela dedicação, confiança e incentivo fundamental para a realização deste trabalho.

Aos meus irmãos João Ricardo e João Henrique e minha sobrinha Maria Eduarda pela admiração ao meu trabalho e por todo o incentivo prestado.

Às minhas tias Cecília (*in memoriam*) e Jacira por sempre acreditarem em mim e por proporcionarem tantos momentos felizes na minha vida.

Ao meu noivo Marcello, pela compreensão nas horas de ausência, pelo apoio nas horas de cansaço, pelo estímulo nos momentos de indecisão e acima de tudo pelo respeito aos meus ideais e por me fazer tão feliz.

Finalmente, a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, meu muito obrigado e espero que de alguma forma possa retribuir toda atenção e respeito.

"De tudo, fica a certeza de que é preciso continuar,
fazendo de cada obstáculo um caminho,
do sonho uma ponte,
da procura um encontro,
para que valha a pena existir."

(Autor desconhecido)

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	ix
LISTA DE TABELAS E FIGURAS	xi
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xv
1 INTRODUÇÃO	01
1.1 Lepidópteros Urticantes	02
1.2 O Lepidóptero <i>Lonomia obliqua</i>	03
1.3 Quadro Clínico do Erucismo Lonômico	07
1.4 Ações de Toxinas Lonômicas	10
1.5 Tratamento dos Acidentes com <i>Lonomia obliqua</i>	11
1.6 Epidemiologia do Erucismo Lonômico	12
1.7 Glicosaminoglicanos	14
1.7.1 Conceitos Gerais	14
1.7.2 Hialuronidases	17
1.8 Enzimas Proteolíticas	18
1.8.1 Conceitos Gerais	18
1.8.2 Inibidores de Proteases	20
2 OBJETIVOS	22
3 MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1. Animais	25
3.2 Reagentes	25
3.3 Coleta de hemolinfa e das cerdas da lagarta <i>L. obliqua</i>	26
3.4 Processamento da hemolinfa e cerdas da lagarta <i>L. obliqua</i>	26
3.5 Dosagem de proteínas dos extratos das cerdas e hemolinfa	27
3.6 Eletroforese em gel de agarose	27
3.7 Experimentos de zimograma	27

3.8	Determinação do perfil da atividade enzimática da hialuronidase	28
3.9	Fluorescência em tecido	29
3.10	Eletroforese de proteínas em SDS-PAGE	30
3.11	Imunoensaio de Western Blotting	31
3.12	Cromatografia de Gel Filtração	31
3.13	Cromatografia de Afinidade	32
3.14	Análise da atividade inibitória sobre a ação da trombina	32
4	RESULTADOS	33
4.1	Pesquisa de atividade hialuronidásica no extrato de cerdas da lagarta	
	<i>L. obliqua</i>	34
	4.1.1 Análise de degradação de glicosaminoglicanos pelo extrato de	
	cerdas de <i>L. obliqua</i>	34
	4.1.2 Análise comparativa do perfil de degradação do ácido hialurônico	
	pelo extrato de cerdas de <i>L. obliqua</i> e avaliação dos fragmentos gerados	
	por esta atividade	35
	4.1.3 Detecção de hialuronidases de 49kDa e 53kDa no extrato de	
	cerdas de <i>L. obliqua</i>	36
	4.1.4 Avaliação da atividade ótima das hialuronidases do extrato de	
	cerdas de <i>L. obliqua</i> em função do pH	37
	4.1.5 Estudo da atividade das hialuronidases do extrato de cerdas de	
	<i>L. obliqua</i> sobre ácido hialurônico organizado na matriz extracelular	
	tecidual	37
4.2	Pesquisa da presença de inibidores de proteases na hemolinfa da	
	lagarta <i>L. obliqua</i>	38
	4.2.1 Detecção da atividade inibitória da hemolinfa bruta de <i>L. obliqua</i>	
	sobre a atividade proteolítica da tripsina	38
	4.2.2 Detecção da atividade inibitória da hemolinfa bruta de <i>L. obliqua</i>	
	sobre a atividade proteolítica de diferentes famílias enzimáticas	39

4.2.3 Pré-purificação do inibidor de proteases presente na hemolinfa de <i>L. obliqua</i> por cromatografia de gel filtração	39
4.2.4 Purificação do inibidor de proteases presente na hemolinfa de <i>L. obliqua</i> por cromatografia de afinidade	40
4.2.5 Análise da atividade inibitória da hemolinfa de <i>L. obliqua</i> sobre a atividade proteolítica da tripsina utilizando diferentes substratos protéicos	41
4.2.6 Análise da reversibilidade da inibição da atividade proteolítica da tripsina causada pelo inibidor de proteases presente na hemolinfa da lagarta <i>L. obliqua</i>	42
4.2.7 Análise da atividade do inibidor de proteases da hemolinfa de <i>L. obliqua</i> sobre a ação da trombina	42
5. FIGURAS	43
6. DISCUSSÃO	81
7. CONCLUSÕES	93
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96
9. ANEXO	111

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BCiP/NBT	5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate-Nitro Blue Tetrazolium
BSA	Albumina de soro bovino
°C	Graus Celsius.
EHS	Tumor e sarcoma de Engelbreth Holm Swan.
IRA	Insuficiência Renal Aguda
kDa	Quilodáltons (unidade de massa molecular equivalente a mil dáltons)
<i>et al.</i>	Expressão latina para demais colaboradores
IgG	Imunoglobulina G
mA	Miliamperes
g	giros
V	Volts
U	Unidade Internacional
h	Horas
min	Minutos
%	Por cento
mg	Miligrama
µg	Micrograma
mL	Mililitro
cm	Centímetro
µm	Micrômetro
nm	Nanômetro
mM	Milimolar
M	Molar
NaCl	Cloreto de sódio

CaCl ₂	Cloreto de cálcio
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
DAPI	4-6-diamino-2-fenindol dicloreto
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com sódio dodecil sulfato, ou dodecil sulfato de sódio
PBS	Salina tamponada com fosfatos
pH	Potencial hidrogeniônico
p/v	Proporção peso/volume

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

FIGURA 1. Ciclo de vida da lagarta <i>Lonomia obliqua</i>	07
FIGURA 2. Quadro clínico do erucismo	09
FIGURA 3. Análise da degradação de glicosaminoglicanos pelo extrato de cerdas de <i>L. obliqua</i>	46
FIGURA 4. Análise comparativa do perfil de degradação do ácido hialurônico pelo extrato de cerdas de <i>L. obliqua</i> e avaliação dos fragmentos gerados por esta atividade	49
FIGURA 5. Detecção de hialuronidases de 49kDa e 53kDa no extrato de cerdas de <i>L. obliqua</i>	52
FIGURA 6. Avaliação da atividade ótima das hialuronidases do extrato de cerdas de <i>L. obliqua</i> em função do pH	55
FIGURA 7. Estudo da atividade das hialuronidases do extrato de cerdas de <i>L. obliqua</i> sobre ácido hialurônico organizado na matriz extracelular tecidual	58
FIGURA 8. Detecção da atividade inibitória da hemolinfa bruta de <i>L. obliqua</i> sobre a atividade proteolítica da tripsina	61
FIGURA 9. Detecção da atividade inibitória da hemolinfa de <i>L. obliqua</i> sobre a atividade proteolítica de diferentes famílias enzimáticas	64
FIGURA 10. Cromatograma da hemolinfa bruta de <i>L. obliqua</i> e avaliação da atividade inibitória das frações eluídas da gel filtração	67
FIGURA 11. Purificação do inibidor de proteases presente na hemolinfa de <i>L. obliqua</i> por cromatografia de afinidade	70
FIGURA 12. Análise da atividade inibitória da hemolinfa de <i>L. obliqua</i> sobre a atividade proteolítica da tripsina utilizando diferentes substratos protéicos	73
FIGURA 13. Análise da reversibilidade da inibição da atividade proteolítica da tripsina pelo inibidor de proteases de <i>L. obliqua</i>	76
FIGURA 14. Análise da atividade inibitória do inibidor de proteases de <i>L.</i>	

***obliqua* sobre a ação da trombina**

79

TABELA 1. Acidentes com a lagarta *Lonomia*

14

RESUMO

Estudando o extrato de cerdas da lagarta *Lonomia obliqua*, detectamos uma atividade lítica sobre moléculas de ácido hialurônico. O extrato de cerdas também foi capaz de degradar condroitim sulfato purificado, porém, incapaz de hidrolisar moléculas de heparim sulfato e dermatam sulfato. Além disso, por meio de ensaios de cinética de degradação de ácido hialurônico, observamos que esta atividade lítica é causada por uma enzima do tipo hidrolase e não do tipo liase. Baseando-se no método colorimétrico descrito por Reissig *et al* (1955), concluímos que esta hidrolase atua como uma enzima do tipo β -endohexosaminidase originando resíduos terminais de açúcares N-acetilglucosamina após a lise do ácido hialurônico, ao invés de agir como uma enzima do tipo β -endoglucuronidase que, por sua vez, gera resíduos de ácido glucurônico. Análises do extrato de cerdas por zimografia resultaram na identificação de moléculas com atividade lítica sobre o ácido hialurônico com mobilidade eletroforética difusa de 49kDa e 53kDa. Uma avaliação da atividade destas moléculas em função do pH mostrou que estas enzimas não apresentam atividade aparente em pH abaixo de 5,0 e acima de 8,0 e indica que a faixa de pH ótimo para a atividade enzimática está entre 6,0 e 7,0. Por fim, através de reação de fluorescência e análise em microscopia confocal, pudemos comprovar a ação de clivagem do extrato de cerdas sobre o ácido hialurônico organizado na matriz extracelular de derme de coelho. Estes dados nos fornecem evidências experimentais sobre a presença de hialuronidases no extrato de cerdas de *L. obliqua*, que possivelmente, podem estar envolvidos com os efeitos nocivos desencadeados no envenenamento.

Inúmeros constituintes moleculares diferentes têm sido estudados a partir dos produtos de secreção da lagarta *L. obliqua* e entre eles se destacam as serinoproteases com atividade pró-coagulante e/ou fibrinogenolítica. Com base nestes dados, consideramos a hipótese de identificar e caracterizar um inibidor de serinoprotease na hemolinfa da lagarta com possível função de proteção contra suas próprias toxinas, ou mesmo, com função tóxica durante os acidentes. Experimentos utilizando fibronectina como substrato protéico para diferentes proteases (tripsina, elastase, quimiotripsina, proteinase K, papaína, pepsina e colagenase V) foram realizados na presença de hemolinfa. O perfil de degradação da fibronectina foi avaliado por ensaios de *Western Blotting* utilizando anticorpos que reconhecem fibronectina. A atividade proteolítica da tripsina, elastase, quimiotripsina e proteinase K foi inibida pela hemolinfa da lagarta. Esta atividade inibitória detectada foi avaliada sob diferentes temperaturas de incubação, mostrando que o inibidor de protease presente na hemolinfa é funcional a 4, 20, e 37°C. Além disso, experimentos adicionais mostraram que esta atividade inibitória da hemolinfa também ocorre quando tripsina é incubada com diferentes substratos protéicos (fibrinogênio, laminina e vitronectina). Com o intuito de purificar a molécula do inibidor de protease, alíquotas de hemolinfa bruta de *L. obliqua* foram submetidas a ensaios de cromatografia de gel filtração utilizando resina Sephadex G-100 seguidos de ensaios de cromatografia de afinidade utilizando resina tripsina-agarose. As frações eluídas das cromatografias foram monitoradas para a presença de proteínas por absorvância em 280nm e submetidas à incubação

com fibronectina e tripsina para detecção da atividade inibitória observada por SDS-PAGE 7,5%. Para fortalecer este resultado foi realizado um zimograma reverso, utilizando gelatina como substrato, em que as frações com atividade inibitória foram avaliadas. Sob estas condições, identificamos um inibidor de serinoprotease na hemolinfa da lagarta *L. obliqua* com mobilidade eletroforética na região de 21kDa. Com o objetivo de avaliar o grau de reversibilidade da inibição da atividade proteolítica pela ação do inibidor de protease, alíquotas de tripsina pré-incubada com as frações enriquecidas da cromatografia foram submetidas a experimentos de zimograma com gelatina impregnada. Com isso pudemos observar que a interação inibidor-protease é resistente ao SDS e à eletroforese gerando alteração na mobilidade da tripsina mas não inativando irreversivelmente a sua atividade. Especulando sobre uma futura aplicação biotecnológica deste inibidor, realizamos um experimento, para avaliarmos a possível inibição da ação da molécula de trombina quando na presença de fibrinogênio em solução, em que trombina foi pré-incubada com as frações enriquecidas da cromatografia de gel filtração e depois adicionada à uma solução de fibrinogênio. Pudemos observar que, respeitando uma característica importante dos inibidores de protease que possuem aplicações no campo terapêutico, o inibidor de serinoprotease da hemolinfa da lagarta *L. obliqua* não foi capaz de inibir a atividade da trombina, uma importante enzima da cascata de coagulação.

ABSTRACT

By studying *Lonomia obliqua* (caterpillar) bristles extract we were able to detect a lytic activity on purified hyaluronic acid. Also, the bristle extract hydrolyses purified chondroitin sulphate, but was unable to degrade either heparan sulphate or dermatan sulphate. Moreover, through purified hyaluronic acid-degrading kinetic assays, we observed that this lytic activity was caused by a hydrolase instead a lyase enzyme. In addition, by using the colorimetric reaction of Reissig (1955), we detected this hyaluronic acid hydrolase action as a β -endohexosaminidase enzyme originating terminal N-acetylglucosamine residues instead a β -endoglucuronidase that might originate glucuronic acid residues. Zymogram analysis of the bristle extract detected 49kDa and 53kDa molecules with hyaluronic acid lytic activity. An examination of these hyaluronic acid degrading activities as function of pH showed that these hydrolases had no apparent activities at pH below 5.0 and higher than 8.0 and displayed their optimal activities at pH ranging from 6.0 to 7.0. Finally, through a fluorescence reaction to hyaluronic acid and confocal microscopy, we further comproved this cleaving action upon hyaluronic acid organised on the extracellular matrix of the rabbit dermis. The data provide experimental evidence of the presence of hyaluronidases in the *L. obliqua* bristle extract, probably involved on the harmful effects of the venom.

Several different molecular constituents have been described in *L. obliqua* secretion products and among them serineproteases with procoagulant and fibrinogenolytic activity were identified in its bristles. Based on these results, we have considered the hypothesis of identifying a serineprotease inhibitor in caterpillar haemolymph with possible self defense function against their own toxins or even deleterious activities during accidents. Experiments using fibronectin as a protein substrate for different proteases such as trypsin, elastase, chymotrypsin, proteinase K, papain, pepsin and collagenase V were performed in the presence and absence of haemolymph. Fibronectin degradation profile was evaluated by *Western Blotting* assays using antibodies that recognize fibronectin. The proteolytic activities of trypsin, elastase, chymotrypsin and proteinase K were inhibited by incubation with *L. obliqua* haemolymph. This inhibitory activity was also evaluated at different temperatures showing that the inhibitor is functional at 4, 20, and 37°C. In addition, experiments showed that this inhibitory activity also occurs when trypsin was incubated with different substrates such as fibrinogen, laminin and vitronectin molecules. With the goal of purify the inhibitor molecule, haemolymph was submitted to a Sephadex G-100 gel filtration chromatography followed by an affinity chromatography using trypsin-agarose. Eluted fractions were monitored for the presence of proteins by absorbance at 280nm and were submitted to incubation with fibronectin and trypsin for detection of inhibitory activity that was observed by SDS-PAGE 7,5%. To ensure this result, a reverse zymography of the fractions with activity was performed using gelatin as substrate. Under these conditions, we were able to identify a trypsin inhibitor with a diffuse eletrophoretic mobility apparently at 21kDa region in *L. obliqua* haemolymph. Next, we studied the mechanism by which haemolymph serine protease inhibitor inactivates proteases. Trypsin was incubated with Sephadex

G-100 enriched fractions and then electrophoresed by using a SDS-PAGE (experimental procedure that is able to separate protease from protease inhibitor in case of reversible inhibition), followed by a gelatin-zymogram. This assay suggest that protease inhibitor interaction with trypsin was resistent to SDS and electrophoretic separation conditions, altered trypsin mobility but did not inactivate its proteolytic activities in a unreversible manner. Then, speculating about the biotechnological applications of this protease inhibitor, we evaluated the ability of this molecule inhibit the thrombin activity upon fibrinogen. Aliquots of thrombin were pre-incubated with Sephadex G-100 enriched fractions and, then, incubated with fibrinogen solution. This result showed that the haemolymph serine protease inhibitor is unable to block fibrinogen-thrombin dependent clotting *in vitro*, as well as waited for all protease inhibitors used in clinical researches.

I. INTRODUÇÃO

Em função do quadro epidemiológico relacionado a envenenamentos por animais peçonhentos que acometem a Região Sul do Brasil torna-se de grande importância o desenvolvimento de conhecimento científico sobre os venenos destes animais incluindo seus mecanismos de ação e a forma como estes são inoculados nas vítimas buscando, além da diminuição da mortalidade e morbidade causadas por estes acidentes, aplicações biotecnológicas de toxinas e/ou produtos oriundos destes venenos estudados para indústria farmacêutica.

1.1. Lepidópteros Urticantes

A ordem Lepidoptera (lepidó= escama; pteró= asa) é composta pelos insetos conhecidos popularmente por borboletas e mariposas. Lepidopterismo é termo que designa o acidente provocado por formas aladas de lepidópteros (mariposas), enquanto que o acidente causado pela forma larval (lagartas) denomina-se erucismo (do latim *eruca*, lagarta) (COSTA, 1994). Na subordem Heteroneura, da qual fazem parte as lagartas causadoras de erucismo, os casos mais frequentes e mais graves são aqueles resultantes do contato com as larvas das famílias Megalopygidae e Saturniidae. As espécies criptotóxicas produzem toxinas mas não possuem espículas, pêlos urticantes ou outro mecanismo de injeção do veneno; já as espécies fanerotóxicas (como a *Lonomia obliqua*) além de produzirem toxinas, são capazes de injetar ou introduzir o veneno em outros animais. As espécies que causam envenenamento no homem são denominadas, ainda, de antropotóxicas (PESCE & DELGADO, 1971; SCOBLE, 1992; COSTA, 1994).

Já na época da colonização do Brasil Padre Anchieta descreveu na “Carta de São Vicente” em 1560, o medo dos índios em relação a algumas lagartas que causavam acidentes caracterizados por dor intensa no local após o contato físico (ROTBERG, 1971; COSTA, 1994). Estes animais eram chamados de “tatá-raná”, nome que em Tupi-Guarani significa “como fogo” ou “semelhante ao fogo”. Mais tarde este nome originou, na língua portuguesa, a palavra “taturana”.

A literatura médica registra grande número de acidentes com Lepidopteros quando ainda se encontram na forma larval. Felizmente o número de espécies de Lepidopteros de importância em saúde pública é pequeno. Em geral, a maioria das espécies, com poucas exceções, são fitófagas em seu estágio larval e por isso são vistas principalmente como pestes na agricultura e outras culturas florestais (Manual de Vigilância Epidemiológica, 1993). Entretanto, a maior parte dos acidentes humanos é causado por espécies que causam dermatites por contato direto com suas cerdas, espinhos ou espículas ou reações respiratórias alérgicas devido à inalação destes materiais que podem ser compostos por substâncias não-protéicas ou enzimas proteolíticas (AROCHA-PIÑANGO *et al.*, 2000).

1.2. O Lepidóptero *Lonomia obliqua*

O gênero *Lonomia* pertence à ordem Lepidoptera, subordem Ditrysia, superfamília Bombycoidea, família Saturniidae, subfamília Hemileucinae. A maioria das espécies deste gênero está distribuída em regiões da América do Sul, mas há também registros de sua ocorrência na América Central.

No Brasil já foram relatadas as espécies *L. cynira*, *L. cluacina*, *L. circumstans*, *L. falcata submacula*, *L. achelous* e *L. obliqua* (LORINI, 1999). As duas últimas são as mais comuns e conhecidas por causarem graves acidentes hemorrágicos no homem. A espécie *L. achelous* vem sendo estudada na Venezuela nos últimos 30 anos, enquanto a *L. obliqua* vem sendo estudada, mais recentemente, por grupos de pesquisa de São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul uma vez que a sua ocorrência se concentra principalmente nas regiões Sul e Sudeste do país.

Recentemente alguns aspectos da biologia da espécie *L. obliqua* foram estudados e descritos por Lorini (1999). Os adultos (mariposas) vivem de 7 a 10 dias não se alimentando e não possuindo toxicidade descrita. Apresentam dimorfismo sexual sendo a mariposa fêmea maior e de coloração pardo-rosado e a mariposa macho menor e mais amarelada com tonalidades mais vivas. Ambos possuem listra transversal sobre as asas. A cópula geralmente ocorre à noite, devido ao hábito noturno dos adultos e após o acasalamento, as mariposas fêmeas fazem a ovoposição nas folhas e tronco das árvores. O período de incubação dos ovos pode variar de 17 dias (LORINI, 1999) até cerca de 30 dias (Ministério da Saúde, 1998). Após este período eclodem as larvas que passam por 6 (seis) estágios (instares), chegando a atingir cerca de 7 (sete) centímetros antes de atingirem a fase de pupa. A duração do estágio larval varia de 50 a 80 dias dependendo das condições ambientais (LORINI, 1999). Na fase de pupa também é possível observar dimorfismo sexual, principalmente pelo fato da pupa do macho ser menor que a da fêmea. Nesta fase, permanecem em dormência sob restos vegetais durante o inverno até os meses mais quentes, de outubro em diante, quando emergem as mariposas

reiniciando o ciclo. A duração do ciclo de vida de *L. obliqua* também depende do clima da região, tendo sido observado um tempo mínimo de quatro meses e meio e máximo de oito meses e meio (LORINI, 1999).

