

**UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

Hemolinfa bruta e frações de *Lonomia obliqua* Walker, 1855 (Lepidoptera, Saturniidae): avaliação do perfil proteico e viabilidade celular em cultura hipocampal primária de ratos Wistar

**Silviane Maggi**

Caxias do Sul

2015

**Silviane Maggi**

Hemolinfa bruta e frações de *Lonomia obliqua* Walker, 1855 (Lepidoptera, Saturniidae): avaliação do perfil proteico e viabilidade celular em cultura hipocampal primária de ratos Wistar

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando a obtenção de grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Dr. Sidnei Moura e Silva

Co-orientador: Dr. Leandro Tasso

Caxias do Sul

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Universidade de Caxias do Sul  
UCS - BICE - Processamento Técnico

M193h Maggi, Silviane, 1984-

Hemolinfa bruta e frações de *Lonomia obliqua* Walker, 1855 (Lepidoptera, Saturniidae) : avaliação do perfil proteico e viabilidade celular em cultura hipocampal primária de ratos Wistar / Silviane Maggi. – 2015.  
162 f. : il. ; 30 cm

Apresenta bibliografia.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2015.

Orientador: Dr. Sidnei Moura e Silva ; Coorientador: Dr. Leandro Tasso.

1. Taturana. 2. Proteínas. 3. Hemolinfa. 4. Biotecnologia. I. Título.

CDU 2. ed.: 595.78

Índice para o catálogo sistemático:

1. Taturana	595.78
2. Proteínas	577.112
3. Hemolinfa	591.113
4. Biotecnologia	60

Catalogação na fonte elaborada pela bibliotecária  
Ana Guimarães Pereira – CRB 10/1460

## SILVIANE MAGGI

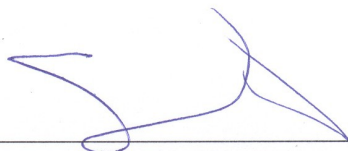
### HEMOLINFA BRUTA E FRAÇÕES DE *Lonomia obliqua* WALKER, 1855 (LEPIDOPTERA, SATURNIIDAE): AVALIAÇÃO DO PERFIL PROTEICO E VIABILIDADE CELULAR EM CULTURA HIPOCAMPAL PRIMÁRIA DE RATOS WISTAR

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

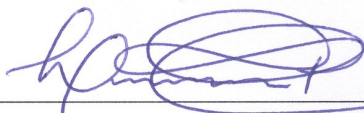
Orientador: Prof. Dr. Sidnei Moura e Silva

Co-orientador: Prof. Dr. Leandro Tasso

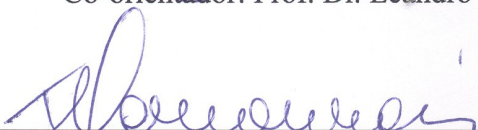
DISSERTAÇÃO APROVADA EM 26 DE FEVEREIRO DE 2015.



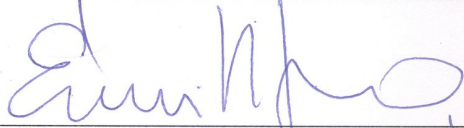
Orientador: Prof. Dr. Sidnei Moura e Silva



Co-orientador: Prof. Dr. Leandro Tasso



Prof. Dr.ª Tania Marcourakis



Prof. Dr. Ernani Pinto Júnior



Prof. Dr.ª Neiva Monteiro de Barros

*Dedico este trabalho à minha família, meus pais Alfeu e Ivete e meu irmão Tiago, minha base, que sempre promoveu o apoio, incentivo e motivação para que este sonho se tornasse realidade.*

## AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo apoio e incentivo incondicionais.

Ao professor Dr. Sidnei Moura e Silva (UCS), orientador deste trabalho, pelo incentivo, confiança e amizade e por promover as condições e orientações para a realização deste.

Ao professor Dr. Leandro Tasso (UCS), co-orientador deste trabalho.

À Dr<sup>a</sup>. Tania Marcourakis (FCF-USP), Dr. Ronaldo Z. Mendonça (Instituto Butantan), Dr<sup>a</sup>. Lisete Lorini (UPF) e Dr. Antônio Pinto (PUC-RS), colaboradores neste trabalho.

À Dr<sup>a</sup>. Paula Eichler (PUC-RS), Dr. Pablo Machado (PUC-RS), Dr. Diógenes Santos (PUC-RS), Kátia (CIT/RS), Dr. Edegar Fronza (UCS), Msc. Karina Villar (Instituto Butantan).

À Dr<sup>a</sup>. Mariana Roesch Ely (UCS) e Dr<sup>a</sup>. Neiva Monteiro de Barros (UCS) que integraram a banca de acompanhamento e aos integrantes da banca examinadora, por aceitarem o convite e investirem uma parcela de seu tempo na avaliação deste trabalho.

Aos colegas do LBIOP (UCS), Dr<sup>a</sup>. Luciane Minetto, Dr. Thiago Barcellos, Msc. Luciane R., Lauren, Paulo, Manuela, Msc. Marílda, Flávio, Ana Letícia, Ariane, Francine, Franciele, Maicon, Pablo, Paola, Rafael, Carolina e Débora e aos colegas do laboratório de Proteômica.