As lagartas *L. obliqua* possuem hábito gregário, vivendo em colônias sobre troncos de diversas árvores de cujas folhas se alimentam. Diversos estudos consideram que o hábito gregário em insetos é uma resposta adicional para acentuar a existência de outras formas de defesa geralmente morfológicas (cerdas) ou químicas (toxinas de base protéica) apresentadas por estes organismos. Além disso, pelo fato de ser maior a exposição de animais gregários do que de animais de hábito isolado, o mimetismo também pode ser considerado um importante mecanismo de defesa para estas espécies de hábito gregário (BUCHERL, 1971; VULINEC, 1990).

Estas lagartas podem ser encontradas em várias espécies de árvores nativas tais como, ipê, goiabeira e figueira, bem como sobre troncos de árvores frutíferas exóticas de clima temperado (pessegueiro, laranjeira, amoreira e ameixeira). À noite sobem até os galhos mais altos para se alimentarem e durante o dia permanecem agrupadas, formando colônias, geralmente localizadas nas partes mais baixas dos troncos das árvores, o que propicia a ocorrência dos acidentes.

Vale salientar a diferença da ação defensiva do veneno destes insetos daquele quadro de envenenamento causado por muitos outros animais tais como, escorpiões, aranhas e serpentes cujas substâncias tóxicas (também de natureza protéica) quando inoculadas nas vítimas funcionam como mecanismo de apreensão das presas e, posteriormente, como coadjuvantes na digestão das presas deglutidas. Nestes animais há, portanto, uma relação morfológica e

fisiológica entre o aparelho produtor de veneno e os aparelhos digestivo e salivar. Já as larvas de lepidópteros, assim como vespas e abelhas, diversos animais marinhos e algumas espécies de sapos, possuem substâncias venenosas que não estão relacionadas à obtenção de alimento se prestando somente para defesa do animal contra predadores, não havendo relação dos sistemas digestivo e salivar com a produção de veneno (BUCHERL, 1971; MARVAL, 1993).

Quanto à morfologia destas larvas, caracterizam-se por possuir o corpo revestido de espinhos (cerdas) que, uma vez em contato com as vítimas, se quebram inoculando o veneno. Estas cerdas revestem dorsal e lateralmente o corpo da lagarta, sendo ramificados apenas no ápice e afilando da base para o ápice. Sua coloração é verde claro na base e preto no ápice, sendo em número de seis por segmento do corpo do inseto. A coloração do corpo é marrom castanho claro, com três listras longitudinais, sendo uma dorsal de coloração marrom escuro e duas laterais de coloração amarela ocre. Em cada segmento do corpo há uma mancha de coloração branca em cada lado da listra longitudinal dorsal que se afunila no sentido póstero-anterior. Nos segmentos das extremidades, as cerdas laterais são de tamanho maior que as demais, chegando ao dobro do comprimento. A cabeça é saliente e de coloração marrom claro, com um septo marrom escuro na parte superior e peças bucais bastante salientes (FRAIHA *et al.*, 1986; DUARTE *et al.*, 1990).

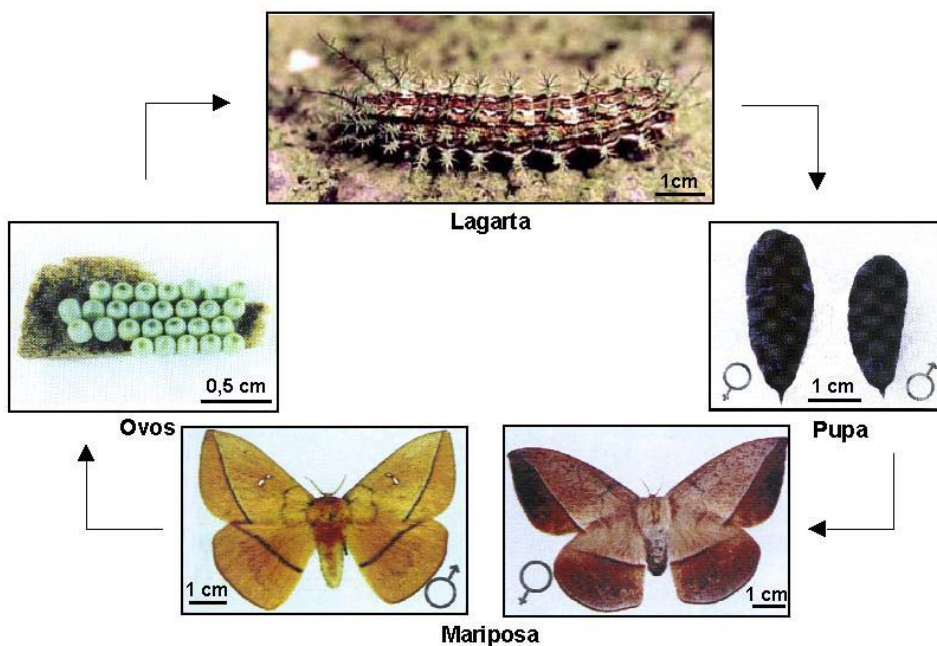


Figura 1- Ciclo de vida da lagarta *Lonomia obliqua* (Fonte: CIT/RS)

1.3. Quadro Clínico do Erucismo Lonômico

Os acidentes ocorrem quando os animais agrupados ou não nos troncos das árvores são pressionados contra a pele. Logo após o contato, surge uma sensação de queimação e dor intensa no local, seguida por desconforto generalizado, cefaléia occipital e dores generalizadas. O curso clínico após o acidente está, provavelmente, relacionado à intensidade do contato, ao número de animais envolvidos e, em particular, às condições físicas individuais do paciente. Aparece, 8 a 72 horas após os primeiros sintomas, uma equimose extensa na área acidentada, com sangramento profuso de outros locais como nariz, ouvido, intestino, vagina, gengiva e pele (AROCHA-PIÑANGO *et al.*, 1992 e KELEN *et al.*, 1995). Na seqüência destes sintomas, em pacientes não

tratados a tempo ou tratados de maneira inadequada, ocorre o desencadeamento de insuficiência renal aguda (DUARTE, 1990), hemorragia cerebral e, em alguns casos, a morte do paciente.

Ainda, nas primeiras 24 horas após o contato, surge poliartralgia, principalmente nos membros inferiores levando os pacientes a apresentarem dificuldades para andar. Este sintoma foi observado em crianças (Boletim Epidemiológico do Paraná, 1991).

O Ministério da Saúde (1998) divide os acidentes causados por lepidópteros em três tipos:

- Dermatite urticante: causada por lagartas de diversos gêneros e por adultos do gênero *Hylesia*.
- Periartrite Falangeana por Pararama: causada pela lagarta da espécie *Premolis semirufa* (MATOS & AZEVEDO, 1991).
- Síndrome Hemorrágica por *Lonomia* sp. descritos pela primeira vez na década de 60 na Venezuela. Na região Norte da Brasil foram observados casos a partir de 1983 e na região Sul a partir de 1989 (DUARTE *et al.*, 1990).

Exames laboratoriais do sangue das vítimas constataram aumento dos tempos de protrombina, tromboplastina parcial e trombina, e diminuição de fibrinogênio, fator V, plasminogênio e fator XIII. Não foram observadas alterações no número de plaquetas (AROCHA-PIÑANGO *et al.*, 1992; GUERRERO *et al.*, 1997a; GUERRERO *et al.*, 1997b; GUERRERO *et al.*, 1999).

Uma intensa atividade fibrinolítica foi observada no sangue, assim como baixas concentrações de fibrinogênio, em 5 pacientes com hemorragia

generalizada após o contato com lagartas da família *Saturnidae* encontradas em uma área restrita da Venezuela (ARROCHA-PIÑANGO *et al.*, 1969).

Em março de 1989, na cidade de Passo Fundo-RS, foram atendidos dois pacientes que apresentavam hemorragia generalizada e insuficiência renal aguda (IRA), após contato acidental com estas lagartas. Estes mesmos pacientes desenvolveram oligúria severa e até anúria, não tendo nenhuma alteração do nível de consciência. Ambos desenvolveram sangramentos intensos e hipotensão, podendo a hipovolemia ter provocado a necrose tubular aguda isquêmica. Esta isquemia isolada ou associada à ação direta das toxinas do veneno ou aos produtos liberados por alterações no sistema de coagulação (hemoglobina, fibrina, etc) poderia ter provocado tal situação (DUARTE *et al.*, 1990).

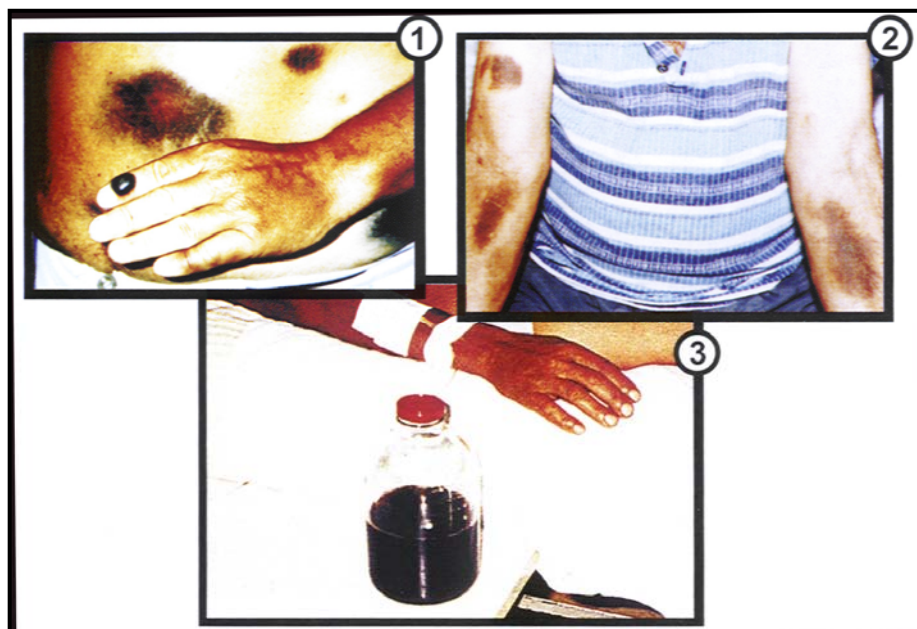


Figura 2- Quadro clínico do erucismo. Foto 1 e 2: lesões hemorrágicas após contato com *Lonomia obliqua*. Foto 3: hematúria macroscópica. (Fonte: CIT/RS)

1.4. Ações das toxinas lonômicas

Secreções fisiológicas de alguns invertebrados possuem efeitos tóxicos na coagulação sangüínea e no sistema fibrinolítico de mamíferos. Alguns destes efeitos ocorrem devido ao fato de que substâncias presentes nestas secreções se comportam como componentes do sistema hemostático. Algumas destas substâncias foram muito bem caracterizadas, clonadas e produzidas através da técnica do DNA recombinante, mostrando-se muito promissoras do ponto de vista biotecnológico, sendo também observado que muitas delas possuem massas moleculares e seqüências de aminoácidos similares, o que poderia indicar um ancestral comum. Estes componentes podem ser divididos em cinco grupos: agentes antitrombóticos, inibidores e ativadores do complexo protrombinase, substâncias que afetam a função plaquetária, substâncias que afetam o mecanismo fibrinolítico e um grupo que mistura agentes com atividades difíceis de agrupar (AROCHA-PIÑANGO *et al.*, 1999). Como exemplos de secreções fisiológicas de invertebrados que afetam o mecanismo hemostático, podemos citar algumas já descritas nas secreções de lagartas (AROCHA-PIÑANGO *et al.*, 1973, 1981a e 1981b; AMARANT *et al.*, 1991; GUERRERO *et al.*, 1992, 1997a, 1997b, COLL-SANGRONA *et al.*, 1998 e VEIGA *et al.*, 2001), da aranha-marrom *Loxosceles intermedia* (FEITOSA *et al.*, 1998, VEIGA *et al.*, 1999, 2000a, 2000b, 2001a, 2001b), de diferentes espécies de cobras (CHANG *et al.*, 1997; HARVEY *et al.*, 1991; GOPALAKRISHNAKONE *et al.*, 1997) entre outras tantas toxinas descritas.

O mecanismo pelo qual os acidentes com *Lonomia* sp induzem desordens hemorrágicas está ainda sob investigação. Provavelmente a sua complexidade se dá pelo fato de que o veneno é composto por uma mistura de

diferentes toxinas que podem estar agindo sinergicamente. Um grande número de toxinas biologicamente ativas que contribuem para com as atividades nocivas do envenenamento tem sido caracterizadas. Estudos utilizando hemolinfa e ingestão oral de *L. acheolus* descreveram uma atividade proteolítica destas secreções sobre a molécula de fibrinogênio (AROCHA-PIÑANGO, 1981a). Duas proteases fibrinolíticas caracterizadas como sendo serinoproteases e denominadas *Achelase I* e *Achelase II* foram identificadas por Amarant *et al.*, 1991. Estudando ainda hemolinfa de *L. acheolus*, Guerrero e Arocha-Piñango (1992) descreveram um ativador de protrombina semelhante ao Fator Xa e Guerrero *et al.* (1997a, 1997b) reportou a presença de uma toxina chamada *Lonomin V* que degrada Fator XIII. Trabalhando com o extrato de cerdas, Donato *et al.* (1998) salientou a presença de atividade lítica sobre protrombina e Fator X e a inibição desta atividade pela utilização de inibidores de serinoproteases. Além disso, Reis *et al.* (1999) descreveu uma serinoprotease chamada *LOPAP* (*Lonomia obliqua* prothrombin activator protease) que possui a capacidade de induzir a incoagulabilidade do plasma em camundongos. Estudando secreção de *L. obliqua* foi identificada e caracterizada uma molécula chamada *Lonofibrase* com atividade fibrin(ogen)olytic que pode estar também relacionada aos efeitos hemorrágicos severos desencadeados pelo contato com a lagarta (PINTO *et al.*, 2004).

1.5. Tratamento dos acidentes com *Lonomia obliqua*

Nas primeiras horas após o acidente, a imersão do local acometido em água gelada é medida auxiliar que alivia a dor. Nos raros casos de hemorragia abundante pode-se administrar fibrinogênio, plasma fresco ou crioprecipitado.

A transfusão dos elementos figurados (eritrócitos) é indicada apenas nos casos em que há anemia intensa. A função renal deve ser atentamente observada, devido ao risco de IRA. Quando há comprometimento articular, a corticoterapia está indicada (AROCHA-PIÑANGO *et al.*, 1992).

Em sua experiência pessoal, segundo a Dra Piñango, transfusões de sangue total são absolutamente contra-indicadas, pois promovem uma baixa acentuada das plaquetas e dos Fatores II e VIII e elevação do PDF (Produtos de Degradação do Fibrinogênio). Os melhores resultados terapêuticos foram obtidos com administração de aprotinina ou ácido ϵ -aminocapróico e de fibrinogênio, quando houve sangramento abundante (FRAIHA *et al.*, 1986).

O Instituto Butantan de São Paulo vem produzindo, desde 1996, um soro antilonômico constituído de uma preparação de imunoglobulinas específicas purificadas e concentradas, obtidas através da imunização de eqüinos com extrato de cerdas de *Lonomia* sp. (DIAS DA SILVA *et al.*, 1996; ABELLA *et al.*, 1998). O soro só é administrado ao paciente se o acidente ocorreu a menos de 4 horas e se houver correta identificação do inseto. Sendo este um soro heterólogo, muitos pacientes apresentam reações à soroterapia, geralmente de origem alérgica. No entanto, em pacientes que tenham sido tratados previamente com terapia similar (soro anti-tetânico, anti-botulínico ou anti-ofídico) a reação é do tipo anafilática e, portanto, grave.

1.6. Epidemiologia do Erucismo Lonômico

Desde o início do século XX, tem sido registrada a ocorrência de taturanas do gênero *Lonomia* sp. no sul do Brasil. Há registros de acidentes hemorrágicos causados por taturanas na Venezuela em 1969 (AROCHA-

PIÑANGO *et al.*, 1969) e em outros países como Argentina, Bolívia, Equador, México, Paraguai, Peru, Suriname, Uruguai, entre outros. No Brasil, em 1982, registraram-se casos de óbitos por taturanas no Estado do Amapá (FRAIHA *et al.*, 1986). No Rio Grande do Sul, no período de 1989 a 1992, foram registradas quatro mortes atribuídas a espécie identificada como *L. obliqua*, Walker (*Lepdoptera*, *Saturniidae*) que é muito semelhante com a espécie descrita por Fraiha *et al.*, (1986) no Amapá denominada *L. achelous* (*Lepdoptera*, *Saturniidae*).

O primeiro registro da presença deste animal no Paraná se deu em 1989 no município de Nova Catú, com a identificação da larva da mariposa do gênero *Lonomia*. Desde então, este animal já foi identificado em vários municípios das Regiões Oeste, Centro e Sul do Estado (TABELA 1). Em fevereiro de 1996 foi encontrado pela primeira vez na Região Metropolitana de Curitiba. De 1990 a 1999 foram notificados mais de 180 casos de acidentes com lagartas *L. obliqua* no Paraná, sendo a maioria deles na Região Sudoeste. Em 1997 e 1998 foram registrados 4 óbitos no interior do Estado. Dados mais recentes mostram a ocorrência de 69 casos reportados no interior do Paraná no ano de 1999 com nenhum registro de óbito. Nos anos de 2000 a 2003 houve uma disseminação dos acidentes por todo o Estado inclusive para a Capital. No ano de 2004, dados parciais apontam a ocorrência de 19 casos no Paraná incluindo um óbito na região de Curitiba (SECRETARIA DO ESTADO DA SAÚDE DO PARANÁ, 2004).

REGIONAIS DE SAÚDE	89	91	92	93	94	95	96	97	98	99	2000	2001	2002	2003	2004
CURITIBA	-	-	-	-	-	-	4	1	3	-	-	-	1	-	1/1*
PONTA GROSSA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-
IRATI	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	1	-	-
GUARAPUAVA	-	-	-	-	-	1/1*	-	5/1*	7	16	5	3	-	-	2
U DA VITORIA	-	-	-	-	-	1	-	28/1*	22	8	3	1	5	2	4
P BRANCO	-	2	-	1	2	1	-	1	9/1*	27	4	14	4	3	10
F BELTRÃO	-	1	2	1	1	1	2	2	7	14	-	6	3	2	-
CASCAVEL	1	1	-	-	2	1	-	2	4	2	-	8	4	4	1
C MOURÃO	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-
LONDRINA	-	-	-	-	-	-	-	1/1*	1	1	-	1	13	2	1
JACAREZINHO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-
TOLEDO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-
T. BORBA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-
IVAIP ORÃ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
TOTAL	2	4	2	2	5	5	6	40	54	69	13	36	34	14	19

Tabela 1- ACIDENTES COM LAGARTA *Lonomia* - REGIONAL DE OCORRÊNCIA - PARANÁ, 1989 a 2004 (dados parciais até 07/07/2004).

*Óbitos reportados (Fonte: CIT/RS)

Portanto, no Brasil, e em especial no Estado do Paraná, registros de acidentes com a lagarta *L. obliqua* vêm crescendo anualmente, tornando-se um grave problema de Saúde Pública.

1.7. Glicosaminoglicanos (GAGs)

1.7.1. Conceitos gerais

O processo patológico desenvolvido por acidentes com animais peçonhentos, em grande parte, envolve a degradação de proteínas e glicosaminoglicanos da matriz extracelular e do tecido conjuntivo. A abundância destas enzimas/toxinas pode variar de acordo com a peçonha estudada, porém, as hialuronidases, enzimas que degradam ácido hialurônico e condroitim sulfatos, estão presentes em praticamente todos os venenos (GIRISH *et al.*, 2004).

Os GAGs foram inicialmente denominados mucopolissacarídeos por Meyer em 1938, devido à presença destes compostos em secreções viscosas,

e atualmente são referidos como glicosaminoglicanos conforme nomenclatura proposta por Jeanloz em 1960.

Em tecidos de animais ocorrem seis (6) tipos de GAGs: heparina, heparam sulfato, condroitim 4-sulfato, condroitim 6-sulfato, dermatam sulfato, queratam sulfato e ácido hialurônico (MATHEWS, 1975; DIETRICH, 1984), assim definidos com base em seus constituintes. Todos são polímeros de natureza ácida e, com exceção do ácido hialurônico, carregam grupamentos sulfatos ligados a várias posições. Desta forma eles devem sua carga negativa à carboxila (ácido hialurônico), aos grupamentos sulfato (queratam sulfato) ou a ambos (condroitim, dermatam e heparam sulfato e heparina).

Os GAGs, com exceção ao ácido hialurônico, ocorrem nos tecidos covalentemente ligados a um esqueleto protéico, formando proteoglicanos. O ácido hialurônico é o único GAG que ocorre nos tecidos como cadeias polissacarídicas não covalentemente ligadas a proteínas (EVERED & WHELAN, 1989).

Os GAGs mais utilizados e melhor padronizados para pesquisa básica são: ácido hialurônico, condroitim sulfato, dermatam sulfato, heparam sulfato e heparina.

Estruturalmente o ácido hialurônico, também denominado hialuronan, é o mais simples dos GAGs, sendo constituído por unidades dissacarídicas repetitivas de ácido D-glucurônico e N-acetil-D-glucosamina, unidas por ligações β (1-3) (ácido glucurônico→glucosamina) e β (1-4) (glucosamina→ácido glucurônico). É um composto de alta viscosidade que atua como excelente protetor e lubrificante. Nos tecidos, ele interage com o esqueleto protéico de proteoglicanos presentes em cartilagem e em matriz de

tecido conjuntivo frouxo. Também é encontrado em humor vítreo, líquido sinovial, cordão umbilical, líquido amniótico, músculo, cérebro e rim (LAURENT & FRASER, 1986).

As unidades fundamentais do condroitim sulfato consistem do ácido-D-glucurônico unido por uma ligação β (1-3) a N-acetil-galactosamina-O-sulfatada. A sulfatação pode ocorrer nas posições C4 e/ou C6 da N-acetil-galactosamina. A ligação interdissacarídica é do tipo β (1-4). Os condroitim sulfatos são encontrados em uma ampla variedade de tecidos, sendo mais freqüentes na cartilagem e discos intervertebrais onde podem alcançar a concentração de 10% do peso total (IOZZO, 1985). Em todos os tipos de tumores (benignos ou malignos) há aumento significativo de condroitim sulfato. (SAMPAIO *et al.*, 1977; DIETRICH *et al.*, 1978).

O dermatam sulfato difere do condroitim por apresentar além do ácido D-glucurônico, resíduos de ácido L-idurônico. Os ácidos D-glucurônico ou L-idurônico são unidos a N-acetil-galactosamina-4-sulfatada por ligações β (1-3) e α (1-3) respectivamente, enquanto que a ligação interdissacarídica é do tipo β (1-4). Estão amplamente distribuídos, na forma de proteoglicanos, em diversos tecidos e células tais como, córnea, esclera, pele, tecido hepático e esplênico, entre outros (FISHER *et al.*, 1989).

O heparam sulfato é constituído de unidades alternadas de ácido D-glucurônico e D-glucosamina unidas por ligações glicosídicas do tipo β (1-4) e ácido L-idurônico ligado à D-glucosamina por meio de ligação glicosídica α (1-4). No entanto, a ligação interdissacarídica é do tipo α (1-4). A glucosamina pode estar N-acetilada ou N-sulfatada e/ou ainda, O-sulfatada na posição C-6 (NADER *et al.*, 1988).

1.7.2 Hialuronidases

As hialuronidases constituem um grupo de enzimas que catalisam a quebra do ácido hialurônico. Existem três grupos principais de enzimas com esta especificidade que, por sua vez, possuem diferentes mecanismos de ação.

- 1- hialuronidase tipo testicular (hialuronoglucosaminidase): cliva ligações glicosídicas (1-4) entre resíduos β -N-acetilhexosamina e ácido glucurônico de ácido hialurônico e condroitim sulfato formando oligossacarídeos e N-acetilglucosamina na extremidade redutora e ácido glucurônico na extremidade não redutora.
- 2- hialuronidase de sanguessuga (hialuronato glucanohidrolase): gera como produtos da clivagem tetrassacarídeos com N-acetilglucosamina na extremidade não redutora e ácido glucurônico na extremidade redutora.
- 3- hialuronidase bacteriana (hialuronato liase): uma delas é obtida de *Streptomyces hyalurolyticus* sendo mais específica para ácido hialurônico e inerte ao condroitim sulfato. Cliva ligações glicosídicas (1-4) entre resíduos β -N-acetilhexosamina e ácido glucurônico do ácido hialurônico gerando resíduos insaturados de ácido glucurônico na extremidade não redutora e N-acetilglucosamina na extremidade redutora (MEYER, 1971).

No corpo humano as hialuronidases são encontradas tanto em órgãos tais como baço, fígado, olhos, pele, rim e útero, bem como em fluidos corporais como lágrimas, sangue e esperma (KUDO & TU, 2001).

1.8. Enzimas Proteolíticas

1.8.1. Conceitos gerais

O quadro cutâneo hemorrágico e o quadro sistêmico causados por acidentes com *Lonomia sp.* sugerem a presença de proteases nas secreções e extratos deste inseto.

Historicamente, proteases digestivas estão geralmente associadas com degradação de proteínas e muito cedo atraíram a atenção de fisiologistas e bioquímicos que se interessavam pelo processo de digestão protéica em animais e no homem. Até então as proteases digestivas das secreções pancreáticas e gástricas eram as melhores caracterizadas e muito do conhecimento atual de estrutura protéica e função enzimática derivou-se do estudo das mesmas. Investigações sobre cinética, especificidade e inibições, juntamente com análises detalhadas das suas sequências de aminoácidos e estrutura tridimensional por difração em raio-X, permitiram a identificação dos componentes e da geometria dos seus sítios ativos e, com isso, o mecanismo de ação destas proteases digestivas foi deduzido. Como resultado, ficou evidente que as proteases podem ser classificadas em famílias, baseando-se nas estruturas e mecanismos de ação. Primeiramente as proteases foram classificadas de acordo com suas massas moleculares, carga ou substrato específico. Um sistema mais racional é agora baseado na comparação de seus sítios ativos, mecanismos de ação e estrutura tridimensional. Quatro classes são reconhecidas pela União Internacional de Bioquímica e, entre estas classes, seis famílias de proteases são descritas até o momento. Cada família tem um conjunto característico de resíduos de aminoácidos funcionais arranjados em uma configuração particular para formar um sítio ativo.

As serinoproteases incluem duas distintas famílias: as serinoproteases de mamíferos e as serinoproteases de bactérias. Elas diferem uma da outra na seqüência de aminoácidos e na estrutura tridimensional, apesar de possuírem geometria e mecanismo enzimático comum no seu sítio ativo (BEYON & BOND, 1989).

Analogamente, as metaloproteases incluem três famílias: carboxipeptidases pancreáticas de mamíferos que diferem da termolisina bacteriana na estrutura química apesar de ambas serem metaloenzimas-zinco-dependentes e possuírem a configuração similar dos seus sítios ativos, e as metaloproteases da matriz extracelular (MMPs), que representam um grupo de endopeptidases que clivam parcialmente moléculas da matriz extracelular além de outras possíveis características (KLEINER *et al.*,1993). As MMPs estão envolvidas na regulação da montagem, remodelação e tamanho das estruturas extracelulares em condições fisiológicas, como na embriogênese, e em condições patológicas como na doença periodontal, artrite reumatóide e invasão e metástase de tumores. A família das metaloproteases da matriz extracelular é composta por collagenases, estromelisinases, gelatinases e outras metaloproteases facultativas (BIRKEDAL-HANSEN *et al.*,1993).

As cisteíno-proteases (tiolproteases) incluem muitas catepsinas lisossomais de mamíferos, as proteases ativadas por cálcio citosólico e as proteases de plantas como papaína, sendo esta o membro mais estudado desta família. As proteases ácidas (proteases aspárticas) incluem penicilopepsina bacterianas, pepsinas de mamíferos, renina, quimosina e certas proteases de fungos. Muitas outras enzimas proteolíticas vêm sendo

identificadas e isoladas, porém não se enquadram nestes grupos (BEYON & BOND, 1989).

1.8.2. Inibidores de protease

O controle da atividade de proteases em sistemas biológicos é essencialmente importante. A inativação de proteases pode ocorrer de dois mecanismos distintos: por degradação proteolítica ou pelo bloqueio através de inibidores específicos. Estes inibidores são “pseudosubstratos” com graus variáveis de afinidade pelo sítio catalítico das enzimas (TRONCOSO *et al.*, 2003). Inibidores de proteases têm um papel fundamental na regulação da proteólise, sendo as enzimas alvo de origem endógena ou exógena. Eles permitem a regulação da velocidade de proteólise na presença da enzima ativa. Inibidores de serinoproteases de mamíferos vêm sendo identificados em numerosas fontes, incluindo plantas, como a soja, e o ser humano. Essa classe de moléculas tem sido estudada e identificada na hemolinfa de muitos artrópodes, em espécies como *Bombyx mori*, *Locusta migratoria*, *Mythimna unipuncta*, bem como em venenos de animais peçonhentos como cobras (SHAFQAT *et al.*, 1990; CHANG *et al.*, 2001). Esses inibidores de proteases têm mostrado uma grande interação com proteases alvo selecionadas envolvidas em condições patológicas sendo um meio poderoso para o entendimento da imunidade dos insetos em nível molecular (CHERQUI *et al.*, 2001). Além disso, o uso de inibidores de proteases como agentes terapêuticos, em particular, o seu uso na inibição da transformação celular, desordens na coagulação sanguínea, osteoporose, doenças por retrovírus e câncer estão atualmente sob investigação (HOCMAN, 1992). Portanto, devido

às inúmeras aplicações de inibidores de proteases nos mais variados campos da medicina, a pesquisa destas moléculas tem despertado grande interesse.

II. OBJETIVOS

Em função do quadro epidemiológico de Erucismo Lonômico que atualmente acomete a região Sul do país e da biodiversidade de toxinas produzidas pela lagarta *L. obliqua* que podem ser utilizadas como ferramentas biotecnológicas, é nosso objetivo no presente trabalho:

- Analisar a ação do extrato de cerdas da lagarta *L. obliqua* sobre diferentes glicosaminoglicanos.
- Caracterizar bioquimicamente a enzima que apresenta essa ação determinando sua massa molecular e pH ótimo para sua atividade.
- Determinar qual o perfil de atividade enzimática da enzima em questão incluindo mecanismo de clivagem e análise dos fragmentos gerados.
- Verificar a atividade enzimática sobre os glicosaminoglicanos organizados na matriz extracelular em tecido animal.
- Avaliar a presença de inibidores de proteases na hemolinfa da lagarta e determinar sua especificidade.
- Caracterizar bioquimicamente este inibidor determinando sua massa molecular e avaliando o grau reversibilidade de inibição.
- Purificar a molécula inibidora por ensaios cromatográficos visando um estudo mais aprofundado incluindo o seqüenciamento da proteína e produção de anticorpos.

3.1. Animais

Foram utilizadas larvas de sexto instar de *L. obliqua* fornecidas pelo Centro de Zoonoses da Secretária do Estado da Saúde do Paraná bem como coletadas no Zoológico do Parque Iguazu na cidade de Curitiba. Foram utilizados cortes de derme de coelhos neozelandeses fornecidos pelo Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

3.2. Reagentes

O ácido hialurônico de cordão umbilical bovino, o condroitim sulfato de cartilagem bovina, dermatam sulfato de pele suína, a hialuronidase testicular bovina e a hialuronidase bacteriana de *Streptomyces hyalurolyticus*, assim como, a agarose, os marcadores de massa molecular, a streptavidina conjugada com fluoresceína, o anticorpo policlonal que reconhece IgG de camundongo marcado com fosfatase alcalina, o 3- aminopropiltriétoxisilano e o fibrinogênio e a trombina purificados de plasma humano foram adquiridos da Sigma, St. Louis, EUA. O heparam sulfato de pâncreas bovino e a proteína de ligação a ácido hialurônico biotinilada (probe) foram fornecidos pela Escola Paulista de Medicina-UNIFESP/EPM. A gelatina, as membranas de nitrocelulose e os substratos cromógenos para fosfatase alcalina (BCIP/NBT) foram adquiridos da Gibco, BRL, Bethesda, EUA. As cromatografias de gel filtração e afinidade foram processadas em Sephadex G-100 e Tripsina-Agarose adquiridas da Pharmacia, Uppsala, Suécia e Sigma, St. Louis, EUA respectivamente. O DAPI 4-6-diamino-2-fenilindol dicloreto foi obtido da Molecular Probes, Eugene, OR, EUA. As enzimas proteolíticas utilizadas (tripsina, elastase, quimotripsina, proteinase K, papaína, pepsina e collagenase) foram adquiridas também da Sigma. A fibronectina (ENGVALL *et*

al., 1977) e vitronectina (YATOGHO *et al.*, 1988) foram purificadas de plasma humano e a laminina de tumor EHS (PAULSSON *et al.*, 1987). Todos os outros reagentes químicos utilizados para confecção deste trabalho foram reagentes de grau analítico.

3.3. Coleta de hemolinfa e das cerdas da lagarta *L. obliqua*

Para a extração da hemolinfa foram feitas pequenas incisões nas falsas patas na parte ventral do corpo do animal sem anestesia-lo. O líquido, amarelo e cristalino, foi coletado com o auxílio de micropipeta e armazenado em microtubos submetidos a posterior congelamento a -20°C. Para a extração das cerdas que revestem o corpo do animal, este foi previamente anestesiado com clorofórmio para que permanecesse imóvel durante a extração. As cerdas foram retiradas uma a uma com o auxílio de pinça e tesoura de ponta fina. Todo o material de segurança necessário para a extração foi utilizado, tais como máscara, óculos de segurança e luvas.

3.4. Processamento da hemolinfa e das cerdas da lagarta *L. obliqua*

Para a total retirada de qualquer contaminante macroscópico da hemolinfa, tais como restos de tecidos do animal, estes materiais passaram por sucessivas centrifugações a 13000g por cinco minutos, sendo o precipitado descartado e o sobrenadante congelado em microtubos. No processamento das cerdas, utilizou-se um grau e um pistilo para a total trituração das mesmas e um pequeno volume (aproximadamente 5mL) de uma solução de PBS (salina em tampão fosfato pH 7,3) como solução mordente. O extrato obtido foi então sucessivas vezes centrifugado a 13000g por cinco minutos para a retirada das partículas sólidas. O líquido claro e

esverdeado resultante foi armazenado em microtubos sob congelamento a -20°C .

3.5. Dosagem de proteínas dos extratos das cerdas e hemolinfa

A dosagem de proteínas presentes nesses materiais foi feita através do método de Bradford que se utiliza do corante Azul de *Coomassie*. A dosagem é feita em um microensaio utilizando placa de 96 poços e leitura em espectrofotômetro (Meridian ELX 800) com filtro de 595nm (BRADFORD, 1976).

3.6. Eletroforese em Gel de Agarose

O método de microeletroforese em gel de agarose, desenvolvido por Jaques *et al.* (1968) e modificado por Dietrich & Dietrich (1976) se baseia no uso de lâminas de gel de agarose (0.55%) submetidas a uma corrida eletroforética em caixa refrigerada sob uma voltagem constante de 100V. Os tampões de corrida utilizados foram Tris-Acetato pH 9,0 para melhor separação do ácido hialurônico ou PDA (diaminopropano) pH 8,0 para melhor separação dos outros GAGs. Após a corrida os glicosaminoglicanos presentes no gel são precipitados pela imersão da lâmina em solução de Cetavlon (Brometo de Cetiltrimetilamônio) 0,1% por duas horas a temperatura ambiente. O gel é seco e corado com solução de azul de toluidina 0,1% em ácido acético 1% e etanol 50%.

3.7. Experimentos de Zimograma

Os zimogramas foram feitos usando SDS-PAGE 10% ou 15% contendo $340\mu\text{g/mL}$ de ácido hialurônico ou solução de gelatina 1% como substrato. As

amostras em estudo, diluídas em tampão Laemmli, em condições não redutoras, foram submetidas à eletroforese (15mA) à 4° C. Após a migração eletroforética, os géis foram incubados 2 vezes em Triton X-100 (Reagen, RJ, BR) 2,5% por 20 minutos cada e em seguida incubados à 37°C em tampão ótimo para a atividade enzimática que inclui basicamente 50 mM de solução tampão no pH adequado, 200mM de NaCl, 5 mM de CaCl₂ e 5 mM de MgCl₂ para a zimografia com substrato protéico e 50 mM de solução tampão no pH adequado, 150mM de NaCl e 0,5 mM de CaCl₂ para zimografia com glicosaminoglicano. Na zimografia reversa para estudo de inibidores de proteases adiciona-se tripsina a 1mg/mL no tampão ótimo e, após o período de incubação, a digestão é interrompida por uma lavagem em solução 10% de ácido acético. Os géis são corados pelo Azul de Alcian (ácido hialurônico) ou pelo Azul de Coomassie (gelatina). As zonas claras que se sobressaem no gel contra um fundo corado demonstram a presença de atividade proteolítica na amostra, enquanto que as zonas coradas evidentes sobre o fundo digerido mostra a presença de inibidores de proteases (MIURA *et al.*, 1995; CHERQUI *et al.*, 2001).

3.8. Determinação do Perfil da Atividade Enzimática da Hialuronidase

Com o objetivo de determinar a natureza da atividade degradatória da hialuronidase presente no extrato das cerdas, alíquotas de ácido hialurônico foram incubadas à 37°C por 16 horas com extrato bruto de cerdas, com 4U de hialuronidase de *Streptomyces hyalurolyticus*, uma típica enzima liase, ou com 4U de hialuronidase testicular bovina, uma típica enzima hidrolase. As misturas reacionais foram submetidas à leitura em espectrofotômetro na região de

ultravioleta (190-340nm) e os resultados expressos na forma de curvas de absorção (GREILING *et al.*, 1957).

Em um outro experimento, alíquotas de ácido hialurônico foram incubadas com extrato de cerdas à 37°C. Após 2h, 4h, 8h, 24h e 48h de incubação, amostras foram coletadas e analisadas pelo método de Reissig (1955) o qual baseia-se em uma reação colorimétrica resultante da interação entre o reagente p-dimetilaminobenzaldeído (DMAB) e os resíduos de N-acetilglucosamina terminais originados a partir da hidrólise do ácido hialurônico. Os resíduos de N-acetilglucosamina se convertem sucessivamente em cromógenos 1 e 2 sob condições alcalinas a 100°C e posteriormente em cromógeno 3 pela adição de solução ácida. Este cromógeno 3, então, reage com o DMAB e resulta em um produto colorido que pode ser detectado a 585nm.

3.9. Fluorescência em tecido

Para avaliação da atividade do extrato de cerdas sobre o ácido hialurônico organizado na matriz extracelular, amostras de pele de coelho foram fixadas em paraformaldeído 2% (paraformaldeído 20% em ampola da Ladd Research Industries, Burlington, UT, EUA) em PBS por 30 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, o material foi emblocado em Tissue Freezing Medium™ (Electron Microscopy Sciences, Washington, PA, EUA). Os cortes histológicos feitos em criostato foram fixados em lâminas previamente lavadas, autoclavadas e tratadas com 3-aminopropiltriétoxissilano e incubados ou não com extrato de cerda por 16h à 37°C. Foram lavados com PBS e incubados com 0.1M de glicina por 10 minutos. Seqüencialmente os cortes foram bloqueados com solução de PBS contendo 1% de albumina de soro

bovino (BSA) por 1h em temperatura ambiente. Para detecção do ácido hialurônico os cortes foram, então, incubados com proteína de ligação ao ácido hialurônico (probe) conjugada com biotina em uma diluição de 1:40 em PBS/0.3%Tween-20. As lâminas foram lavadas 10 vezes com PBS e bloqueadas com PBS-1%BSA por 1h em temperatura ambiente. Finalmente, os cortes foram incubados, por 40 min ao abrigo da luz, com streptavidina conjugada com fluoresceína em uma diluição de 1:300 em PBS-1%BSA e DAPI (0.5 µg/mL) para análise citoquímica do núcleo celular. As lâminas foram lavadas em PBS e depois em PBS/0.3%Tween-20 (MARTINS *et al.*, 2003). Depois da lavagem, as laminas foram montadas com Fluormont-G (Electron Microscopy Sciences, Washington, PA, EUA) e observadas em microscópio de fluorescência confocal (Confocal Radiance 2, 100, BioRad, Hercules, EUA) acoplado a um microscópio Nikon-Eclipse E800 com objetivas Plan-Apochromatic (Sciences and Technologies Group Instruments Division, Melville, EUA).

3.10. Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida na presença de SDS

Eletroforeses foram realizadas em géis de poliacrilamida SDS-PAGE 7.5% em condições redutoras como descrito (LAEMMLI *et al.*, 1970). Os géis são submetidos a uma corrente constante de 30mA. Após corrida eletroforética os géis foram corados pela incubação por 20 minutos com o corante Azul de *Coomassie*.

3.11. Imunoensaio de Western Blotting

Após corrida eletroforética, as proteínas são transferidas para membranas de nitrocelulose em uma cuba específica (Bio Rad) a uma voltagem constante (25V) por 16 horas à 4°C. As membranas de nitrocelulose contendo as proteínas transferidas são coradas com *Ponceau-S* (Sigma) para verificação da eficiência da transferência. Posteriormente, as membranas são descoradas com água deionizada e têm seus sítios inespecíficos bloqueados com solução PBS-leite desnatado 3% (p/v) por 2 horas. A seguir, são incubadas com o anticorpo primário que reconhece fibronectina produzido em nosso laboratório como descrito por Harlow e Lane em 1988, em diluições pré-determinadas por 2 horas e, então, lavadas novamente com PBS-leite desnatado 3% (3 vezes de 10 minutos). Para visualizar a imunorreação, incubam-se as membranas com anticorpo anti-IgG específico conjugado com fosfatase alcalina por duas horas e, então, após lavagens com PBS-leite desnatado 3% (3 vezes de 10 minutos), PBS (1 vez de 10 minutos) e tampão ótimo para fosfatase alcalina (1 vez de 10 minutos), adiciona-se solução 0,33% de BCIP e 0,44% NBT em tampão ótimo para fosfatase alcalina (HARLON & LANE, 1988).