Aos amigos do Laboratório de Toxicologia Celular e Molecular (FCF-USP), Msc. Mariana Sayuri Udo, Dr. Raphael Garcia, Mariana Aguilera, Wallace Moreira e Stephanie.

Aos professores Msc. Marco Aurélio Dorneles Neto e Dr<sup>a</sup>. Bárbara De Antoni Zoppas (UCS).

Aos colaboradores desta universidade, em especial à técnica do LBIOP (UCS) Dr<sup>a</sup>. Fabiana Agostini, e à secretária do programa de pós-graduação, Lucimara Rech, pelo suporte.

À CAPES, pelo provimento do auxílio financeiro e à esta universidade.

Às minhas amigas Ângela Ferrari e Caroline Frozza pelo apoio e incentivo incondicionais.

A todos, não citados nominalmente aqui, que de alguma forma contribuíram para a execução deste trabalho.

*“Até um relógio parado está certo duas vezes ao dia.”*

*Lewis Carroll*

*“Só se pode alcançar um grande êxito  
quando nos mantemos fiéis a nós mesmos.”*

*Friedrich Nietzsche*

## RESUMO

A elevação da expectativa de vida e a diminuição no índice de natalidade têm como consequência o envelhecimento da população mundial, com aumento da incidência de doenças neurodegenerativas. Pessoas acometidas por esses males dispõem atualmente de limitados recursos terapêuticos. Estes muitas vezes são só paliativos, com baixa ou nula perspectiva quanto à reversão dos danos instalados. Por isso, o estudo de substâncias possivelmente neuroprotetoras, que apresentam potencial aplicação como novas drogas, tem sido alvo de pesquisas. Estudos realizados a partir das toxinas produzidas por lagartas da mariposa *Lonomia obliqua*, as quais têm causado inúmeros acidentes na região Sul do Brasil, identificaram uma proteína presente na hemolinfa com atividade antiapoptótica. A mesma demonstrou provável atuação na manutenção do potencial elétrico de membrana mitocondrial elevado, evitando a morte celular por mecanismo apoptótico. Desta forma, este estudo tem como objetivo avaliar o perfil proteico e efeito da hemolinfa bruta e fração cromatográfica sobre a viabilidade celular de cultura primária de neurônios hipocâmpais de ratos após a indução de apoptose. Para avaliação do perfil proteico em amostras da hemolinfa bruta e frações de 3 lotes de lagartas de origens distintas, foi utilizada a abordagem proteômica *shotgun*, semi-quantitativa. Foram identificadas 76 proteínas totais, sendo 71 na hemolinfa e 40 nas frações. Na avaliação do extrato bruto da hemolinfa predominaram proteínas do tipo antiviral, serino proteases, hemolinas e inibidores de proteases. Já nas frações avaliadas, foram identificadas proteínas dos grupos hemolinas, serino proteases e inibidores de proteases. Os lotes apresentaram diferenças quali e quantitativas nas proteínas identificadas entre si. Em relação à viabilidade celular, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) nas células tratadas com hemolinfa ou frações e induzidas ao dano oxidativo. Porém o tratamento das células com a fração na concentração de 0,05 e 0,1% (v/v) por 24 h foi capaz de manter a viabilidade celular significativamente maior em relação ao controle positivo ( $p < 0,05$  e  $p < 0,01$  respectivamente). Estes resultados podem contribuir na identificação de proteínas com potencial aplicação como neuroprotetoras.

Palavras-chave: *Lonomia obliqua*, proteômica, *shotgun*, cultura hipocâmpal.



## **ABSTRACT**

*Increased life expectancy and the decline in births results in aging population, with increasing of neurodegenerative diseases incidence. The therapeutic is limited, often only palliative, with low or no prospect damage reversal. Study of substances with potentially neuroprotective has been the focus of research. Toxic proteins of *Lonomia obliqua* caterpillars, which have caused several accidents in southern Brazil, were identified in the hemolymph with anti-apoptotic activity. This protein had demonstrated the maintaining of high electric potential of mitochondrial membrane, preventing cell death by apoptosis mechanism. This study aims the evaluation of the protein profile and effect of hemolymph and fraction on cell viability of rats primary cultured hippocampal neurons after induction of apoptosis. Semi-quantitative shotgun proteomics approach was used to evaluate the protein profile of 3 lots of different origin, 71 in hemolymph and 40 in fractions, in a total of 76 proteins. Antiviral protein predominated in crude extract of hemolymph, following by serine proteases, hemolines and protease inhibitors. In fractions were identified hemolines, serine proteases and protease inhibitors. No statistics differences were found ( $p < 0.05$ ) in the cell viability induced of oxidative damage, which were treated with hemolymph or fractions. However, the treatment with the fraction at concentration of 0.05 and 0.1% (v/v) for 24 hours, was able to maintain cell viability significantly higher than positive control ( $p < 0.05$  and  $p < 0.01$  respectively). These results may contribute to the identification of proteins with potential use as neuroprotective in degenerative conditions.*