3.12. Cromatografia de Gel Filtração

Em coluna de 65cm de comprimento e 2,5 cm de diâmetro, preenchida com resina Sephadex G-100 hidratada, foi aplicado um volume de aproximadamente 2,5mL contendo 25mg de hemolinfa de *L. obliqua* filtrada em filtro 0,22 μ m. Para controlar a eluição da amostra foram usados bomba

peristáltica (0,34ml/min), coletador de frações (2mL/tubo) e detector com leitura para faixa de 280nm (Econo System, Bio Rad, Hercules, EUA).

3.13. Cromatografia de Afinidade

Em coluna de 10cm de comprimento e 2cm de diâmetro, preenchida com 5mL de resina Tripsina-Agarose, foi aplicado um volume de aproximadamente 100mL a 0,14mg/mL, contendo a mistura das frações com atividade coletadas no ensaio de gel filtração da hemolinfa da lagarta. Este material ficou ciclando pela coluna por 16 horas. Para eluição, controlada por uma bomba peristáltica (0,34ml/min), utilizou-se solução de glicina 0,1M pH 2,6. As frações eluídas foram neutralizadas à pH 7,0 com solução de Tris-HCl pH 9,5 e monitoradas por leitura em espectrofotômetro a 280 nm (TRONCOSO *et al.*, 2003).

3.14. Análise da atividade inibitória das frações pré-purificadas da hemolinfa da lagarta *L. obliqua* sobre a ação da trombina

Em tubos de ensaio contendo alíquotas de solução de fibrinogênio de plasma humano purificado 1mg/mL, adicionou-se 0,1U de trombina pré-incubada à 37°C por 4 horas com alíquotas das frações pré-purificadas da hemolinfa. A formação de coágulos foi visualizada usando corante *Ponceau-S* (Sigma). O coágulo transparente contra o fundo escuro obtido pelo uso do corante indica a atividade da trombina.

4.1. Pesquisa de atividade hialuronidásica no extrato de cerdas da lagarta *L. obliqua*

4.1.1. Análise da degradação de glicosaminoglicanos pelo extrato de cerda de *Lonomia obliqua*.

Baseando-se no fato de que o efeito sistêmico é a consequência mais grave nos casos de Erucismo Lonômico e que tal efeito decorre do espalhamento das toxinas pelo corpo, avaliamos a presença de atividade hialuronidásica no extrato de cerdas da lagarta, uma vez que estas enzimas têm sido reportadas como sendo fatores de espalhamento e estão presentes na peçonha de muitos animais estudados (GIRISH *et al.*, 2004). Ácido hialurônico purificado foi incubado em uma razão de 1:1 com extrato de cerdas de *L. obliqua* por 16 horas à 37°C. O perfil de degradação foi analisado através de uma eletroforese em gel de agarose utilizando tampão Tris-Acetato pH 8.0 e coloração por Azul de Toluidina. Como mostrado na FIGURA 3A, podemos observar que o ácido hialurônico foi totalmente degradado. O extrato de cerda também foi incubado com heparam sulfato (HS), dermatam sulfato (DS) e condroitim sulfato (CS) para caracterizar esta atividade enzimática. Estes glicosaminoglicanos foram incubados em uma razão (substrato:extrato) de 1:1 e 1:3 nas mesmas condições experimentais descritas acima. Como visto na FIGURA 3B, não houve degradação de HS e DS nas condições testadas. Por outro lado, o CS foi degradado mesmo na menor razão de substrato:extrato. Estes resultados, em conjunto, suportam a hipótese de haver atividade hialuronidásica no extrato das cerdas da lagarta *L. obliqua*.

4.1.2. Análise comparativa do perfil de degradação do ácido hialurônico pelo extrato de cerdas de *L. obliqua* e avaliação dos fragmentos gerados por esta atividade.

Como detectamos atividade lítica do extrato de cerdas da lagarta sobre ácido hialurônico e condroitim sulfato, pensamos em comparar esta atividade hialuronidásica com duas outras hialuronidasas bem estabelecidas na literatura para melhor caracterizar a enzima em questão. Alíquotas de ácido hialurônico foram incubadas à 37°C por 16 horas, com extrato de cerdas de *L. obliqua*, hialuronidase de *Streptomyces hyalurolyticus* (uma típica enzima liase) ou com hialuronidase testicular bovina (uma típica enzima hidrolase) em uma razão de 2:1 (substrato:extrato) ou 150µg de ácido hialurônico e 4U das hialuronidasas purificadas. A hialuronidase liase degrada o ácido hialurônico gerando fragmentos insaturados de ácido glucurônico na extremidade não redutora que possuem intensa absorção em 210-230nm (OHYA & KANEKO, 1970). Já os produtos gerados pela hialuronidase hidrolase geram fragmentos de N-acetilglucosamina na extremidade redutora. Os produtos de digestão foram analisados por leitura em espectrofotômetro na região do ultravioleta (190-340nm). Como mostrado na FIGURA 4A, os fragmentos de ácido hialurônico gerados pela hialuronidase do extrato de cerdas se assemelham àqueles obtidos pela degradação do ácido hialurônico com a hialuronidase testicular bovina, apontando a hialuronidase do extrato como sendo uma enzima hidrolítica. Uma vez descrevendo a hialuronidase do extrato como uma hidrolase, o mecanismo hidrolítico da enzima foi posteriormente investigado. As hialuronidasas podem ser caracterizadas como endoβ-N-acetilhexosaminidasas que clivam as ligações glicosídicas (1-4) β-N-

acetilhexosamina (MEYER *et al.*, 1960) ou endo β -glucuronidase que clivam as ligações glicosídicas (1-3) β -ácido glucurônico (YUKI & FISHMAN, 1963; OLIVEIRA *et al.*, 1994). Este ensaio foi feito através de um experimento de cinética (0-48horas) à 37°C em uma razão de 1:1 (substrato:extrato). Os fragmentos de ácido hialurônico gerados foram analisados por uma reação colorimétrica como descrito por Reissig (1955) para estimativa dos resíduos de açúcares N-acetilglucosamina na extremidade redutora. Como observado na FIGURA 4B, a reação colorimétrica foi positiva, identificando a hialuronidase do extrato de cerdas de *L. obliqua* como uma enzima do tipo endo- β -N-acetilhexosaminidase. Este tipo enzimático degrada ácido hialurônico que contém resíduos de β -D-N-acetilglucosamina, assim como condroitim sulfato que contém unidades de β -D-N-acetilgalactosamina.

4.1.3. Detecção de hialuronidases de 49kDa e 53kDa no extrato de cerdas de *L. obliqua*.

Após detectar a atividade lítica sobre ácido hialurônico e condroitim sulfato caracterizando o perfil de clivagem da enzima, partimos para uma melhor caracterização bioquímica da molécula. Um experimento de zimografia, utilizando ácido hialurônico (340 μ g/mL) como substrato e 2 μ g de extrato de cerdas foi realizado para determinação da massa molecular da enzima. Como visualizado na FIGURA 5, existe atividade lítica sobre o ácido hialurônico nas regiões de 49 kDa e 53kDa, confirmando a existência de hialuronidases no extrato.

4.1.4. Avaliação da atividade ótima das hialuronidases do extrato de cerdas de *L. obliqua* em função do pH.

A atividade lítica das hialuronidases do extrato de cerdas da lagarta foi avaliada perante alterações do pH no tampão ótimo. Alíquotas de 2 μ g de extrato de cerdas foram submetidas a um ensaio de zimograma copolimerizado com ácido hialurônico. O ensaio transcorreu sob diferentes condições de pH (50mM tampão acetato pH 5,0 e pH 6,0 e 50mM tampão Tris-HCl pH 7,0 e pH 8,0). As zonas lisadas do zimograma foram mensuradas com o auxílio do software Scion Image for Windows 95/98 (Microsoft Windows®). Como exposto nas FIGURAS 6A e 6B, as hialuronidases do extrato de cerdas parecem possuir uma faixa ótima de pH que vai de condições fracamente ácidas, pH 6,0, até neutras, pH 7,0.

4.1.5. Estudo da atividade das hialuronidases do extrato de cerdas de *L. obliqua* sobre ácido hialurônico organizado na matriz extracelular (MEC) tecidual.

Finalmente examinamos a atividade hialuronidásica do extrato de cerdas da lagarta sobre ácido hialurônico organizado na MEC, onde se encontra ancorado a outras moléculas constituintes desta matriz. Amostras de pele de coelho foram incubadas com extrato de cerdas de *L. obliqua* por 16 horas à 37°C. O ácido hialurônico presente nas amostras foi detectado por reação de fluorescência utilizando proteína de ligação a ácido hialurônico (probe) conjugada com biotina e streptavidina conjugada com fluoresceína. Os resultados foram analisados usando microscopia confocal. Como evidenciado na FIGURA 7, os cortes histológicos tratados com o extrato de cerdas revelam um decréscimo em seu padrão de fluorescência para ácido hialurônico,

demonstrando que as hialuronidases do extrato são capazes de degradar ácido hialurônico mesmo organizado na MEC.

4.2. Pesquisa da presença de inibidores de proteases na hemolinfa da lagarta *L. obliqua*.

4.2.1. Detecção da atividade inibitória da hemolinfa bruta de *L. obliqua* sobre a atividade proteolítica da tripsina.

Com base em trabalhos que indicam a presença de toxinas caracterizadas como serinoproteases no extrato de cerdas da lagarta *L. obliqua* provavelmente envolvidas com os efeitos sistêmicos acarretados pelo erucismo (AMARANT *et al.*, 1991; DONATO *et al.*, 1998; REIS *et al.*, 2001a; REIS *et al.*, 2001b), consideramos a hipótese de identificarmos um inibidor de protease na hemolinfa do animal com a possível função de defesa da lagarta contra suas próprias toxinas, ou mesmo, com função tóxica evidenciada nos acidentes. Fibronectina humana purificada (substrato protéico) foi incubada com tripsina na presença de hemolinfa bruta de *L. obliqua* em uma razão de 100:1:100 (substrato:enzima:substrato) por 4 horas à 37°C. As amostras foram submetidas a um gel de eletroforese SDS-PAGE 7,5% sob condições redutoras e transferidas para uma membrana de nitrocelulose. O perfil da fibronectina foi visualizado por imunorreação utilizando anticorpos que reconhecem esta molécula em uma diluição de 1:1000. Como pode ser visualizado na FIGURA 8, a hemolinfa da lagarta foi capaz de inibir significativamente a degradação da fibronectina pela tripsina, uma enzima pertencente à família das serinoproteases. Este dado evidencia a presença de inibidor de proteases na hemolinfa da lagarta.

4.2.2. Detecção da atividade inibitória da hemolinfa bruta de *L. obliqua* sobre a atividade proteolítica de diferentes famílias enzimáticas.

Com o intuito de melhor caracterizar a natureza bioquímica desta atividade inibitória verificamos se esta atividade exercida pela hemolinfa da lagarta sobre a atividade proteolítica da tripsina se estendia a outras famílias enzimáticas. Fibronectina humana purificada (substrato protéico) foi incubada com diferentes enzimas proteolíticas na presença de hemolinfa bruta de *L. obliqua* e submetidas as mesmo ensaio descrito no item acima. Como mostrado na FIGURA 9, podemos observar que a hemolinfa da lagarta foi capaz de inibir totalmente a degradação da fibronectina pela elastase e pela quimotripsina (serinoproteases) e de inibir parcialmente a degradação pela proteinase K (serinoprotease de amplo espectro). Observa-se também que não houve inibição da degradação da fibronectina pela pepsina (protease ácida), pela papaína (tiolprotease) e que houve uma inibição mínima da atividade da collagenase V e veneno de aranha marrom (metaloproteases). Estes resultados fortalecem a hipótese da presença de inibidor de proteases na hemolinfa da lagarta e apontam este como sendo um forte inibidor de serinoproteases.

4.2.3. Pré-purificação do inibidor de protease presente na hemolinfa de *L. obliqua* por cromatografia de gel filtração.

Buscando purificar a molécula do inibidor de protease descrita, conduzimos um ensaio cromatográfico em resina Sephadex G-100. Partimos de 100mg de hemolinfa bruta e coletamos as frações eluídas em alíquotas de 2mL monitoradas por absorvância a 280 nm. Este material foi normalizado para proteínas considerando a absorvância das frações eluídas e foi submetido à incubação com fibronectina humana purificada e tripsina em razão de

100:100:1 à 37°C por 4 horas. As amostras foram submetidas a eletroforese em SDS-PAGE 7,5% sob condições redutoras e o gel corado por Azul de *Coomassie*. De acordo com a FIGURA 10A e 10B, pode-se observar que as frações concentradas no vale gerado no cromatograma (absorbância em torno de 0,2) possuem atividade inibitória sobre a tripsina.

4.2.4. Purificação do inibidor de proteases presente na hemolinfa de *L. obliqua* por cromatografia de afinidade.

Buscando otimizar a purificação da molécula do inibidor de protease descrita, conduzimos seqüencialmente um ensaio cromatográfico de afinidade em resina Tripsina-Agarose. Uma mistura das frações com atividade inibitória eluídas da gel filtração foi aplicada na coluna e ciclou durante 16 horas a 4°C. A eluição foi realizada utilizando solução de glicina 0,1M pH 2,6. As amostras eluídas foram neutralizadas a pH 7,0 utilizando solução de Tris-HCl pH 9,5 e monitoradas em absorbância em 280 nm como pode ser visualizado na FIGURA 11A. Com o objetivo de caracterizar bioquimicamente o inibidor de protease identificado na hemolinfa da lagarta, realizamos um experimento de zimografia reversa. Alíquotas de 2,5µg do material pré-cromatografia de afinidade, do eluato da afinidade e do pós-cromatografia de afinidade foram submetidas a um ensaio de SDS-PAGE 15% impregnado com gelatina. Após corrida eletroforética, o gel foi incubado com solução tampão contendo 0,1mg/mL de tripsina por 2 horas à 37°C. A digestão foi terminada pela lavagem com solução 10% ácido acético e o gel foi corado por Azul de *Coomassie*. Pode-se notar, na FIGURA 11B, que o inibidor de protease descrito na hemolinfa da lagarta *L. obliqua* possui mobilidade eletroforética difusa na região de 21kDa. A purificação do inibidor de proteases foi eficiente,

uma vez que, na análise das amostras normalizadas por Bradford (1976), sua atividade está mais concentrada cerca de 2X no eluato quando comparada a atividade do pré-afinidade. Este dado, não mostrado, foi obtido pelo auxílio do software Scion Image for Windows 95/98 (Microsoft Windows®).

4.2.5. Análise da atividade inibitória da hemolinfa de *L. obliqua* sobre atividade proteolítica da tripsina utilizando diferentes substratos protéicos.

Com o intuito de descartar a possibilidade de que uma ligação do inibidor de protease a um sítio da molécula de fibronectina pudesse causar um impedimento estérico que resultasse em uma falsa inibição da proteólise pela tripsina, buscamos testar a atividade inibitória desta molécula utilizando diferentes substratos protéicos. Alíquotas de fibrinogênio, laminina e vitronectina foram incubadas com tripsina na presença das frações enriquecidas para atividade inibitória obtidas pela cromatografia de gel filtração em uma razão de 300:3:100 à 37°C por 4 horas. As misturas reacionais foram submetidas a SDS-PAGE 7,5% sob condições redutoras para laminina e vitronectina e não redutoras para o fibrinogênio e o perfil protéico foi visualizado por coloração com Azul de *Coomassie*. Como visto na FIGURA 12, o inibidor de protease presente na hemolinfa possui atividade inibitória sobre a degradação proteolítica de diferentes proteínas da matriz extracelular sugerindo uma ligação específica deste inibidor a um determinado sítio da molécula enzimática.

4.2.6. Análise da reversibilidade da inibição da atividade proteolítica da tripsina causada pelo inibidor de protease presente na hemolinfa da lagarta *L. obliqua*.

Adicionalmente, avaliamos se o efeito inibitório sobre a ação de serinoproteases da hemolinfa da lagarta era de natureza reversível ou irreversível. Para isso, alíquotas de 0,1 μ g de tripsina foram incubadas com concentrações crescentes das frações pré-purificadas da hemolinfa obtidas pelo ensaio de gel filtração (10, 20 e 40 μ g) por 4 horas à 37°C e, então, foram submetidas a um zimograma em SDS-PAGE 15% impregnado com gelatina. Como pode-se observar na FIGURA 13, a interação entre o inibidor de proteases da hemolinfa e a tripsina resistiu ao SDS e à corrida eletroforética mas não houve bloqueio significativo da atividade proteolítica da tripsina e sim, apenas uma alteração em seu perfil de mobilidade.

4.2.7. Análise da atividade do inibidor de proteases da hemolinfa da lagarta *L. obliqua* sobre a ação catalítica da trombina.

Com o objetivo de obter maiores informações sobre a atividade biológica do inibidor de serinoproteases da hemolinfa de *L. obliqua* e a fim de especular sobre futuras aplicações biotecnológicas com base no fato de que se espera que um inibidor de protease não tenha capacidade de bloquear enzimas que participam de atividades catalíticas vitais ao organismo, avaliamos a ação do inibidor de proteases da hemolinfa em relação a atividade coagulatória da trombina sobre fibrinogênio. Alíquotas de 500 μ g de fibrinogênio foram incubadas, em tubos de ensaio, com trombina pré-incubada ou não por 4h a 37°C com alíquotas das frações enriquecidas para atividade inibitória obtidas do ensaio de gel filtração. As amostras foram, então, avaliadas quanto ao efeito

de coagulação. Como mostrado na FIGURA 14, o inibidor de proteases não apresentou efeito sobre a atividade catalítica da trombina sendo os coágulos gerados observados pela adição de corante *Ponceau-S* (Sigma). O coágulo transparente contra o fundo escuro obtido pelo uso do corante indica a atividade da trombina.

FIGURA 3

Figura 3. Análise da degradação de glicosaminoglicanos pelo extrato de cerda de *Lonomia obliqua*.

(A) Ácido hialurônico purificado foi incubado com extrato de cerdas da lagarta em uma razão de 1:1 por 16 horas a 37°C. O perfil de degradação foi visualizado por meio de eletroforese em gel de agarose. Coluna 1 representa ácido hialurônico incubado, nas mesmas condições, com ausência de extrato de cerdas (controle negativo). Coluna 2 mostra ácido hialurônico incubado com o extrato de cerdas. Os glicosaminoglicanos utilizados como padrões para a corrida eletroforética são mostrados à esquerda da figura: condroitim sulfato (CS), dermatam sulfato (DS) e heparam sulfato (HS).

(B) Heparan sulfato (HS), dermatam sulfato (DS) e condroitim sulfato (CS) purificados foram incubados com extrato de cerdas nas razões de 1:1 e 1:3 por 16 horas a 37°C como indicado na figura. O perfil de degradação foi observado como descrito na figura A. Colunas 1, 4 e 7 representam a incubação de HS, DS e CS respectivamente na ausência do extrato de cerdas. Colunas 2, 5 e 8 mostram a incubação dos GAGs com o extrato na razão de 1:1 (substrato:extrato). Colunas 3, 6 e 9 indicam a incubação com extrato na razão de 1:3. Os glicosaminoglicanos utilizados como padrões para a corrida eletroforética são mostrados à esquerda da figura.

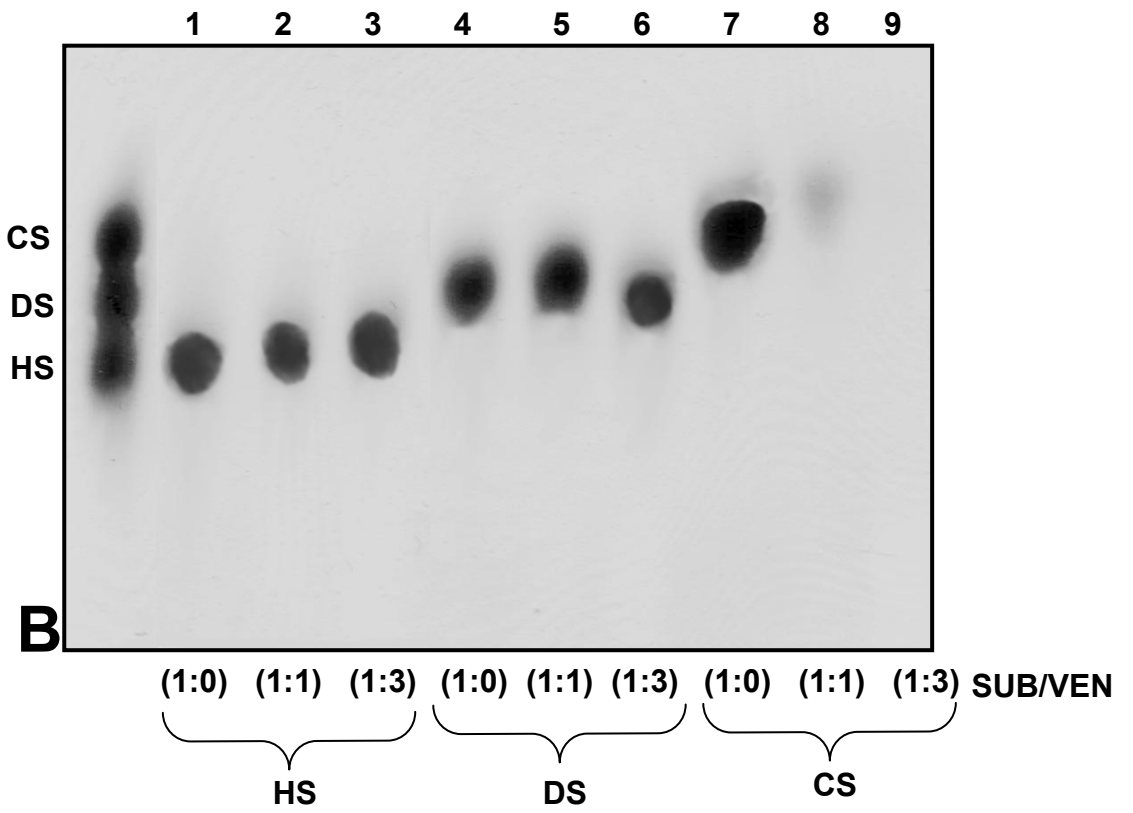
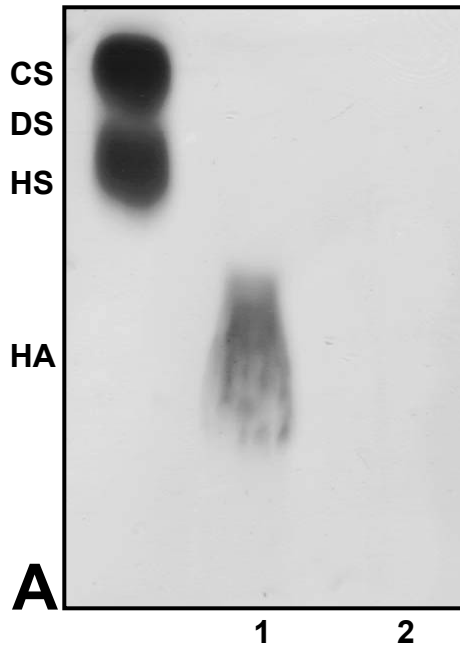


FIGURA 4

Figura 4. Análise comparativa do perfil de degradação do ácido hialurônico pelo extrato de cerdas de *L. obliqua* e avaliação dos fragmentos gerados por esta atividade.

- (A) Alíquotas de ácido hialurônico foram incubadas com extrato de cerdas (●), ou com hialuronidase bacteriana de *Streptomyces hyalurolyticus* (■) ou, ainda, com hialuronidase testicular bovina (▲) como descrito nos materiais e métodos. O gráfico mostra curves de absorção das amostras na região do ultravioleta (190-340nm).
- (B) Alíquotas de ácido hialurônico foram incubadas com extrato de cerdas por 0-48 horas como descrito nos materiais e métodos. As amostras foram submetidas a um ensaio colorimétrico que detecta resíduos de açúcares N-acetilglucosamina na extremidade reduzida. O gráfico mostra a curva de absorção das amostras em relação ao aumento nas quantidades de resíduos gerados.

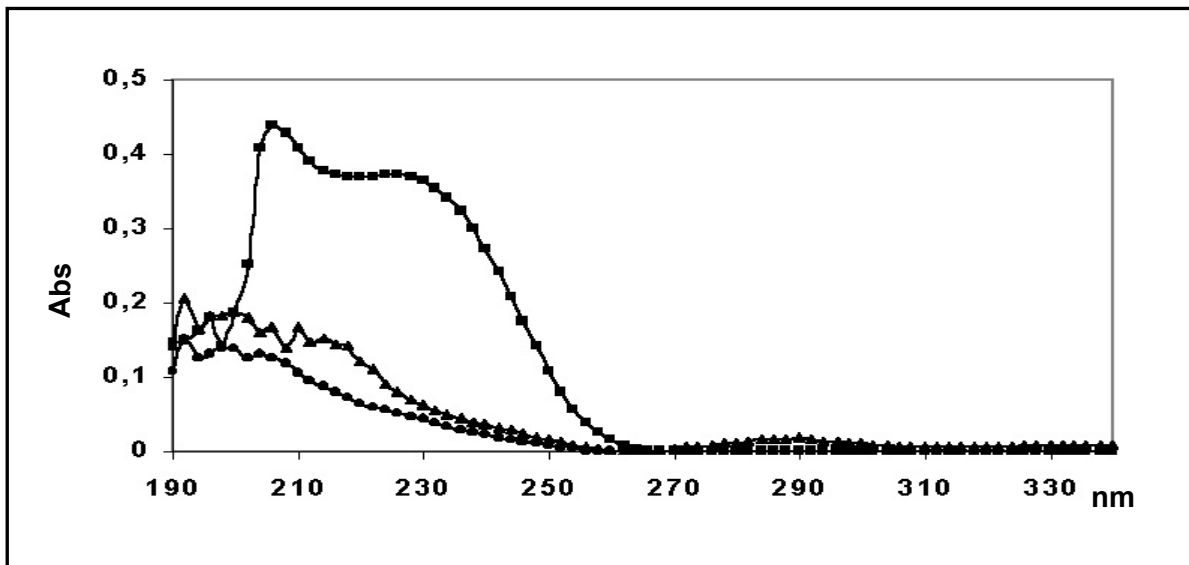
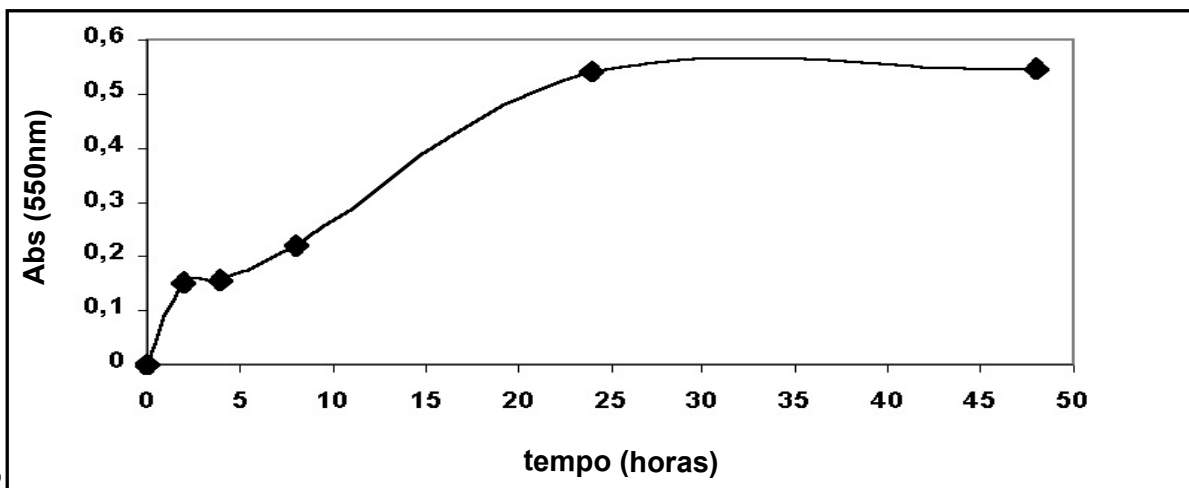
A**B**

FIGURA 5

Figura 5. Detecção de hialuronidases de 49kDa e 53kDa no extrato de cerdas de *L. obliqua*.

Extrato de cerdas da lagarta foi submetido a um ensaio de zimograma 10% SDS-PAGE impregnado com ácido hialurônico. O ensaio foi realizado com incubação em pH 7,4. O gel foi corado com o corante Azul de Alcian. As flechas revelam a presença de enzimas com mobilidade eletroforética difusa na região de 49kDa e 53 kDa. Os marcadores de massa molecular são mostrados à esquerda.

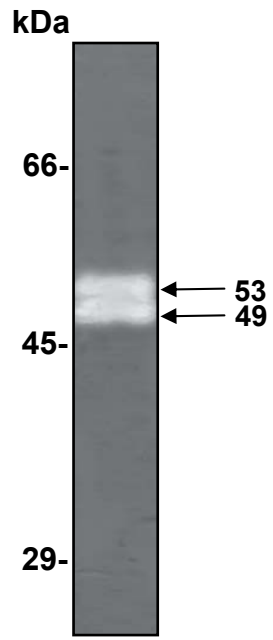


FIGURA 6

Figura 6. Avaliação da atividade ótima das hialuronidases do extrato de cerdas de *L. obliqua* em função do pH.

- (A) Alíquotas de extrato de cerdas foram submetidas a experimentos de zimograma 10% SDS-PAGE copolimerizado com ácido hialurônico. O ensaio foi realizado na presença de soluções tampão com diferentes valores de pH indicados abaixo da figura. Marcadores de massa molecular estão mostrados à esquerda.
- (B) As zonas lisadas do zimograma (figura A) foram quantificadas por densitometria. A atividade hialuronidásica está reportada em porcentagem (ordenada) em função do pH (abscissa).

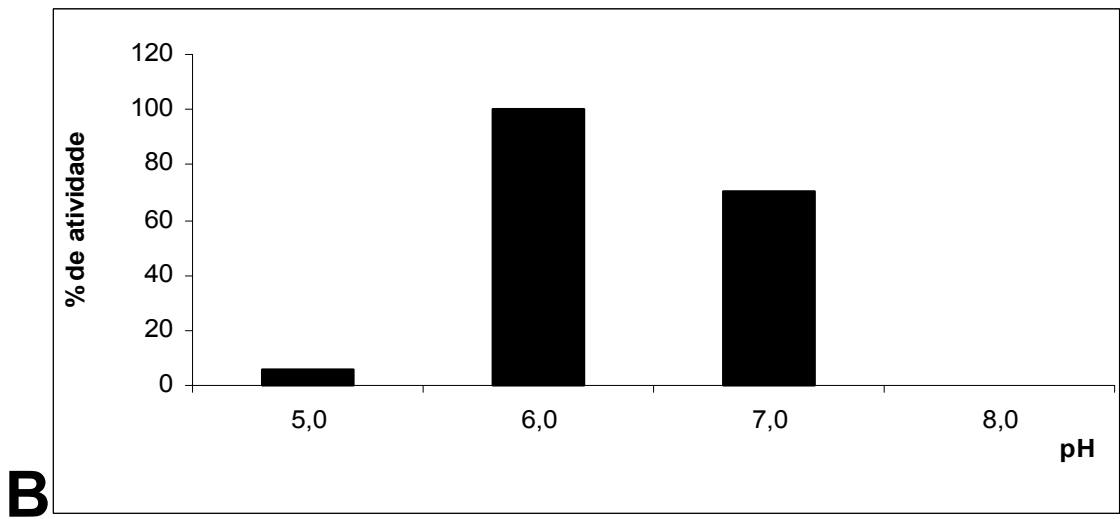
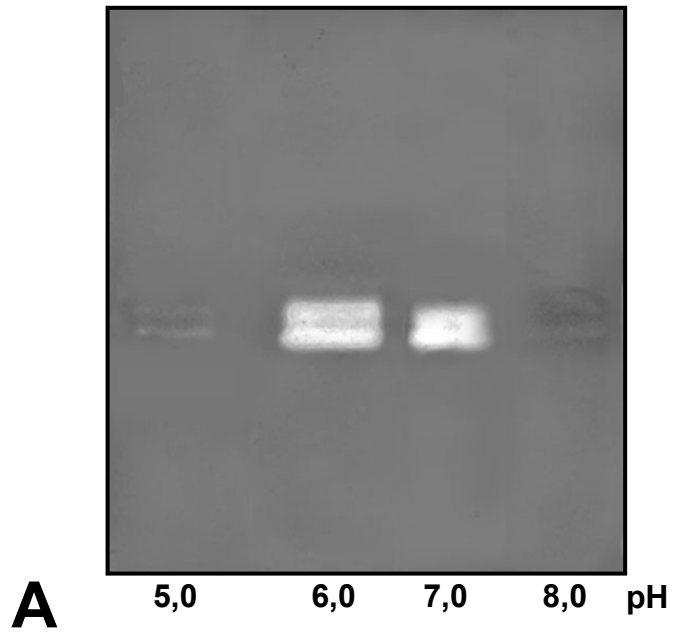


FIGURA 7

Figura 7. Estudo da atividade das hialuronidases do extrato de cerdas da lagarta *L. obliqua* sobre ácido hialurônico organizado na matriz extracelular (MEC) tecidual.

Cortes histológicos de pele de coelho foram incubados com extrato de cerdas como descrito nos materiais e métodos. As amostras foram submetidas à reação com proteína de ligação a ácido hialurônico conjugada com biotina (probe) e streptavidina conjugada com fluoresceína. O padrão de fluorescência foi avaliado por análise confocal. (A) Corte histológico exposto apenas a streptavidina como controle. (B) Corte histológico não exposto ao extrato de cerdas (controle negativo). (C) Corte histológico tratado com hialuronidase testicular bovina (controle positivo). Amostras expostas a 50 μ g (D) e 100 μ g (E) de extrato de cerdas respectivamente. Todas as lâminas foram citocimicamente marcadas para núcleo celular com o corante azul fluorescente DAPI. Magnificação 600X.

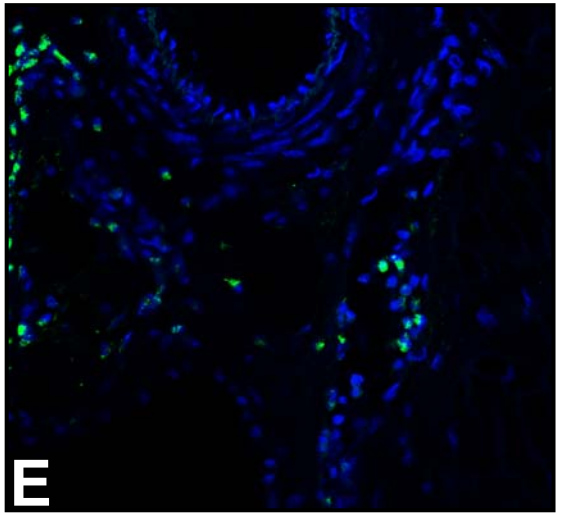
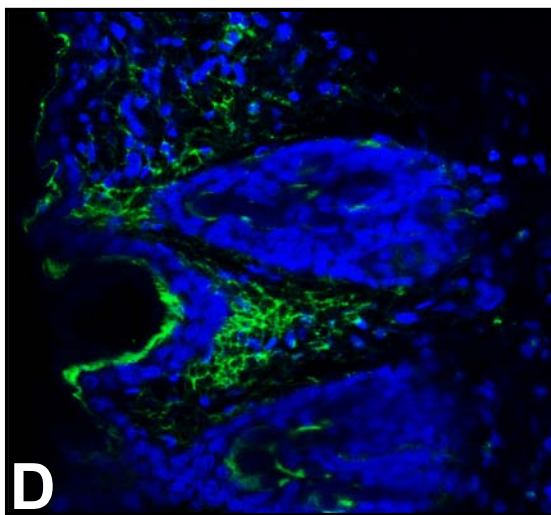
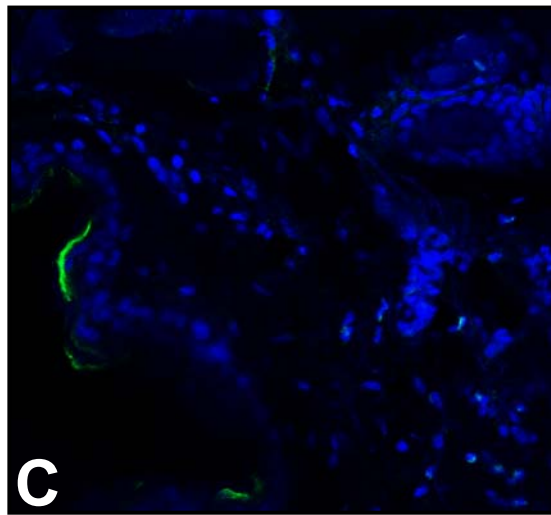
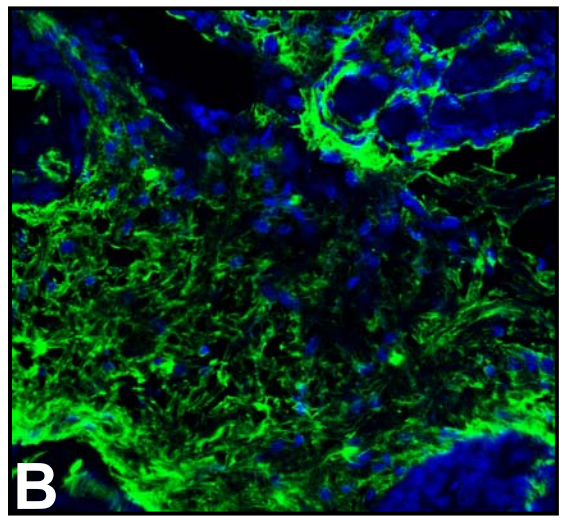
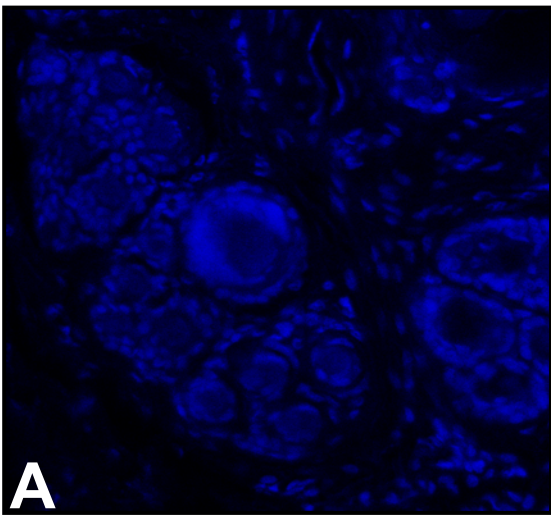


FIGURA 8

Figura 8. Detecção da atividade inibitória da hemolinfa bruta de *L. obliqua* sobre a atividade proteolítica da tripsina.

Alíquotas de fibronectina (FN) foram incubadas por 4 horas a 37°C com tripsina (TR) na presença de hemolinfa (H) da lagarta. As amostras foram submetidas a um experimento de eletroforese 7,5% (SDS-PAGE) sob condições redutoras. Após corrida eletroforética, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose e reveladas através de ensaio de *Western Blotting* utilizando anticorpos que reconhecem FN. Coluna 1: FN incubada, nas mesmas condições, na ausência de TR e H (controle experimental). Coluna 2: FN incubada com TR. Coluna 3: FN incubada com TR e H.

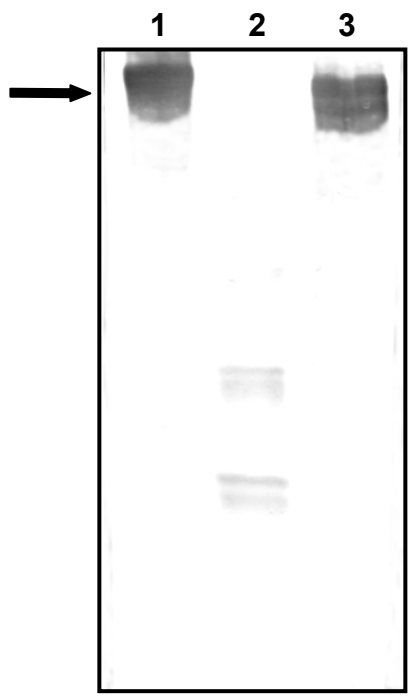


FIGURA 9

Figura 9. Detecção da atividade inibitória da hemolinfa bruta de *L. obliqua* sobre a atividade proteolítica de diferentes famílias enzimáticas.