*Keywords: *Lonomia obliqua*, proteomics, shotgun, hippocampal culture.*

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

**Figura 1.** Vias intrínseca e extrínseca de apoptose.

**Figura 2.** Lagarta de 6º instar de *Lonomia obliqua*.

**Figura 3.** Representação esquemática dos efeitos biológicos do veneno de *L. obliqua*.

**Figura 4.** Distribuição de proteínas em A: extrato de cerdas e B: hemolinfa de lagartas de *L. obliqua*.

**Figura 5.** Modelo predito de *Losac*.

**Figura 6.** Modelo estrutural predito de *Lopap*.

**Figura 7.** Esquema representando a Ionização por *Electrospray (ESI)* em modo positivo.

**Figura 8.** Esquema de um *LTQ-Orbitrap*.

**Figura 9.** Esquema ilustrativo de abordagem proteômica *shotgun*.

**Figura 10.** Lote de lagartas coletadas em caixa de transporte.

**Figura 11.** Espermatozoides e células do epitélio vaginal de ratos Wistar observados ao microscópio óptico.

**Figura 12.** Fracionamento das amostras de hemolinfa por cromatografia de troca iônica.

**Figura 13.** Representação esquemática das etapas envolvidas na identificação de proteínas pela estratégia proteômica *shotgun* adotada neste estudo.

**Figura 14.** A: Rato Wistar fêmea com útero de 19 dias de gestação exposto (setas). B: Feto com 19 dias de vida embrionária.

**Figura 15.** Cromatogramas de troca aniônica de hemolinfa (0,5 mL) de lagartas de *L. obliqua*. A: Lote 1; B: Lote 2; C: Lote 3.

**Figura 16.** Gel de eletroforese bidimensional de hemolinfa de lagartas de *L. obliqua*.

**Figura 17.** Diagrama de Venn demonstrando o número de proteínas identificadas. A: na hemolinfa bruta (HB) e B: na fração (Fr) de *L. obliqua* dos diferentes lotes e as proteínas comuns e não comuns entre eles.

**Figura 18.** Distribuição das proteínas identificadas nas amostras de A: Hemolinfa e B: Frações, por *shotgun*.

**Figura 19.** Viabilidade celular em diferentes concentrações de hemolinfa bruta e fração purificada pelo método de redução do MTT em cultura primária hipocampal embrionária.

**Figura 20.** Células hipocampais embrionárias de ratos em cultura, com diferentes estágios de diferenciação. A: dia 0 de cultivo; B: 3° dia de cultivo; C: 7° dia de cultivo.

**Figura 21.** Viabilidade celular após exposição das culturas primárias hipocampais a diferentes concentrações de HB e Fr pelos períodos de 1 e 2 h e subsequente exposição ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 30 min.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Patentes nacionais e internacionais relacionadas a compostos provenientes de *L. obliqua*.

**Tabela 2.** Plantas hospedeiras de *L. obliqua*.

**Tabela 3.** Inimigos naturais de lagartas e pupas de *L. obliqua*.

**Tabela 4.** Proteínas e suas respectivas atividades descritas para hemolinfa e extrato de cerdas de lagartas de *L. obliqua*.

**Tabela 5.** Composição do gradiente em relação ao tempo de eluição.

**Tabela 6.** Proteínas identificadas nas amostras de hemolinfa bruta e frações por meio de abordagem *shotgun*.

**Tabela 7.** *Heat map* demonstrando a abundância das proteínas com base na contagem espectral.

**Tabela 8.** Perfil de peptídeos e proteínas identificados por *NanoLC-LQT-Orbitrap* para as frações purificadas e hemolinfa bruta de *L. obliqua*.

**Tabela 9.** Proteínas identificadas na fração de hemolinfa de *L. obliqua* do Lote 1.

**Tabela 10.** Proteínas identificadas na fração de hemolinfa de *L. obliqua* do Lote 2.

**Tabela 11.** Proteínas identificadas na fração de hemolinfa de *L. obliqua* do Lote 3.

**Tabela 12.** Proteínas identificadas na hemolinfa bruta de *L. obliqua* do Lote 1.

**Tabela 13.** Proteínas identificadas na hemolinfa bruta de *L. obliqua* do Lote 2.

**Tabela 14.** Proteínas identificadas na hemolinfa bruta de *L. obliqua* do Lote 3.

**Tabela 15.** Proteínas identificadas na hemolinfa bruta e frações dos 3 lotes com as respectivas abundâncias e atividades.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
APS	<i>Ammonium persulfate</i> (Persulfato de amônio)
BD	Becton Dickinson
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> (Albumina de soro bovino)
cAMP	<i>3',5'-cyclic adenosine monophosphate</i> (3',5'-Monofosfato de adenosina cíclico)
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
cDNA	<i>Complementary deoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucleico complementar)
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CGEN	Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
CHAPS	<i>3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate</i> (3-[(3-colamidopropil)-dimetil amônio]-propano sulfonato)
CID	<i>Collision-induced Dissociation</i> (Dissociação Induzida por Colisão)
CIT/RS	Centro de Informações Toxicológicas do Rio Grande do Sul
Co.	<i>Company</i> (Companhia)
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DG	Dia gestacional
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido Desoxirribonucleico)
DNase	Deoxiribonuclease I
DPBS	<i>Dubelco's Phosphate Buffered Saline</i> (Tampão fosfato salino de Dubelco)
DTT	Ditiotreitol