Alíquotas de fibronectina humana purificada (FN) foram incubadas por 4 horas a 37°C com diferentes enzimas na presença de hemolinfa bruta (H) da lagarta *L. obliqua*. As amostras foram submetidas a um experimento de eletroforese 7,5% (SDS-PAGE) sob condições redutoras. Após corrida eletroforética, as proteínas do gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose e reveladas através de um ensaio de *Western Blotting* usando anticorpos que reconhecem FN. Coluna 1: FN incubada, nas mesmas condições, na ausência de enzimas e hemolinfa (controle experimental). Coluna 2: FN incubada com elastase (EL). Coluna 3: FN incubada com EL e H. Coluna 4: FN incubada com quimotripsina (CH). Coluna 5: FN incubada com CH e H. Coluna 6: FN incubada com proteinase K (PK). Coluna 7: FN incubada com PK e H. Coluna 8: FN incubada com pepsina (PEP). Coluna 9: FN incubada com PEP e H. Coluna 10: FN incubada com papaína (PAP). Coluna 11: FN incubada com PAP e H. Coluna 12: FN incubada com veneno de aranha marrom (AR). Coluna 13: FN incubada com AR e H. Coluna 14: FN incubada com colagenase V (COL). Coluna 15: FN incubada com COL e H.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

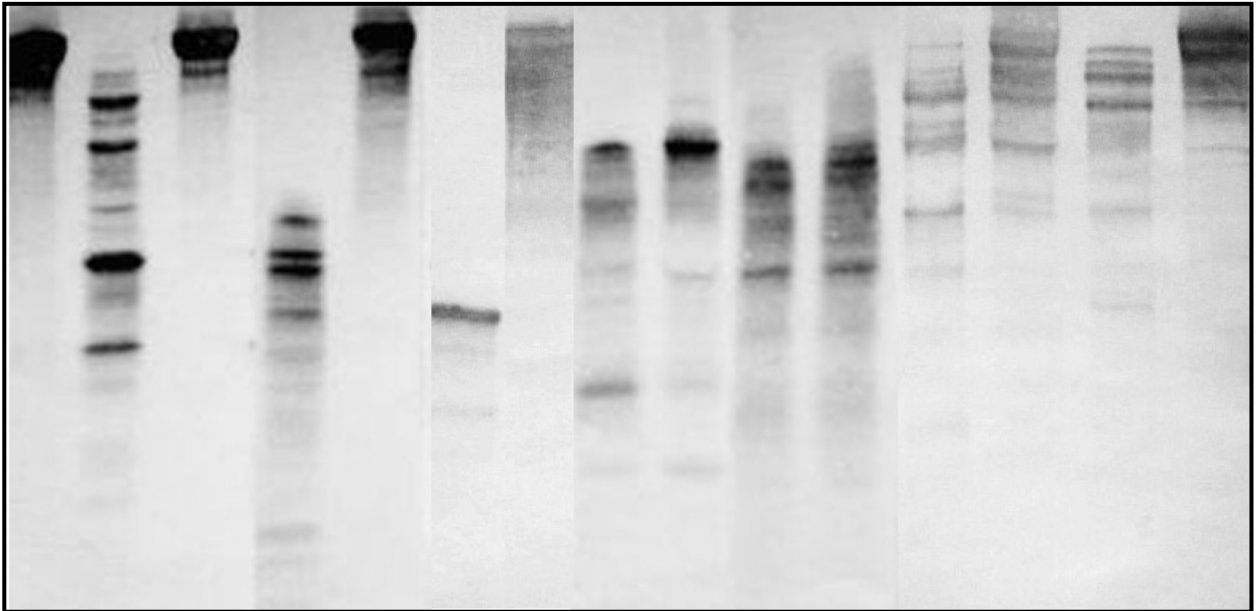


FIGURA 10

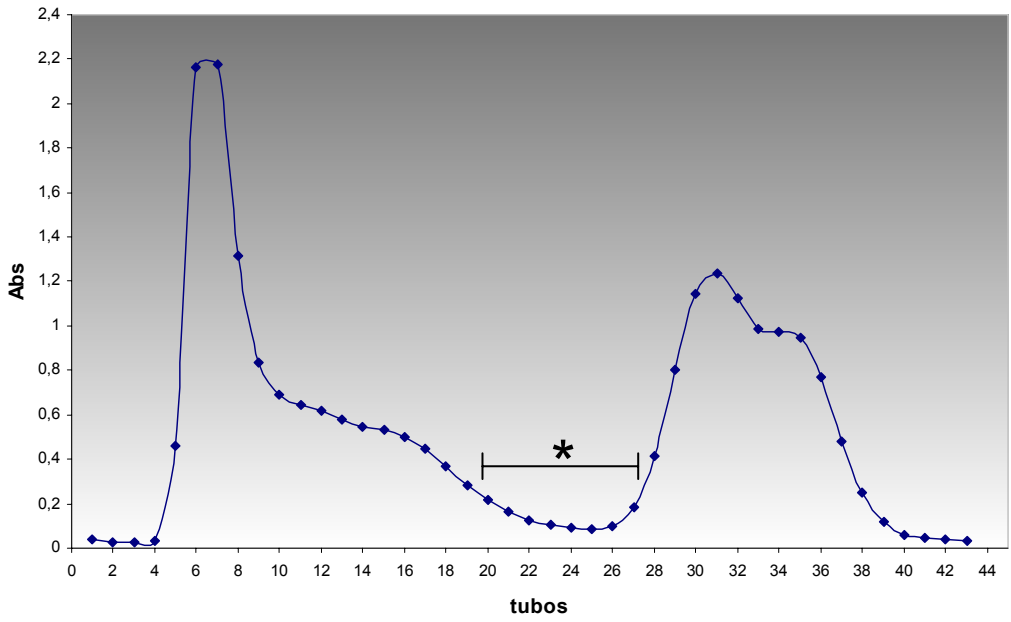
Figura 10. Cromatograma da hemolinfa bruta de *L. obliqua* e avaliação da atividade inibitória das frações eluídas (*) da gel filtração.

(A) Constituintes protéicos da hemolinfa (20mg) foram eluídos por ensaio cromatográfico de gel filtração utilizando resina Sephadex G-100. O efluente da coluna foi monitorado por absorvância em 280nm e normalizado para a presença de proteínas por esta absorvância.

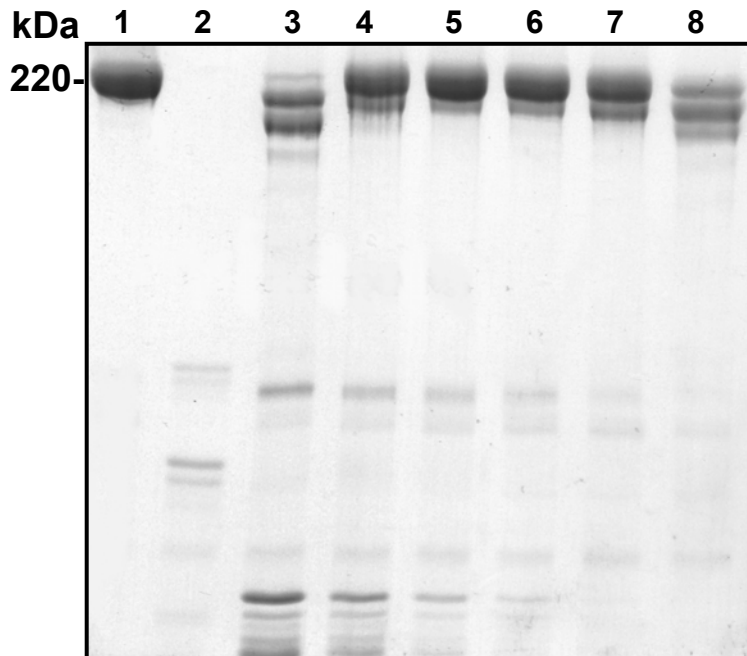
(B) Alíquotas de fibronectina humana purificada (FN) foram incubadas a 37°C por 4 horas com tripsina (TR) na presença de frações selecionadas a partir de uma varredura do cromatograma descrito na figura 10A. As amostras foram submetidas a uma eletroforese 7,5% (SDS-PAGE) sob condições redutoras sendo o gel corado com Azul de *Coomassie*. Coluna 1: FN como controle experimental. Coluna 2: FN incubada com TR. Colunas 3 - 8- FN incubada com TR na presença das frações eluídas que continham atividade.

OBS: As demais frações testadas que não continham atividade inibitória não estão mostradas na figura.

Cromatografia de Gel Filtração-Sephadex G-100



A



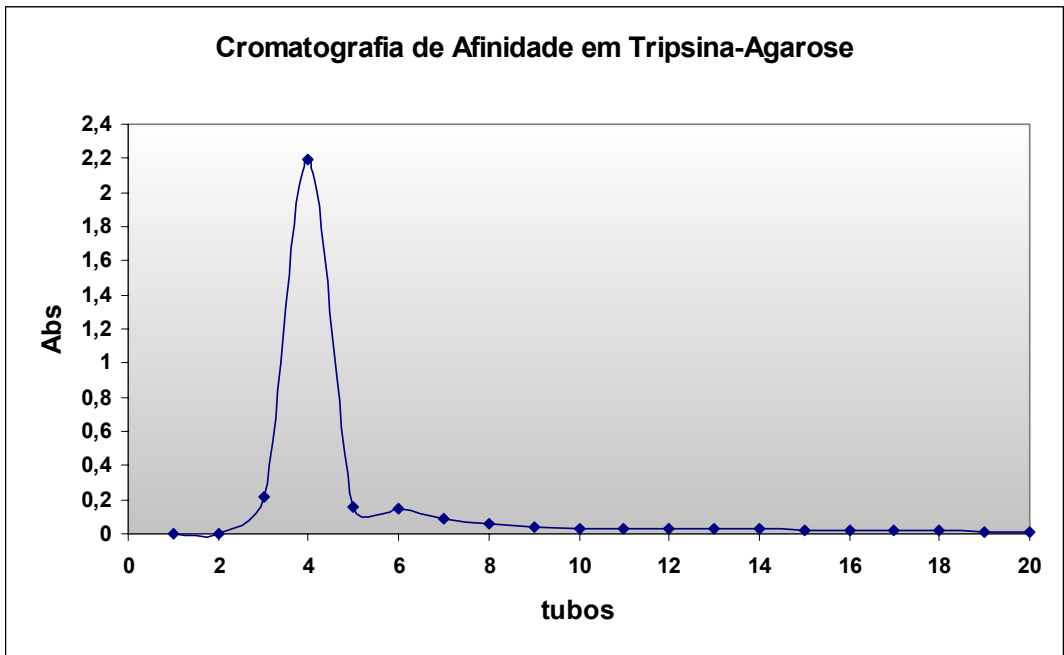
B

FIGURA 11

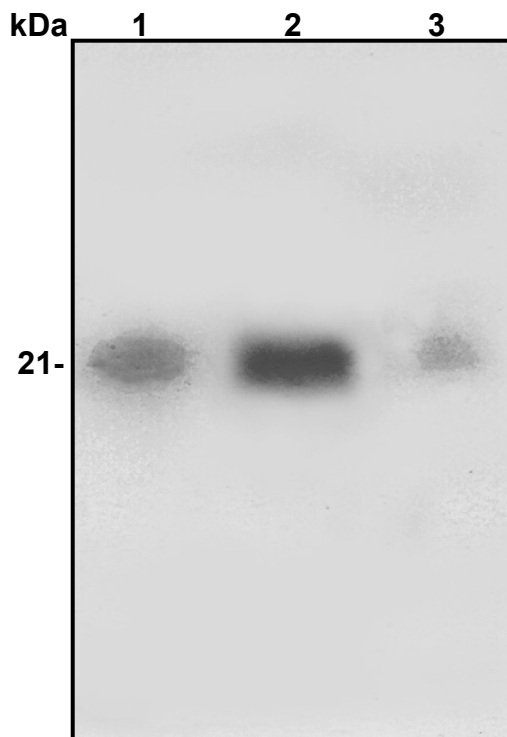
Figura 11. Purificação do inibidor de protease presente na hemolinfa de *L. obliqua* por cromatografia de afinidade.

(A) Cromatograma das frações eluídas a partir da cromatografia de gel filtração. As frações eluídas da resina Sephadex G-100 que apresentaram atividade inibitória foram submetidas a uma cromatografia de afinidade usando resina Tripsina-Agarose. O efluente da coluna foi monitorado por absorvância em 280nm e normalizado para proteínas pelo Método de Bradford.

(B) Zimografia reversa do inibidor de protease purificado a partir da cromatografia de afinidade. As amostras foram submetidas a um gel de eletroforese 15% (SDS-PAGE) impregnado com gelatina. Após corrida eletroforética, o gel foi incubado a 37°C por 2 horas em tampão contendo 0,1mg/mL de tripsina. O gel foi, então, corado com azul de *Coomassie*. As zonas de atividade inibitória são vistas positivamente coradas. Coluna 1: amostra pré-afinidade. Coluna 2: eluato da afinidade. Coluna 3: amostra pós-afinidade.



A



B

FIGURA 12

Figura 12. Análise da atividade inibitória da hemolinfa bruta de *L. obliqua* sobre atividade proteolítica da tripsina utilizando diferentes substratos protéicos.

Alíquotas de diferentes proteínas purificadas foram incubadas a 37°C por 4 horas com tripsina (TR) na presença das frações pré purificadas (FR) por cromatografia de gel filtração a partir da hemolinfa da lagarta. As amostras foram submetidas a uma eletroforese 7,5% SDS-PAGE sob condições redutoras para análise da laminina e vitronectina e sob condições não redutoras para análise do fibrinogênio. O gel foi corado com Azul de *Coomassie*. Marcadores de massa molecular estão dispostos à esquerda.

(A) Coluna 1: Fibrinogênio purificado (FG) incubado na ausência de TR e H (controle experimental). Coluna 2: FG incubado com TR. Coluna 3: FG incubado com TR e H. A flecha aponta o perfil intacto do fibrinogênio.

(B) Coluna 1: Laminina purificada (LN) incubada na ausência de TR e H (controle experimental). Coluna 2: LN incubada com TR. Coluna 3: LN incubada com TR e H. A flecha aponta o perfil intacto da cadeia α da laminina e a cabeça de flecha aponta a cadeia β e γ co-localizadas.

(C) Coluna 1: Vitronectina purificada (VN) incubada na ausência de TR e H. Coluna 2: VN incubada com TR. Coluna 3: VN incubada com TR e H. A flecha aponta o perfil intacto da vitronectina (75 kDa) e a cabeça de flecha aponta seu fragmento de 65 kDa.

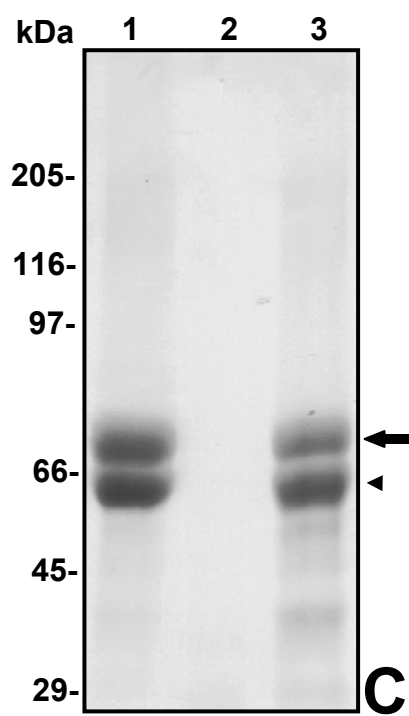
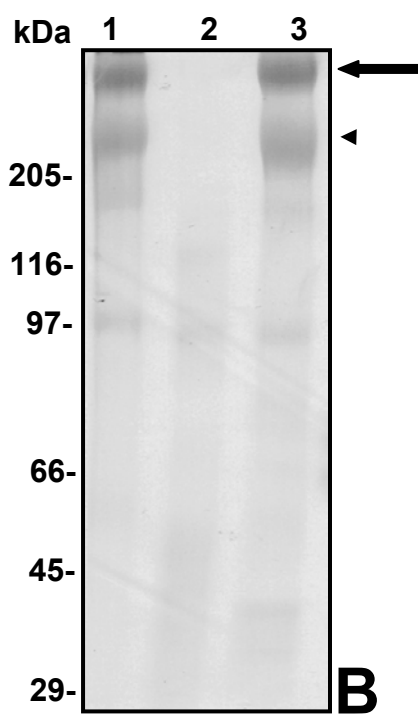
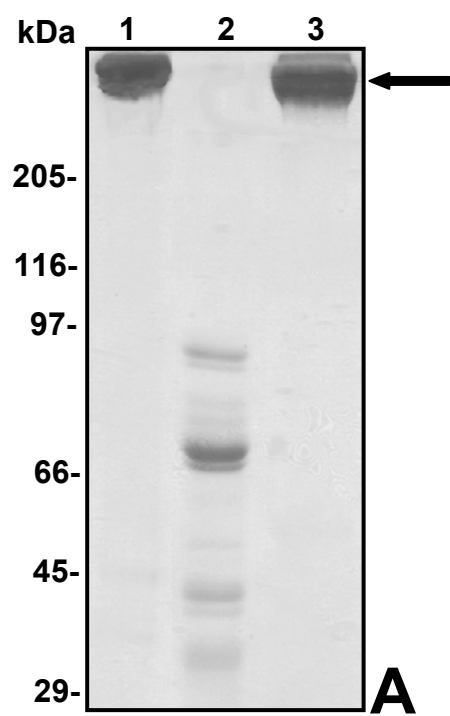


FIGURA 13

Figura 13. Análise da reversibilidade da inibição da atividade proteolítica da tripsina pelo inibidor de protease de *L. obliqua*.

Alíquotas de 0,1 μ g de tripsina foram incubadas com concentrações crescentes das frações pré-purificadas da hemolinfa obtidas pelo ensaio de gel filtração e submetidas a um zimograma em SDS-PAGE 15% impregnado com gelatina. Coluna 1: tripsina incubada, nas mesmas condições, na ausência das frações pré-purificadas (controle experimental). Coluna 2: tripsina incubada com 10 μ g das frações. Coluna 3: tripsina incubada com 20 μ g das frações. Coluna 4: tripsina incubada com 40 μ g das frações.

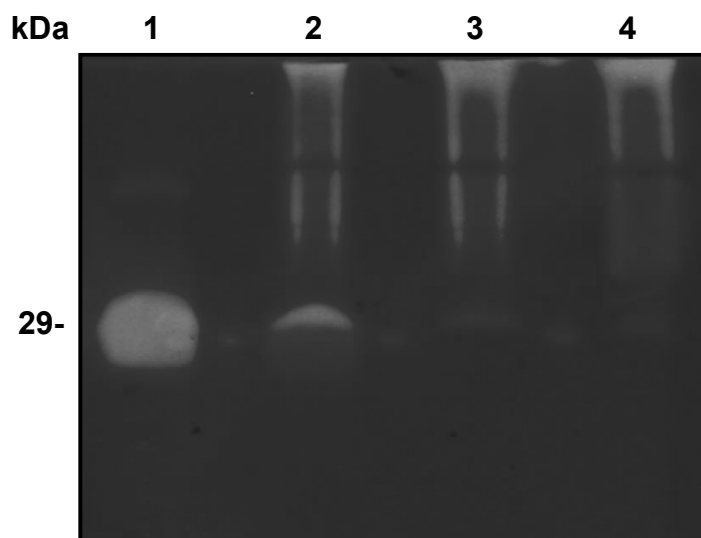


FIGURA 14

Figura 14. Análise da atividade inibitória do inibidor de proteases de *L. obliqua* sobre a ação da trombina.

(A) Em tubos de ensaio contendo solução de fibrinogênio, adicionou-se trombina pré-incubada com alíquotas das frações pré-purificadas da hemolinfa obtidas da cromatografia de gel filtração. A formação de coágulos transparentes (indicados pelas flechas) foi visualizada usando corante *Ponceau-S* (Sigma) para o fundo.

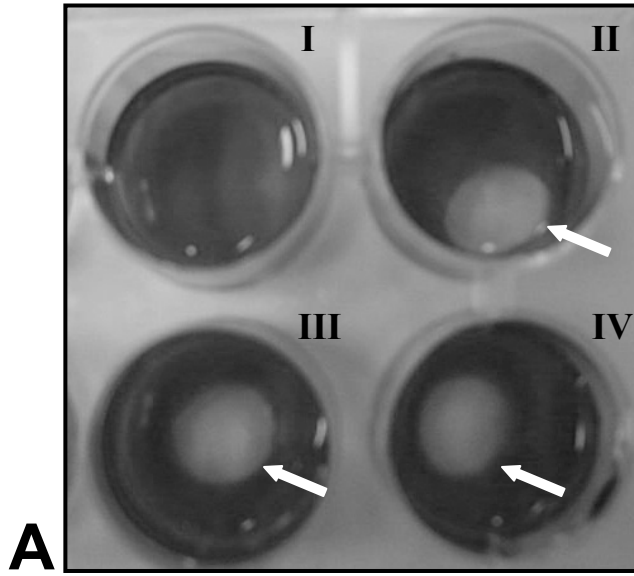
I: Fibrinogênio incubado com as frações pré-purificadas (controle negativo experimental)

II: Fibrinogênio incubado com 0,1U de trombina (controle positivo experimental)

III: Fibrinogênio incubado com 0,1U trombina pré-incubada com 10 μ g das frações pré-purificadas

IV: Fibrinogênio incubado com 0,1U de trombina pré-incubada com 30 μ g das frações pré-purificadas

(B) Em paralelo, para confirmar que a atividade inibitória estava presente no lote de frações pré-purificadas utilizado, incubou-se fibronectina humana purificada com alíquotas das mesmas frações utilizadas no ensaio acima na presença de tripsina. As amostras foram submetidas a ensaios de eletroforese e *Western Blotting* como descrito para figura 8. Coluna 1: fibronectina incubada na ausência de tripsina e das frações (controle experimental). Coluna 2: fibronectina incubada com tripsina. Coluna 3: fibronectina incubada com tripsina na presença das frações pré-purificadas. A flecha indica o perfil intacto da molécula de fibronectina.



Hialuronidases de venenos têm sido descritas como moléculas hidrolíticas envolvidas com os efeitos nocivos originados de acidentes com animais peçonhentos (KUDO & TU, 2001; PESSINI *et al.*, 2001). Atuam como fatores de espalhamento pois facilitam a difusão das toxinas pelos tecidos e catalisam a hidrólise de glicosaminoglicanos dos tecidos lesionados. Apesar do papel chave que estas enzimas desempenham no processo de envenenamento, ela é geralmente ignorada cientificamente tendo em vista o limitado número de estudos a seu respeito, o que pode ser justificado pelo fato de que não apresentam toxicidade própria (GIRISH *et al.*, 2004).

Neste estudo, trabalhando com extrato de cerdas de *L. obliqua*, identificamos a presença de atividade hidrolítica sobre ácido hialurônico tanto molécula purificada quanto organizada e ligada a componentes da matriz extracelular. A hialuronidase do extrato de cerdas não mostrou afinidade por moléculas de heparan sulfato ou dermatan sulfato purificados, mas foi capaz de clivar, adicionalmente ao ácido hialurônico (FIGURA 3A), moléculas de condroitim sulfato purificado (FIGURA 3B), mostrando que não é uma enzima específica unicamente ao ácido hialurônico como a hialuronidase testicular bovina e ao contrário da hialuronidase bacteriana purificada de *Streptomyces hyalurolyticus* que, por sua vez, é específica ao ácido hialurônico (MENZEL & FARR, 1998).