<i>ESI</i>	<i>Electrospray Ionization</i> (Ionização <i>Electrospray</i> )
EUA	Estados Unidos da América
<i>FBS</i>	<i>Fetal Bovine Serum</i> (Soro fetal bovino)
FCF	Faculdade de Ciências Farmacêuticas
FC	Fração Cromatográfica
HB	Hemolinfa Bruta
<i>HBSS</i>	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i> (Solução salina balanceada de Hank)
<i>HPLC</i>	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)
IAA	Iodoacetamida
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
ICMBio	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
IM	Intramuscular
<i>Inc.</i>	<i>Incorporation</i> (Incorporação)
IP	Intraperitoneal
<i>IPG</i>	<i>Immobilized pH Gel</i> (Gel de pH imobilizado)
LBIOP	Laboratório de Biotecnologia de Produtos Naturais e Sintéticos
<i>LC</i>	<i>Liquid Chromatography</i> (Cromatografia líquida)
LDH	Lactato desidrogenase
<i>Lopap</i>	<i>Lonomia obliqua Prothrombin Activator Protease</i> (Protease ativadora de protrombina de <i>Lonomia obliqua</i> )
<i>Losac</i>	<i>Lonomia obliqua Stuart-Factor Activator</i> (Ativador de Fator Stuart de <i>Lonomia obliqua</i> )
<i>LTQ</i>	<i>Linear Trap Quadrupole</i> (Armadilha quadrupolo linear)

<i>MALDI</i>	<i>Matrix-assisted Laser Desorption Ionization</i> (Dessorção/ionização por laser em matriz)
MMA	Ministério do Meio Ambiente
<i>MS</i>	<i>Mass Spectrometry</i> (Espectrometria de Massas)
MTT	Brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol
<i>m/z</i>	Razão massa/carga
n°	Número
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo na forma reduzida
NB	Neurobasal
<i>NCBI</i>	<i>National Center for Biotechnology Information</i> (Centro Nacional de Informações em Biotecnologia)
<i>NO</i>	<i>Nitric oxid</i> (Óxido Nítrico)
N-terminal	Amino-terminal
P.A.	Para análise
<i>PBS</i>	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Tampão fosfato salino)
pH	Potencial de hidrogênio
pI	Ponto isoelétrico
PLL	Poli- <i>L</i> -Lisina
PUCRS	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
<i>Q-TOF</i>	<i>Quadrupole-time-of-flight</i> (Quadrupolo Tempo de Voo)
<i>rLopap</i>	<i>Recombinant Lonomia obliqua Prothrombin Activator Protease</i> (Protease ativadora de protrombina de <i>Lonomia obliqua</i> recombinante)
<i>SDS</i>	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> (Dodecil Sulfato de Sódio)
<i>SDS-PAGE</i>	<i>Sodium Dodecyl Sulfate Poliacrylamide Gel Electrophoresis</i> (Eletroforese em Gel de Poliacrilamida - Dodecil Sulfato de Sódio)

<i>Sf-9</i>	<i>Spodoptera frugiperda</i>
SISBIO	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
TCA	<i>Trichloroacetic acid</i> (Ácido Tricloroacético)
TEMED	<i>N, N, N', N'</i> -Tetrametiletenodiamina
TOF	<i>Time-of-Flight</i> (Tempo de voo)
UCS	Universidade de Caxias do Sul
UPF	Universidade de Passo Fundo
USP	Universidade de São Paulo
UV	Ultravioleta



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>19</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>22</b>
2.1 ENVELHECIMENTO E CONDIÇÕES DEGENERATIVAS .....	22
2.2 INSETOS E O POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO .....	25
2.3 GÊNERO <i>LONOMIA</i> .....	26
2.4 <i>LONOMIA OBLIQUA</i> WALKER, 1855.....	29
2.4.1 <i>Morfologia</i> .....	31
2.4.2 <i>Manifestações clínicas e laboratoriais nos acidentes com lagartas do gênero Lonomia</i> .....	33
2.4.3 <i>Composição do veneno</i> .....	36
2.4.3.1 Hemolinas .....	40
2.4.3.2 Lipocalinas .....	41
2.4.3.3 Fosfolipases A2 .....	44
2.4.3.4 Hialuronidasas .....	45
2.4.3.5 Lonofibrase .....	45
2.4.3.6 Serpinas .....	46
2.4.3.7 Proteína Antiapoptótica .....	46
2.4.3.8 Proteína antiviral .....	48
2.4.3.9 Outras .....	49
2.4.4 <i>Tratamento do envenenamento</i> .....	49
2.4.5 <i>Avaliação da hemolinfa e extrato de cerdas de Lonomia</i> .....	49
2.4.5.1 Amostras .....	49
2.4.5.2 Proteômica baseada em Espectrometria de Massas.....	50

2.4.5.2.1 Abordagem <i>Shotgun</i> .....	56
2.4.5.3 Eletroforese bidimensional .....	58
2.4.5.4 Culturas primárias hipocampais .....	59
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>61</b>
3.1 ANIMAIS .....	61
3.1.1 <i>Insetos</i> .....	61
3.1.2 <i>Ratos</i> .....	62
3.1.2.1 Obtenção das fêmeas prenhes e verificação da prenhez.....	63
3.2 AMOSTRAS DE HEMOLINFA .....	64
3.3 PURIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE HEMOLINFA .....	65
3.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PROTEICA DAS AMOSTRAS.....	67
3.5 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA ( <i>SDS-PAGE</i> ) BIDIMENSIONAL .....	68
3.5.1 <i>Preparação dos géis</i> .....	68
3.5.2 <i>Preparo da amostra</i> .....	68
3.5.3 <i>Focalização isoeletrica</i> .....	69
3.5.4 <i>Eletroforese</i> .....	70
3.5.5 <i>Coloração do gel</i> .....	71
3.6 AVALIAÇÃO DO PERFIL PROTEICO POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	72
3.6.1 <i>Precipitação de proteínas</i> .....	72
3.6.2 <i>Digestão das Proteínas</i> .....	73
3.6.3 <i>Mapeamento Peptídico das Amostras com quantificação label free</i> .....	73
3.6.4 <i>Análise dos dados</i> .....	75
3.7 PREPARAÇÃO DE CULTURAS DE CÉLULAS NEURONAIS.....	77
3.8 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DA HEMOLINFA .....	83
3.9 INDUÇÃO DE APOPTOSE POR PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) .....	83

3.10 DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR PELO MÉTODO DE REDUÇÃO DO MTT.....	84
3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	86
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>87</b>
4.1 FRACIONAMENTO DA HEMOLINFA .....	87
4.2 PERFIL PROTEICO DA HEMOLINFA BRUTA EM ELETROFORESE BIDIMENSIONAL .....	89
4.3 PROTEÍNAS IDENTIFICADAS A PARTIR DA ABORDAGEM <i>SHOTGUN</i> .....	91
4.4 CITOTOXICIDADE DA HEMOLINFA E FRAÇÃO EM CULTIVO PRIMÁRIO HIPOCAMPAL EMBRIONÁRIO .....	106
4.5 EFEITO DA HEMOLINFA E FRAÇÃO EM CÉLULAS TRATADAS COM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) .....	109
<b>5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS .....</b>	<b>118</b>
5.1 CONCLUSÕES .....	118
5.2 PERSPECTIVAS .....	119
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>120</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os insetos representam cerca de 75% de todos os animais existentes. Estes organismos são capazes de produzir uma série de compostos químicos que os auxiliaram a sobreviver às agressões do meio ambiente durante sua evolução (RATCLIFFE *et al.*, 2011). Neste contexto, evolutivamente, os venenos e peçonhas animais foram desenvolvidos com o objetivo de defesa contra predadores e/ou captura de presas, provocando modificações fisiológicas nestes inimigos naturais. No entanto, pelas suas características, estes apresentam potencial aplicação como novas drogas e por consequência têm sido alvo de pesquisas (CALVETE, 2009).

Um exemplo disso são as mariposas da família Saturniidae. Em 1969, na Venezuela, Arocha-Piñango & Layrisse (1969) descreveram que indivíduos, os quais tiveram contato acidental com a forma larval destes insetos, desenvolveram diátese hemorrágica generalizada. Acidentes com distúrbios hemorrágicos envolvendo lagartas desta família foram relatados também na Argentina, Brasil, Guiana Francesa, Paraguai e Peru (AROCHA-PIÑANGO *et al.*, 1988; DUARTE *et al.*, 1990; DUARTE *et al.*, 1994; AROCHA-PIÑANGO *et al.*, 1992; FRAIHA-NETO *et al.*, 1992; HOMMEL *et al.*, 1995; KELEN *et al.*, 1995; AROCHA-PIÑANGO & GUERRERO, 2001). A ocorrência de lagartas do gênero *Lonomia* ainda foi descrita no México e Panamá (GARDINER, 1967).

A descrição do gênero *Lonomia*, bem como de uma de suas espécies (*Lonomia obliqua* Walker, 1855), foi, segundo Lemaire (2002), realizada a partir de espécimes oriundos do estado do Rio de Janeiro. Já os primeiros relatos de acidentes com lagartas do gênero *Lonomia* no Brasil ocorreram a partir de 1980, no Amapá e no Pará. Nestes, a causadora foi a espécie *Lonomia achelous*, que utilizava-se da seringueira-de-várzea (*Hevea brasiliensis*)

como planta hospedeira, sendo registrados 36 casos com uma mortalidade de 38% (FRAIHA-NETO *et al.*, 1986).