Além disso, sob as condições utilizadas neste estudo, avaliamos o perfil de clivagem enzimática da hialuronidase do extrato de cerdas. Por meio da análise espectrofotométrica, na faixa de 190-340nm, da degradação do ácido hialurônico pelo extrato de cerdas da lagarta em comparação aos produtos gerados pela ação de hialuronidase testicular e bacteriana, conseguimos

detectar que a hialuronidase da lagarta apresenta atividade hidrolítica, e não liásica sobre a molécula de ácido hialurônico. Este resultado é baseado no fato de que a degradação do ácido hialurônico pelo extrato de cerdas (FIGURA 4A) gera produtos com perfil de absorção similar àquele originado após digestão pela hialuronidase testicular bovina que é uma enzima caracterizada como hidrolase (PRITCHARD *et al.*, 1994). O próximo passo foi caracterizar esta hidrolase identificada no extrato de cerdas da lagarta como sendo uma β -endohexosaminidase, através de ensaios colorimétricos, baseando-se em sua habilidade de quebrar ligações glicosídicas do tipo β 1,4 e produzir resíduos de açúcares N-acetilglucosamina terminais, com pico de absorção em 550nm, após clivagem do ácido hialurônico (FIGURA 4B). Isso indica mais uma similaridade com a hialuronidase testicular bovina diferindo, por sua vez, das hialuronidases de sanguessuga e bacteriana (MEYER *et al.*, 1960; MENZEL & FARR, 1998).

Com o intuito de confirmar a presença de uma hialuronidase no extrato de cerdas da lagarta *L. obliqua*, bem como para caracterizar a enzima em questão, partimos para experimentos de zimografia. Utilizando ácido hialurônico impregnado no gel de eletroforese, pudemos observar a presença de zonas de lise com mobilidade eletroforética difusa na região de 49 e 53 kDa (FIGURA 5) indicando a presença de hialuronidases na amostra. Isto condiz com dados publicados que indicam a presença comum de hialuronidases em venenos de cobra, abelha e escorpião que contêm de 33 a 110 kDa (FISZER-SZAFARZ, 1984; CEVALLOS *et al.*, 1992).

Hialuronidases são geralmente classificadas como enzimas que possuem atividade em pH ácido (entre pH 3,0 e 4,0) ou em pH neutro (entre pH

5,0 e 6,0) (GREGORY *et al.*, 1996). Quando avaliamos a atividade hialuronidásica do extrato de cerdas em função do pH (FIGURA 6A e 6B), observamos que estas enzimas não possuem atividade detectável em condições de extremos de pH, seja ácido (pH menor ou igual a 5,0) ou básico (pH maior ou igual a 8,0) o que nos leva a caracterizá-la como sendo hialuronidases pertencentes a segunda classe descrita, ou seja, que atua em pH neutro, uma vez que seu pH ótimo de ação foi 6,0. Isso também nos leva a crer que estas moléculas identificadas possuem uma característica imprescindível a moléculas que possam vir a ser empregadas no campo terapêutico que seria capacidade de agir em pH fisiológico e que, por agirem em pH próximo a 7,0, estas hialuronidases também podem contribuir para as atividades nocivas do veneno no acidentado.

Procuramos especular sobre o efeito hidrolítico da hialuronidase de *L. obliqua* sobre o ácido hialurônico organizado e complexado na matriz extracelular. Para isso, avaliamos o perfil do tecido conjuntivo de pele de coelho fixada em lâmina por ensaio de fluorescência utilizando um marcador para visualização da rede de ácido hialurônico (proteína de ligação a ácido hialurônico conjugada com biotina) e streptavidina conjugada com fluoresceína para revelação. Novamente os resultados descritos sugerem a existência de hialuronidases no extrato de cerdas, uma vez que, como visualizado na FIGURA 7, a presença de ácido hialurônico nas amostras de tecido submetidas ao tratamento com o extrato de cerdas está significativamente diminuída proporcionalmente a quantidade de extrato utilizada. As hialuronidases, por meio da clivagem de ácido hialurônico e condroitim sulfato ligados à matriz extracelular, podem explicar alguns efeitos nocivos do veneno incluindo

aqueles envolvidos nos distúrbios de adesão e migração celular. Ainda com base neste efeito de degradação do ácido hialurônico e conseqüente alteração da matriz extracelular, podemos considerar a hipótese de que esta atividade seja sinérgica com as outras toxinas do veneno explicando os sinais clínicos que aparecem nos casos de envenenamento tais como a hemorragia local (alteração na matriz extracelular subendotelial causando instabilidade da parede do vaso sangüíneo) e a falência renal (degradação da matriz extracelular glomerular e tubular) (COTRAN *et al.*, 1999; BLANN, 2000).

As lagartas do gênero *Lonomia* possuem inúmeras enzimas proteolíticas constituindo seu veneno. Estas toxinas, clivando diferentes substratos, provocam várias alterações fisiológicas nocivas ao organismo dos pacientes acidentados tais como o quadro sistêmico de hemorragia característico. Com base nestes dados, consideramos a hipótese de que este efeito sistêmico representa um sinergismo destas diferentes proteases do veneno com as hialuronidases que também o constituem. As hialuronidases, por sua vez, agindo na matriz extracelular dos tecidos e, em especial, na parede dos vasos sangüíneos, pode propiciar o aumento do espalhamento das toxinas nocivas do veneno pelo corpo, favorecendo o envenenamento sistêmico. O fato desta difusão de toxinas depender de moléculas de hialuronidase é sugerido considerando o grande número de estudos referentes a peçonhas de diferentes animais tais como cobras, aranhas, abelhas e escorpiões relacionando o quadro de envenenamento à presença destas enzimas (SAMPAIO *et al.*, 1991; MARKOVI-HOUSLEY *et al.*, 2000; KUDO & TU, 2001; DA SILVA *et al.*, 2004). Estudos de farmacocinética utilizando veneno de *Tityus serrulatus*, que possui uma hialuronidase identificada, mostrou que este veneno possui uma rápida

absorção e alta taxa de distribuição pelos tecidos das vítimas (SANTANA *et al.*, 1996). Além disso, Pessini *et al.* (2001) descreveu que a hialuronidase presente na peçonha deste animal possui capacidade de potencializar a Tityustoxina-1 que é, por sua vez, a principal toxina descrita deste veneno.

Alguns autores têm questionado sobre a eficácia dos tratamentos dos acidentes com animais peçonhentos utilizando soros anti-venenos quando estes não são administrados logo após o acidente (ISMAIL *et al.*, 1992; REVELO *et al.*, 1996). O espalhamento do veneno pelos tecidos, que, por sua vez, é dependente das hialuronidases, acaba por restringir a eficácia destes soros. Além disso, outro ponto a ser considerado, seria o fato de que a administração sistêmica de soros propiciam mínima proteção ao quadro local de necrose e/ou hemorragia desencadeado por alguns venenos, enquanto que o uso de inibidores de toxinas/enzimas não apenas reduzem o dano tecidual local como também diminuem a magnitude dos efeitos sistêmicos (ANAI *et al.*, 2002; YINGPRASERTCHAI *et al.*, 2003).

Por outro lado, as hialuronidases de veneno podem ser consideradas excelentes ferramentas biotecnológicas para o estudo de mecanismos moleculares em biologia celular, assim como para o emprego em diversos campos terapêuticos. Estas enzimas aumentam a permeabilidade das membranas teciduais e têm sido utilizadas como agentes que aumentam a velocidade de absorção de drogas e diminuem, paralelamente, o desconforto da injeção subcutânea ou intramuscular de fluidos. Elas têm sido empregadas em inúmeras áreas tais como ortopedia, dermatologia e ginecologia entre outras (MENZEL & FARR, 1998). Estudos clínicos têm sugerido que o uso tópico ou sistêmico de hialuronidases como adjuvantes pode aumentar o índice

terapêutico de drogas anti-câncer por aumentar a difusão local da droga e a sua biodisponibilidade aos tecidos e tumor (CIVALLERI *et al.*, 1997; SMITH *et al.*, 1997).

Com base nos resultados obtidos no presente estudo postulamos, em virtude da primeira detecção e caracterização de hialuronidases no extrato de cerdas de *L. obliqua*, o nome de *Lonoglyases* a estas moléculas, em referência ao gênero da lagarta (Lono) e a suas atividades sobre glycosaminoglicanos (glyases).

As secreções de animais peçonhentos são excelentes ferramentas para se estudar os mecanismos moleculares da ciência básica. Além disso, toxinas de venenos têm sido utilizadas como modelos para a síntese de medicamentos ou mesmo empregadas diretamente no tratamento de diferentes quadros patológicos (SOUTAR & GINSBERG, 1993; MARKLAND, 1998; GUERRERO *et al.*, 1999; DA SILVA *et al.*, 2004). Pesquisas nesta área, além de resultarem em um maior entendimento, a nível molecular, histopatológico, terapêutico e laboratorial do diagnóstico dos acidentes, podem gerar aplicações biotecnológicas futuras para as pesquisas básica e clínica.

A fim de adquirir informações adicionais sobre os constituintes moleculares da hemolinfa da lagarta *L. obliqua*, bem como, sobre o mecanismo das possíveis desordens induzidas por esta secreção, apresentamos neste trabalho dados bioquímicos que sugerem a presença de um inibidor de serinoprotease na hemolinfa desse animal.

Primeiramente, em um ensaio em que utilizou-se fibronectina humana purificada incubada com tripsina na presença de hemolinfa, detectamos uma atividade inibitória desta secreção sobre o efeito proteolítico da enzima citada

(FIGURA 8). Da mesma maneira, a hemolinfa bruta mostrou forte atividade inibitória sobre a proteólise provocada pelas enzimas elastase, quimiotripsina e proteinase K, sendo todas estas enzimas pertencentes à família das serinoproteases. Mostrou ainda, um efeito inibitório um pouco menos significativo sobre a proteólise causada pelo veneno de aranha marrom, rico em metaloproteases, e pela colagenase bacteriana uma metaloprotease já estabelecida na literatura. No entanto, aparentemente não houve nenhum efeito inibitório sobre a ação da pepsina (protease aspártica) e da papaína (tiolprotease) (FIGURA 9). Em conjunto, estes resultados apontam a presença de um inibidor de proteases na hemolinfa da lagarta com capacidade de inibir fortemente enzimas do tipo serinoprotease e mais fracamente enzimas do tipo metaloproteases.

O próximo objetivo, a fim de melhor caracterizar bioquimicamente o inibidor de proteases descrito, foi determinar a massa molecular desta molécula constituinte da hemolinfa bruta da lagarta *L. obliqua*. Para isso, primeiramente realizamos um experimento de cromatografia de gel filtração utilizando resina Sephadex G-100 (FIGURA 10), seguida de um ensaio de cromatografia de afinidade em resina tripsina-agarose (FIGURA 11). Tais procedimentos possibilitaram a obtenção de um material mais enriquecido em relação à molécula de inibidor de protease. As frações enriquecidas quanto atividade foram submetidas a uma zimografia reversa impregnada com gelatina mostrando que o inibidor de protease possui mobilidade eletroforética difusa na região de 21kDa semelhante à molécula de inibidor de tripsina de soja (FIGURA 11). As regiões de inibição da lise no gel foram densitometradas com o auxílio do software Scion Image for Windows 95/98 (Microsoft Windows®)

apontando uma concentração de atividade de cerca de 2X quando comparamos o material eluído da G-100 com o material eluído da afinidade.

Com base no experimento de inibição da proteólise utilizando fibronectina como substrato protéico para diferentes serinoproteases, uma crítica consistente que deveria ser considerada seria o fato de que um constituinte da hemolinfa poderia estar se ligando especificamente à fibronectina e, que, por um possível impedimento estérico, poderia estar causando a inibição da proteólise. Os resultados descritos na FIGURA 12 em que três substratos protéicos diferentes (fibrinogênio, laminina e vitronectina) foram utilizados no ensaio de proteólise com tripsina na presença de frações com atividade inibitória pré-purificadas da hemolinfa a partir de cromatografia de gel filtração, respondem à crítica levantada, mostrando que o inibidor de serinoprotease atua de uma maneira similar sobre a proteólise dos diferentes substratos testados. Este dado sobre a inibição da proteólise confirma a presença de um inibidor de proteases na hemolinfa de *L. obliqua*.

A partir daí, passamos a estudar o mecanismo pelo qual o inibidor de serinoprotease da hemolinfa inativa as proteases. Como apontado na FIGURA 13, tripsina foi incubada com as frações enriquecidas em atividade inibitória provenientes da gel filtração e, então, submetida a um ensaio de eletroforese em SDS-PAGE 15% impregnado com gelatina. Este procedimento experimental, capaz de separar a protease do inibidor de protease no caso de uma inibição reversível, mostrou um perfil alterado e difuso da mobilidade da tripsina e lise da gelatina. Este resultado sugere que a interação da tripsina com o inibidor, de alguma maneira, altera a mobilidade da tripsina resultando em um perfil eletroforético difuso, porém com atividade proteolítica

remanescente. Podemos, então, considerar a possibilidade de que a interação entre o inibidor de protease com a molécula de tripsina é resistente ao SDS e à separação eletroforética alterando, apenas, a mobilidade da protease mas não inativando a sua atividade proteolítica de maneira irreversível.

Este é o primeiro inibidor de serinoprotease identificado na lagartas *Lonomia* descrito na literatura, fato este que levanta algumas questões importantes sobre, por exemplo, quais seriam as reais funções biológicas deste inibidor de protease. Esta é uma questão que continua em aberto, porém, considerando que estudos publicados têm reportado a presença de atividade proteolítica na hemolinfa, egesto oral e extrato de cerdas de lagartas *Lonomia spp.* e que algumas destas toxinas identificadas são caracterizadas como serinoprotease (AROCHA-PIÑANGO *et al.*, 1981; AMARANT *et al.*, 1991; GUERRERO & AROCHA-PIÑANGO, 1992; REIS *et al.*, 1999; GUERRERO *et al.*, 1999; PINTO *et al.*, 2004), podemos considerar a hipótese de que o inibidor de proteases da hemolinfa pode possuir um efeito de proteção para as lagartas contra as suas próprias proteases ou contra proteases exógenas de alguns parasitas (EGUSHI *et al.*, 1993; CHERQUI *et al.*, 2001). Outra possibilidade que não deve ser descartada é a de que este inibidor de serinoprotease tenha participação nos efeitos nocivos do veneno durante os acidentes. De fato, no passado, inibidores de protease de plantas eram descritos como agentes tóxicos, especialmente como inibidores do crescimento celular no desenvolvimento de embriões e com grande potencial para contribuir para o desenvolvimento de câncer pancreático (KENNEDY, 1998). Com base nos resultados obtidos, podemos especular sobre a colaboração deste inibidor de

protease com os efeitos tóxicos do veneno de *L. obliqua*, porém, experimentos adicionais devem ser realizados para confirmar esta hipótese.

Outra questão importante a ser considerada sobre o inibidor de serinoprotease de *L. obliqua* é sobre a sua aplicabilidade biotecnológica. Como descrito para outras moléculas desta família, inibidores de protease têm sido extensivamente estudados por sua habilidade de modular eventos biológicos. Algumas atividades biológicas conhecidas dos inibidores de protease são: a habilidade de inibir várias proteases caracterizadas (KENNEDY, 1993a; KENNEDY, 1998); atividade anti-inflamatória (WARE *et al.*, 1997); capacidade de prevenir a perda de cabelo e de peso corporal (EVANS *et al.*, 1992; KENNEDY, 1998); os efeitos anti-carcinogênicos e de regulação da expressão gênica (CHANG *et al.*, 1990; LI *et al.*, 1992; KENNEDY, 1998) e a capacidade de aumentar o tempo de vida em animais mantidos sob dieta rica em inibidores de protease (KENNEDY, 1998) entre outros efeitos descritos. Além disso, estas moléculas são reagentes biológicos poderosos para pesquisas nas áreas de bioquímica e de biologia celular. Com base nas propriedades descritas acima, podemos considerar futuras aplicações biotecnológicas do inibidor de serinoprotease de *L. obliqua* pelo emprego de técnicas de biologia molecular em busca da molécula recombinante.

Para futuras aplicações biotecnológicas é esperado que a molécula de inibidor de protease, além da capacidade de inibir a proteólise, seja, também, incapaz de inibir enzimas do sistema de coagulação bem como de outros eventos vitais ao funcionamento do organismo. Como pode-se observar na FIGURA 14, o inibidor de proteases da hemolinfa foi incapaz de bloquear a

atividade da trombina sobre o fibrinogênio "*in vitro*". Este resultado fortalece a idéia de uma possível aplicação biotecnológica para este inibidor de protease.

Sugerimos, então, neste trabalho, com base na primeira identificação de um inibidor de serinoprotease na hemolinfa da lagarta *L. obliqua*, o nome de LOSPI a esta molécula, o qual faz referência à espécie da lagarta, *Lonomia obliqua*, e ao seu efeito como inibidor de enzimas do tipo serinoprotease.

VII. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo do extrato de cerdas e da hemolinfa da lagarta *Lonomia obliqua* nos permitem as seguintes conclusões:

- 1- O extrato de cerdas da lagarta contém hialuronidases do tipo endo- β -N-acetilhexosaminidase que atuam sobre moléculas purificadas de ácido hialurônico e condroitim sulfato gerando resíduos terminais de N-acetilglucosamina
- 2- Estas hialuronidases possuem massas moleculares de 49kDa e 53kDa e apresentam atividade ótima entre pH 6,0 e 7,0.
- 3- As hialuronidases do extrato de cerdas da lagarta também apresentam atividade lítica sobre ácido hialurônico organizado em matriz extracelular tecidual.
- 4- A hemolinfa da lagarta *L. obliqua* contém atividade inibitória sobre a ação proteolítica de diferentes serinoproteases.
- 5- O inibidor de proteases identificado na hemolinfa da lagarta apresenta atividade inibitória sobre a ação de serinoproteases frente a diferentes substratos protéicos e possui massa molecular de 21kDa.

- 6- A interação entre o inibidor de proteases e a tripsina é resistente ao SDS e à eletroforese acarretando uma alteração da mobilidade eletroforética da enzima.

- 7- O inibidor de protease presente na hemolinfa da lagarta não é capaz de inibir a atividade coagulante da trombina sobre o fibrinogênio.

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABELLA, H.B.; TORRES, J.B.; MARQUES, M.G.B.; DUARTE, A.C.; BARROS, E. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por *Lonomia*. Porto Alegre, CIT (Centro de Informação Toxicológica), 1998.

ANAI, K.; SUGIKI, M.; YOSHIDA, E.; MARUYAMA, M. Neutralization of a snake venom haemorrhagic metalloproteinase prevents coagulopathy after subcutaneous injection of *Bothrops jararaca* venom in rats. *Toxicon* 40: 63-68, 2002.

AMARANT, T; BURKHART,W; III,HLV; AROCHA-PIÑANGO,C.L e PARIKH,I. Isolation and complete amino acid sequence of two fibrinolytic proteinases from the toxic *Saturnid* caterpillar *Lonomia achelous*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1079: 214-221,1991.

AROCHA-PIÑANGO, C.L.; LAYRISSE, M. Fibrinolysis produced by contact with a caterpillar. *Lancet* 1: 810, 1969.

AROCHA-PIÑANGO, C.L.; MARSH,N.A.; ROBINSON, D. A fibrinolytic agent from a *Saturnid* caterpillar: partial purification and characterization. *Thromb. Diathes. Haemorrh.* 29: 135-142, 1973.

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. Haemostas.* 45:233-236, 1981a.

AROCHA-PIÑANGO,C.L.; PEPPER, D.S. Studies of a fibrinolytic enzyme from the larvae of *Lonomia achelous* (Cramer) using chromogenic peptide substrates. *Thromb. Haemostas.* 46:710-713, 1981b.

AROCHA-PIÑANGO, C.L.; BOSCH, N.B.; TORRES, A. ; GOLDESTEN, C.; NOUEL, A.; ARGÜELO, A. ; CARVAJAL, Z.; GUERRERO, B.; OJEDA, A.; RODRIGUEZ, A.; RODRIGUEZ, S. Six new cases of a caterpillar-induced bleeding syndrome. *Thromb. Haemostas.* 67:402-407, 1992.

AROCHA-PIÑANGO, C.L.; CARVAJAL, M.R.; GUERRERO, B. Invertebrate compounds acting on the hemostatic mechanism. *Blood Coagul. Fibrinolysis* 10:43-68, 1999.

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

BEYON, R.J.; BOND, J.S. *Proteolytic enzymes: A practical approach*. Ed. IRL Press, Oxford, England, 1989.

BIRKEDAL-HANSEN, H.; MOORE, M.W.G.I.; BODDEN, M.K.; WINDSOR, L.J.; BIRKEDAL-HANSEN, B.; DE CARLO, A.; ENGLER, J.A. Matrix Metalloproteinases: A review. *Crit. Ver. Oral Biol. Med.* 4:197-250, 1993.

BLANN, A.D. Endothelial cell activation, injury, damage and dysfunction: separate entities or mutual terms? *Blood Coag. Fibrinol.* 11:623-630, 2000.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO DO PARANÁ. Ano X, Nº 81, Novembro, 1991.

BRADFORD, M.A. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of Protein-Dye-Binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254, 1976.

BÜCHERL, W. Introduction. In: BÜCHERL W. & BUCKLEY E.E. *Venemous animals and their venoms*. New York, Academic Press, p. xix-xxii, 1971.

CEVALLOS, M.A.; NAVARRO-DUQUE, C.; VARELA-JULIA, M.; ALAGON, A.C. Molecular mass determination and assay of venom hyaluronidases by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Toxicon* 30: 925-930, 1992.