A partir do final da década de 80, uma série de acidentes envolvendo a espécie identificada como *Lonomia obliqua*, na região sul do Brasil, foram relatados. Estes ocorreram especialmente no oeste do Estado de Santa Catarina e norte do Rio Grande do Sul, alcançando proporções epidêmicas com inclusive registro de casos fatais (DUARTE *et al.*, 1990; DUARTE *et al.*, 1994; KELEN *et al.*, 1995; DUARTE *et al.*, 1996; ZANNIN *et al.*, 2003).

Os acidentados por lagartas de *L. obliqua* podem manifestar uma síndrome hemorrágica associada à coagulopatia de consumo que pode incluir hemólise intravascular e insuficiência renal aguda. Na dependência de fatores como características individuais das vítimas, intensidade da exposição ao veneno e do número de animais envolvidos, os acidentes podem ter graduação de leves até graves ou mesmo fatais (DUARTE *et al.*, 1996; FAN *et al.*, 1998; GAMBORGI *et al.*, 2006; MALAQUE *et al.*, 2006; RIELLA *et al.*, 2008; BASUALDO *et al.*, 2008).

Com base na atividade fisiológica apresentada pelo veneno em suas vítimas, foram iniciados estudos sobre a composição do mesmo, com intuito de desenvolver terapêutica para o envenenamento, bem como identificar outras potenciais atividades. Dentre os compostos identificados, uma proteína foi bem caracterizada, denominada *Lopap* (*Lonomia Prothrombin Activator Protease*), porém a literatura ainda carece de estudos que elucidem a composição proteica total do veneno e fluidos biológicos da lagarta, que até o momento permanece incompleta. Os proteomas são altamente dinâmicos e podem mudar com o desenvolvimento e ambiente do inseto (WILKINS *et al.*, 1997), tornando relevante que a caracterização proteica seja realizada levando em consideração estas características.

Dentre as amplas possibilidades de moléculas bioativas que os insetos podem fornecer, compostos proteicos com atividade antiapoptótica foram descritos (RHEE *et al.*, 2013; CHOI

*et al.*, 2002; KIM *et al.*, 2001; RHEE & PARK, 2000). Esta atividade pode ser de grande interesse em patologias que se desenvolvem com perda de células por apoptose, como as neurodegenerativas. Desta forma, é de valia investigar se substâncias com este potencial apresentam atividade neuroprotetora. A atividade antiapoptótica da hemolinfa de *L. obliqua* já foi descrita para células de insetos e de mamíferos frente a indutores físicos, químicos e biológicos (VIEIRA *et al.*, 2010; MENDONÇA *et al.*, 2008; SOUZA *et al.*, 2005; MARANGA *et al.*, 2003), porém ainda não foram descritos estudos conduzidos com células nervosas.

Com base no exposto, o objetivo deste trabalho foi identificar a composição proteica da hemolinfa e frações, de três colônias de lagartas de *L. obliqua*, provenientes de diferentes posições geográficas, coletadas em períodos distintos e alimentando-se de vegetais diversos. Ainda, este teve por objetivo analisar o efeito da hemolinfa bruta e frações na viabilidade celular em cultura primária hipocampal embrionária de ratos da linhagem Wistar.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Envelhecimento e condições degenerativas

A perspectiva de envelhecimento da população em maiores proporções traz consigo a necessidade de planejamento de ações que visem atender esta nova realidade nos campos social, político, econômico e de saúde. Em termos de saúde, o envelhecimento caracteriza-se pela perda gradativa de funções biológicas, aumento da probabilidade de morte e/ou associação de doenças (HARPER, 1982), que determinam a peculiaridade das condições destes indivíduos neste aspecto.

No cérebro, o processo de envelhecimento provoca alterações estruturais e funcionais o que conduz ao declínio cognitivo (MACCIONE *et al.*, 2001). Dentro deste contexto, o aumento da incidência de doenças neurodegenerativas associadas ao envelhecimento tem se apresentado cada vez mais notável, crescendo à medida que há um incremento da população idosa por meio da elevação da expectativa de vida. Esta última, de maneira geral, tem aumentado no decorrer do último século. Isto tem uma relação direta com a melhoria dos padrões de saneamento e tratamento de saúde. Quando comparamos países desenvolvidos e em desenvolvimento, observamos grandes diferenças com relação ao seu crescimento demográfico. Em países desenvolvidos observa-se que a população total continua a crescer lentamente, no entanto, o aumento da proporção de pessoas idosas cresce muito mais rapidamente. Por outro lado, em países em desenvolvimento, o total da população tem um crescimento mais acelerado, tendo por consequência uma parcela menor de idosos. No decorrer dos últimos anos, entretanto, estes aspectos têm apresentado uma mudança progressiva na maior parte dos países menos desenvolvidos, a exemplo do que acontece atualmente nos países desenvolvidos. Isto é decorrente do declínio da taxa de fecundidade e

aumento rápido do número de indivíduos com 60 anos de idade ou mais, devendo a proporção de idosos crescer exponencialmente com relação à população em geral (UNITED NATIONS, 2009).

No Brasil, um representante dos países em desenvolvimento, em 2008, as crianças de 0 a 14 anos de idade representavam 26,5% da população total, enquanto as pessoas com 65 anos ou mais correspondiam a 6,5%. Em 2050, a projeção é de que o primeiro grupo represente 13,1% ao passo que os idosos ultrapassem os 22,7% da população total (IBGE, 2008).

Com o avançar da idade, entre as alterações observadas, pode ser verificado um aumento de apoptose no córtex cerebral e na região CA1 hipocampal (WEST *et al.*, 1994). Este processo de morte celular programada, definido como fisiológico ou patológico de deleção de células, com papel importante na homeostase dos tecidos, é altamente regulado e essencial para o crescimento e sobrevivência em todos os eucariotos (WERTZ & HANLEY, 1996).

Os processos de morte celular podem ser definidos com base em critérios como características morfológicas (apoptose, necrose, autofagia ou associada à mitose), enzimáticas (em relação ao envolvimento de nucleases ou proteases), imunológicas (imunogênica ou não) ou aspectos funcionais (programada ou acidental, fisiológica ou patológica). Em organismos adultos, sob condições de homeostasia, para que os eventos de replicação celular possam ocorrer, outras células precisam ser eliminadas (GALUZZI *et al.*, 2007). Um desequilíbrio na relação entre proliferação celular e morte celular pode determinar condições patológicas, bem como o excesso ou deficiência de morte celular, principalmente em células pós-mitóticas como neurônios.

Perda de células neuronais durante o desenvolvimento do sistema nervoso central ocorre de maneira normal. No entanto, as mesmas podem se dar também em condições





A via extrínseca tem origem na ativação de receptores de morte da superfície celular como Fas que resulta na ativação da caspase-8 ou 10. Já a via intrínseca ocorre a partir da liberação mitocondrial de citocromo *c* e ativação da caspase-9. A caspase-9 pode ser ativada também a partir de uma terceira via, menos conhecida, a partir do retículo endoplasmático. As caspases podem ser classificadas como iniciadoras, clivando caspases efetoras de forma a torná-las ativas, ou efetoras, que clivam outros substratos proteicos na célula, resultando no processo apoptótico (BREDESEN *et al.*, 2006).

O processo apoptótico apresenta padrões de alterações morfológicas e bioquímicas celulares que incluem a formação de vacúolos citoplasmáticos, encolhimento e diminuição do contato entre células vizinhas, fragmentação da membrana nuclear, condensação da cromatina na periferia do núcleo, despolarização mitocondrial, fragmentação internucleossomal do *DNA* e alterações na assimetria de fosfolípidos de membrana plasmática (OBERHAMMER *et al.*, 1993; SARASTE & PULKKI, 2000). Nas doenças neurodegenerativas pode ser observada a diminuição de células de determinadas populações de neurônios. Um exemplo é a doença de Alzheimer, onde a redução se dá principalmente nas regiões do hipocampo e amígdala, afetando os neurônios colinérgicos. Enquanto na doença de Parkinson verifica-se queda do número de neurônios dopaminérgicos da substância negra e dos gânglios basais (PRZEDBORSKI *et al.*, 2003). O declínio do número de neurônios neste tipo de disfunção pode ser mediado por mecanismos apoptóticos (MATTSON, 2000).

## **2.2 Insetos e o potencial biotecnológico**

Os trabalhos científicos relacionados a compostos de origem animal possuem uma representatividade menor quando comparados aos dedicados a moléculas provenientes de

fontes vegetais. No entanto, estes produtos podem constituir uma fonte igualmente rica e com bom potencial biotecnológico.

Cerca de 75% dos animais conhecidos são representados por insetos, sendo que durante sua evolução, estes desenvolveram mecanismos úteis para sua sobrevivência (RATCLIFFE *et al.*, 2011). Quando são avaliadas formas imaturas de insetos, larvas ou lagartas, mais de 165.000 espécies são descritas, dentre as quais a maioria é fitófaga (DIAZ, 2005).

Neste contexto, muitas moléculas ativas naturalmente sintetizadas são usadas com as mais diversas finalidades. Estas podem servir como forma de proteção frente a inimigos naturais ou para favorecer sua alimentação, ou ainda reprodução e continuidade da espécie, entre outras funções. Desta forma, os insetos desenvolveram substâncias que tem a capacidade de promover alterações fisiológicas em outros organismos vivos (CALVETE, 2009). Estas, quando isoladas e caracterizadas quanto às suas propriedades, podem fornecer subsídio com aplicações que variam da constituição de princípios ativos de drogas, à melhoria de processos produtivos, como por exemplo, o aumento da produção de proteínas recombinantes por suplementação de cultivos celulares (MARANGA *et al.*, 2003; RAFFOUL *et al.*, 2005; CERÓN *et al.*, 2010; HEINEN & VEIGA, 2011; RHEE *et al.*, 2013; CARMO *et al.*, 2014). Formas larvais de mariposas normalmente são revestidas por cerdas que possuem propriedades urticantes e podem promover alterações fisiológicas severas, conduzindo várias espécies animais ao óbito.