CHANG, J.D.; LI, J.H.; BILLINGS, P.C.; KENNEDY, A.R. Effects of protease inhibitors on c-myc expression in normal and transformed C3H10T1/2 cells. *Mol. Carcinog.* 3:226-232, 1990.

CHANG, L.S.; CHOU, Y.C.; LIN, S.R.; WU, B.N.; LIN, J.; HONG, E.; SUN, Y.J.; HSIAO, C.D. A novel neurotoxin, cobrotoxin b, from *Naja naja atra* (Taiwan cobra) venom: purification, characterization and gene organization. *J. Biochem.* 122:1252-1259, 1997.

CHANG, L.S.; CHUNG, C.; HUANG, H.B.; LIN, S.R. Purification and characterization of a chymotrypsin inhibitor from the venom of *Ophiophagus hannah* (King Cobra). *Biochem. Biophys. Res.* 283:862-867, 2001.

CHERQUI, A., CRUZ, N., SIMÕES, N. Purification and characterization of two serine protease inhibitors from the hemolymph of *Mythimna unipuncta*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 31: 761-769, 2001.

CIVALLERI, D.; ESPOSITI, M.; DE CIAN, F.; BALLETO, N.; VANNOZZI, M.O.; MONDINI, G.; CARRABETTA, S.; BOCCHIO, M.M. Effects of adjuvant hyaluronidase in tumors refractory to chemotherapy. Review of the literature and pharmacokinetics of cisplatin after regional administration in animals and humans. *G. Chir.* 18: 175-181, 1997.

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. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 31:779-784, 1998.

COSTA, R.M. Acidentes por lagartas venenosas. In: BARRAVIERA B. Venenos animais: uma visão integrada. Rio de Janeiro. Ed. de Publicações Científicas, p. 327-338, 1994.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. Pathologic basis of disease. Boston, Elsevier, 1999.

DA SILVA, P.H.; DA SILVEIRA, R.B.; APPEL, M.H.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W.; VEIGA, S.S. Brown spiders and loxoscelism. *Toxicon*, 43: in press, 2004.

DIAS DA SILVA, W.; ROCHA CAMPOS, A.; GONÇALVES, L.; SOUSA-SILVA, M.C.; HIGASHI, H.; YAMAGUSHI, I.; KELEN, E. Development of an antivenom against toxins of *Lonomia obliqua* caterpillars. *Toxicon* 34:1045-1049, 1996.

DIETRICH, C.P. & DIETRICH, S.M.C. Eletrophoretic behavior of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers. *Anal. Biochem.* 70: 645-647, 1976.

DIETRICH, C.P.; SCHIBUOLA, C.T.; SAMPAIO, L.O.; IBARA, I. Changes in the composition of sulfated mucopolysaccharides during transformation of cerebral tissue. *Cancer Res.* 38:3939-3978, 1978.

DIETRICH, C.P. A model of cell growth mediated by sulfated glycosaminoglycans. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 17:5-15, 1984.

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

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

EGUSHI, M.; ITOH, M.; CHOU, L.Y.; NISHINO, K. Purification and characterization of a fungal protease specific protein inhibitor (FPI-F) in the silkworm haemolymph. *Comp. Biochem. Physiol.* 104B:537-543, 1993.

ENGVALL, E.; RUOSLAHTI, E. Binding of soluble form of fibroblast surface protein, fibronectin, to collagen. *Int. J. Cancer* 20: 1-5, 1977.

EVANS, S.M.; SZUHAJ, B.F.; VAN WINKLE, T.; MICHEL, K.; KENNEDY, A.R. Protection against metastasis of radiation induced thymic lymphosarcoma and weight loss in C57B1/6NCr1BR mice by an autoclave resistant factor present in soybeans. *Radiat. Res.* 132:259-262, 1992.

EVERED, D.; WHELAN, J. The biology of hyaluronan. John Wiley & Sons., 1989.

FEITOSA, L.; GREMSKI, W.; VEIGA, S.S.; ELIAS, M.C.Q.B.; GRANER, E.; MANGILI, O.C.; BRENTANI, R.R. Detection and characterization of metalloproteinases with gelatinolytic, fibronectinolytic and fibrinogenolytic activities in brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. *Toxicon*. 36: 1039-1051, 1998.

FISHER, L.W.; TERMINE, J.D.; YOUNG, M.F. Deduced protein sequence of bone proteoglycan I (biglycan) shows homology with proteoglycan II (decorin) and several nonconnective tissue proteins in a variety of species. *J. Biol. Chem.* 264:4571-4576, 1989.

FISZER-SZAFARZ, B. Hyaluronidase polymorphism detected by polyacrylamide gel electrophoresis. Application to hyaluronidases from bacteria, slime molds, bee and snake venoms, bovine testes, rat liver lysosomes and human serum. *Anal. Biochem.* 143: 76-81, 1984.

FRAIHA, H.; BALLARINI, A.; LEÃO, R.N.Q.; COSTA, J.R.D.; DIAS, L.B. Síndrome hemorrágica por contato com larvas de mariposa (Lepidoptera, *Saturniidae*). In: Instituto Evandro Chagas-50 anos de Contribuição às Ciências Biológicas e à Medicina Tropical. Fundação Serviços de Saúde Pública. 2: 811, 1986.

GIRISH, K.S.; SHASHIDHARAMURTHY, R., NAGARAJU, S.; GOWDA, T.V., KEMPARAJU, K. Isolation and characterization of hyaluronidase a "spreading factor" from Indian cobra (*Naja naja*) venom. *Biochimie*. 86: 193-202, 2004.

GOPALAKRISHNAKONE, P. Myotoxic phospholipases from snake venoms: general myoglobinuric and local myonecrotic toxins. *Toxicon* 35:474, 1997.

GREILING, H. Spectrophotometric method for the determination of bacterial hyaluronidase. *Hoppe Seylers Z . Physiol. Chem.* 309: 239-42, 1957.

GREGORY, F.I.; TONY, C.; STERN, R. The hyaluronidases: a chemical, biological and clinical overview. *Trends Glycose. Glycotechnol.* 8:419-434, 1996.

GUERRERO, B.; AROCHA-PIÑANGO,C.L. Activation of human prothrombin by the venom of *Lonomia achelous* (Cramer) caterpillars. *Thrombosis Research* 66: 169-177, 1992.

GUERRERO,B.; AROCHA-PIÑANGO,C.L.; SAN JUAN,A.G. *Lonomia achelous* caterpillar venom (LACV) selectively inactivates blood clotting Factor XIII. *Thrombosis Research* 87:83-93, 1997a.

GUERRERO, B.; AROCHA-PIÑANGO,C.L.; SAN JUAN, A.G. Degradation of human Factor XIII by Lonomin V, a purified fraction of *Lonomia achelous* caterpillar venom. *Thromb. Res.* 87:171-181, 1997b.

GUERRERO, B.; PERALES, J.; GIL, A.; AROCHA-PIÑANGO, C.L. Effect on platelet FXIII and partial characterization of Lonomin V, a proteolytic enzyme from *Lonomia achelous* caterpillars. *Thromb. Res.* 93:243-252, 1999.

HARLOW, E., LANE, D. *Antibodies: a laboratory manual.* Cold Spring Harbor, New York, 1988.

HARVEY, A.L.; ANDERSON, A.J. Dendrotoxins: snake toxins that block potassium channels and facilitate neurotransmitter release. In: HARVEY A.L. *Snake toxins.* Pergamon Press Inc., New York, p. 131-164, 1991.

HOCMAN, G. Chemo prevention of cancer: protease inhibitor. *Int. J. Biochem.* 24: 1365–1375, 1992.

IOZZO, R.V. Proteoglycans: structure, function and role in neoplasia. *Lab. Invest.* 53: 373-396, 1985.

ISMAIL, M.; FATANI, A.J.Y.; DABEES, T.T. Experimental treatment protocols for scorpion envenomation: a review of common therapies and an effect of kallikrein-kinin inhibitors. *Toxicon* 30:1257-1279, 1992.

JAQUES, L.B.; BALLIEUX, R.E.; DIETRICH, C.P.; KAVANAGH, L.W. a microeletroforese method for heparin. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 46:345-360, 1968.

JEANLOZ, R.W. The nomenclature of mucopolysaccharides. *Arthritis Rheum.* 3: 233-237, 1960.

KELEN, E; PICARELLI,Z; DUARTE,A . Hemorrhagic syndrome induced by contact with caterpillars of the genus *Lonomia* (*Saturnidae*, *Hemipeucinae*). *J. Toxicol. Toxin. Ver.* 14: 283-308, 1995.

KLEINER, D.E.; STELLER-STEVENSON, W.G. Structural biochemistry and activation of matrix metalloproteases. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 5: 891-897,1993.

KENNEDY, A.R.; BILLINGS, P.C.; MAKI, P.A.; NEWBERNE, P. Effects of various protease inhibitor preparations on oral carcinogenesis in hamsters induced by 7,12-dimethylbenz(a)anthracene. *Nutr. Cancer* 19:191-200, 1993.

KENNEDY, A.R. Chemopreventive agents: protease inhibitors. *Pharmacol. Ther.* 78: 167-209, 1998.

KUDO, K.; TU, A.T. Characterization of hyaluronidase isolated from *Agkistrodon contortrix contortrix* (Southern Copperhead) venom. *Arch. Biochem. Biophys.* 386: 154-162, 2001.

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

LAURENT, T.C.; FRASER, J.R.E. The properties and turnover of hyaluronan. In: EVERED D.; WHELAN J.- Functions of the proteoglycans. London, John Wiley and Sons. p. 9-29, 1986.

LI, J.H.; BILLINGS, P.C.; KENNEDY, A.R. Induction of oncogene expression by sodium arsenite in C3H/10T1/2 cells; inhibition of c-myc expression by protease inhibitors. *Cancer J.* 5:354-358, 1992.

LINKER, A.; MEYER, K.; HOFFMAN, P. The production of hyaluronate oligosaccharides by leech hyaluronidase and alkali. *J. Biol. Chem.* 235:924-927, 1959.

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

MANUAL DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA: Acidentes por Animais Peçonhentos: identificação, diagnóstico e tratamento. Instituto Butantan, 1993.

MARKLAND, F. S. Snake venoms and the hemostatic system. *Toxicon* 36: 1749-1800, 1998.

MARKOVI-HOUSLEY, Z.; MIGLIERINI, G.; SOLDATOVA, L.; RIZKALLAH, P.J.; MÜLLER, U.; SCHIRMER, T. Crystal structure of hyaluronidase, a major allergen of bee venom. *Structure* 8: 1025-1035, 2000.

MARTINS, J.R.M.; PASSEROTTI, C.C.; MACIEL, R.M.; SAMPAIO, L.O.; DIETRICH, C.P.; NADER, H.B. Practical determination of hyaluronan by a new noncompetitive fluorescence-based assay on serum of normal and cirrhotic patients. *Anal Biochem.* 319: 65-72, 2003.

MARVAL, E. and AROCHA-PIÑANGO, C.L. Efecto da algunos venenos y secreciones de animales sobre el mecanismo hemostatico. *Interciencia* 18:10-15, 1993.

MATHEUS, M.B. Molecular biology, biochemistry and biophysics of connective tissue. Macromolar structure and evolution. In: KLEINZELLER A.; SPRINGER G.K.; WITTMAN H.G. (Eds). Springer-Verlag, New York. 19: 99, 104, 135, 175, 213, 1975.

MATOS, E.; AZEVEDO, C. Alguns aspectos ultraestruturais do pêlo glandular da larva de pararama (*Premolis semirufa*) (Lepidoptera, Arctiidae). Revista Brasileira de Biologia 51: 341-347, 1991.

MENZEL, E.J.; FARR, C. Hyaluronidase and its substrate: biochemistry, biological activities and therapeutic uses. Cancer Letters 131: 3-11, 1998.

MEYER, K. The chemistry and biology of mucopolysaccharides and glycoproteins. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 6:91-102, 1938.

MEYER, K. Hyaluronidases, in: BOYER P.D. (Ed.) - The enzymes. Academic Press, New York. p. 307-320, 1971.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Acidentes por lepidópteros. In: Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. Fundação Nacional de Saúde, Brasília p. 75-84, 1998.

MIURA, R.O.; YAMAGATA, S.; MIURA, Y.; HARADA, T.; YAMAGATA, T. Analysis of glycosaminoglycan-degrading enzymes by substrate gel electrophoresis (zymography). Anal. Biochem. 225: 333-340, 1995.

NADER, H.B.; FERREIRA, T.M.P.C.; TOMA, L.; CHAVANTE, S.F.; DIETRICH, C.P.; CASU, B.; TORRI, G. Maintenance of heparan sulfate structure throughout evolution: Chemical and enzymic degradation, and ^{13}C -n.m.r.-spectral evidence. Carb. Res. 184:292-300, 1988.

OHYA, T.; KANEKO, Y. Novel hyaluronidase from streptomyces. Biochim. Biophys. Acta, 198: 607-609, 1970.

OLIVEIRA, F.W.; CHAVANTE, S.F.; SANTOS, E.A.; DIETRICH, C.P.; NADER, H.B. Appearance and fate of a β -galactosidase, heparan sulfate and chondroitin sulfate degrading enzymes during embryonic development of the mollusc *Pomacea* sp. *Biochim. Biophys. Acta*, 1200: 241-246, 1994.

PAULSSON, M.; AUMAILLEY, M.; DEUTZMANN, R.; TIMPL, R.; BECK, R. Laminin-nidogen complex: extraction with chelating agents and structural characterization. *Eur. J. Biochem.* 166: 11-19, 1987.

PESCE, H.; DELGADO, A. Poisoning from adult moths and caterpillars. In: Bücherl, W. e Buckley, E.E. *Venomous animals and their venoms*. New York, Academic Press. 3:120-156, 1971.

PESSINI, A.C.; TAKAO, T.T.; CAVALHEIRO, E.C.; VICHNEWSKI, W.; SAMPAIO, S.V.; GIGLIO, J.R.; ARANTES, E.C. A hyaluronidase from *Tityus serrulatus* scorpion venom: isolation, characterization and inhibition by flavonoids. *Toxicon* 39: 1495-1504, 2001.

PINTO, A.F.M.; DOBROVOLSKI, R.; VEIGA, A.B.G.; GUIMARÃES, J.A. Lonofibrase, a novel α -fibrinogenase from *Lonomia obliqua* caterpillars. *Thromb. Res.* 113: 147-154, 2004.

PRITCHARD, D.G.; LIN, B.; WILLINGHAM, T.R.; BAKER, J.R. Characterization of the group B streptococcal hyaluronate lyase. *Arch. Biochem. Biophys.* 315:431-437, 1994.

PUKRITTAYAKAMEE, S.; WARREL, D.A.; DESAKORN, V.; McMICHAEL, A.J.; WHITE, N.J.; BUNNAG, D. The hyaluronidase activities of some Southeast Asian snake venoms. *Toxicon* 26: 629-637, 1988.

REIS, C.V.; KELEN, E.M.A. ; FARSKY, S.H.P.; PORTARO, F.C.V.; SAMPAIO, C.A. M.; FERNANDES, B.L.; CAMARGO, A.C.M.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M. A Ca^{++} activated serine protease (LOPAP) could be responsible

for the haemorrhagic syndrome caused by the caterpillar *Lonomia obliqua*. The Lancet 353:1942, 1999.

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 activation serineprotease from the *Lonomia obliqua* caterpillar venom (LOPAP) biochemical characterization. Thromb. Res. 102:427-436, 2001a.

REIS, C.V.; PORTARO, F.C.V.; ANDRADE, S.A.; FRITZEN, M.; FERNANDES, B.L.; SAMPAIO, C.A.; CAMARGO, A.C.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M. In vivo characterization of LOPAP, a prothrombin activator serineprotease from the *Lonomia obliqua* caterpillar venom. Thromb. Res. 102:437-443, 2001b.

REISSIG, J. L.; STROMINGER, J.L.; LELOIR, L.F. A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylamino sugars. J. Biol. Chem. 217: 959-966, 1955.

REVELO, M.P.; BAMBIRRA, E.A.; FERREIRA, A.P.; DINIZ, C.R.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Body distribution of *Tityus serrulatus* scorpion venom in mice and effects of scorpion antivenom. Toxicon 34:1119-1125, 1996.

ROTBURG, A. Lepidopterism in Brazil. In: BUCHERL W. & BUCKLEY E.E. Venomous animals and their venoms. New York, Academic Press, 3: 157-168, 1971.

SAMPAIO, L.O.; DIETRICH, C.P.; GIANNOTTI FILHO, O. Changes in the sulfated mucopolysaccharide composition in mammalian tissue during growth and in cancer tissue. Biochim. Biophys. Acta, 498:123-131, 1977.

SAMPAIO, S.V.; ARANTES, E.C.; PRADO, W.A.; RICCIOPPO NETO, F.; GIGLIO, J.R. Further characterization of toxins T1IV (TsTX-III) and T2IV from *Tityus serrulatus* scorpion venom. Toxicon 26:663-672, 1991.

SANTANA, G.C.; FREIRE, A.C.T.; FERREIRA, A.P.L.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C.; DINIZ, C.R.; FREIRE-MAIA, L. Pharmacokinetics of *Tityus serrulatus* scorpion venom determined by enzyme-linked immunosorbent assay in the rat. *Toxicon* 34:1063-1066, 1996.

SCOBLE, M.J. *Immature stages*. In: Scoble, M.J. *The Lepidoptera – form, function and diversity*. Oxford University Press. p. 105-132, 1992.

SECRETÁRIA DE ESTADO DA SAÚDE DO PARANÁ. Disponível em: <<http://www.saude.pr.gov.br/saudeambiental/Animais/index.html>> Acesso em: 8 agosto 2004.

SHAFQAT, J.; BEG, O.U.; YIN, S.J.; ZAIDI, Z.H.; JORNVALL, H. Primary structure and functional properties of cobra (*Naja naja naja*) venom Kunitz-type trypsin inhibitor. *Eur. J. Biochem.* 194:337-341, 1990.

SMITH, K.J.; SKELTON, H.G.; TURIANSKY, G.; WAGER, K.F. Hyaluronidase enhances the therapeutic effect of vinblastine in intralesional treatment of Kaposi's sarcoma. *J. Am. Acad. Dermatol.* 36:239-242, 1997.

SOUTAR, R. L.; GINSBERG, J. S. Anticoagulant therapy with ancrod. *Clin. Rev Onc. Hematol.* 15: 23-33, 1993.

TRONCOSO, M. F., ZOLEZZI, P. C., HELLMAN, U., WOLFENSTEIN-TODEL, C. A novel trypsin inhibitor from *Peltophorum dubium* seeds, with lectin-like properties, triggers rat lymphoma cell apoptosis. *Arch. Biochem. Biophys.* 411: 93-104, 2003.

VEIGA, S.S.; GREMSKI, W.; DOS SANTOS, V.L.P.; FEITOSA, L.; MANGILI, O.C.; NADER, H.B.; DIETRICH, C.P.; BRENTANI, R.B. Oligosaccharide residues of *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom proteins: dependence on glycosylation for dermonecrotic activity. *Toxicon* 37:587-607, 1999.

VEIGA,S.S.; DA SILVEIRA, R.B.; DREYFUSS, J.L.; HAOACH, J.; PEREIRA,

A.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W. Identification of a high molecular weight serine-protease in *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. *Toxicon* 38:825-839, 2000a.

VEIGA, S.S.; FEITOSA, L.; DOS SANTOS, V.L.P.; SOUZA, G.A.; RIBEIRO, A.S.; MANGILI, O.C.; PORCIONATTO, M.A.; NADER, H.B.; DIETRICH, C.P.; BRENTANI, R.; GREMSKI, W. Effect of brown spider venom on basement membrane structures. *The Histochemical Journal* 32:397-408, 2000b.

VEIGA, S.S.; ZANETTI, V.C.; FRANCO, C.R.C.; TRINDADE, E.S.; PORCINATO, M.A.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W.; DIETRICH, C.P.; NADER, H.B. In vivo and in vitro cytotoxicity of brown spider venom for blood vessel endothelial cells. *Thromb. Res.* 102: 229-237, 2001a.

VEIGA, S.S.; ZANETTI, V.C.; BRAZ, A.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W. Extracellular matrix molecules as targets for brown spider venom toxins. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 34:843-850, 2001b.

VULINEC, K. Collective Security: Aggregation by insects as a defense. In: EVANS D.L. & SCHMIDT J.O. *Insect defenses- Adaptive mechanisms and strategies of prey and predators.* State University of New York, p. 251-288, 1990.

WARE, J.H.; WAN, X.S.; RUBIN, H.; SCHECHTER, N.M.; KENNEDY, A.R. Soybean Bowman-Birk protease inhibitor is a highly effective inhibitor of human mast cell chymase. *Arch. Biochem. Biophys.* 344:133-138, 1997.

YATOGHO, T.; IZUMI, M.; KASHIWAGI, H.; HAYASHI, M. Novel purification of vitronectin from human plasma by heparin affinity. *Cell Struct. Funct.* 13: 281-292, 1988.

YINGPRASERTCHAI, S.; BUNYASRISAWAT, S.; RATANABANANGKON, K. Hyaluronidase inhibitors (sodium cromoglycate and sodium auro-thiomalate) reduce the local tissue damage and prolong the survival time of mice injected

with *Naja kaouthia* and *Calloselasma rhodostoma* venoms. *Toxicon* 42: 635-346, 2003.

YUKI, H.; FISHMAN, W.H. Purification and characterization of leech hyaluronic acid-endo-beta-glucuronidase. *J. Biol. Chem.* 238: 1877-1879, 1963.