### **2.3 Gênero *Lonomia***

O gênero *Lonomia* é pertencente à classe Insecta, ordem Lepidoptera, sendo esta última representada pelas borboletas, de hábito diurno, e pelas mariposas, de hábito noturno.

São vários os lepidópteros aos quais se atribui importância médica, porém o gênero *Lonomia* destaca-se pela gravidade dos acidentes os quais podem até mesmo ser fatais (SPECHT *et al.*, 2008). Os insetos deste gênero possuem distribuição pelas Américas Central e do Sul (GARDINER, 1967; AROCHA-PIÑANGO *et al.*, 1988; DUARTE *et al.*, 1990; AROCHA-PIÑANGO *et al.*, 1992; FRAIHA-NETO *et al.*, 1992; DUARTE *et al.*, 1994; HOMMEL *et al.*, 1995; KELEN *et al.*, 1995; AROCHA-PIÑANGO & GUERRERO, 2001).

No Brasil, duas espécies têm sido relacionadas a acidentes com humanos. A *Lonomia achelous* Cramer, 1977, com relatos de envenenamentos no norte do país, no Pará e no Amapá (FRAIHA-NETO *et al.*, 1986). A *Lonomia obliqua* Walker, 1855, responsabilizada por casos descritos na região sul e sudeste e de ocorrência relatada em outras regiões do país (DUARTE *et al.*, 1990; DUARTE *et al.*, 1994; KELEN *et al.*, 1995; DUARTE *et al.*, 1996; ZANNIN *et al.*, 2003).

As lagartas de mariposas do gênero *Lonomia* enquadram-se neste último grupo. Conhecidas popularmente como taturanas, estas lagartas são referenciadas por provocar acidentes com humanos, que, ao contato com suas cerdas desenvolvem dor em queimação, podendo evoluir para uma síndrome hemorrágica com desenvolvimento de insuficiência renal aguda e até mesmo óbito (DUARTE *et al.*, 1994; KELEN *et al.*, 1995; DUARTE *et al.*, 1996; KOWACS *et al.*, 2006; MALAQUE *et al.*, 2006; SCHMITBERGER *et al.*, 2013; MEDEIROS *et al.*, 2014).

A partir destas características, estudos desenvolvidos com lagartas deste gênero têm identificado os principais componentes de seu veneno, os quais são responsáveis pelas manifestações observadas nos acidentados. Estes autores têm se empenhado em elucidar suas propriedades e em avaliar possíveis aplicações, possibilitando o desenvolvimento de um soro empregado na terapêutica do envenenamento (DIAS-DA-SILVA *et al.*, 1996; CAMPOS *et al.*, 1996; CHUDZINSKI-TAVASSI & FLORES, 2005; ALVAREZ-FLORES *et al.*, 2011;

BERGER *et al.*, 2013). Alguns destes trabalhos renderam registros patentários, conforme apresentados na **Tabela 1**.

**Tabela 1.** Patentes nacionais e internacionais relacionadas a compostos provenientes de *L. obliqua*.

Pedido de patente WIPO/INPI	Data de Publicação	Patente	Instituições envolvidas
WO/2003/070746	28/08/2003	Purificação e caracterização de um ativador de protrombina a partir das cerdas de <i>Lonomia obliqua</i> : para ser usado em kits diagnósticos para detecção de protrombina plasmática em pacientes em estado hemorrágico	Instituto Butantan (Brasil); FAPESP (Brasil) e Biolab Sanus Farmacêutica Ltda. (Brasil)
WO/2006/021062	03/02/2006	Processo para a obtenção da protease ativadora de protrombina recombinante ( <i>rLopap</i> ) em forma monomérica; a protease ativadora de protrombina recombinante ( <i>rLopap</i> ) bem como sua sequência de aminoácidos; o uso desta protease como agente defibrinogenante e o kit diagnóstico para desprotrombinemias	Instituto Butantan (Brasil); FAPESP (Brasil) e Biolab Sanus Farmacêutica Ltda. (Brasil)
WO/2007/028223	15/03/2007	Composições farmacêuticas baseadas em <i>Lopap</i> e suas utilizações: referente ao uso de <i>Lopap</i> como modulador de morte celular e degeneração causada por cicatrizes, envelhecimento e agentes externos	Instituto Butantan (Brasil); FAPESP (Brasil) e Biolab Sanus Farmacêutica Ltda. (Brasil)
WO/2009/093189	30/07/2009	Peptídeos, composições e suas utilizações: referente às utilizações de peptídeos derivados de <i>Lopap</i> para regeneração tecidual e reparação de cicatrizes	Instituto Butantan (Brasil); FAPESP (Brasil) e Biolab Sanus Farmacêutica Ltda. (Brasil)
PI 0403882-7 A2	24/08/2004	Processo de Obtenção de Protease Ativadora de Protrombina Recombinante ( <i>Lopap</i> ) na Forma Monomérica; Protease Ativadora de Protrombina Recombinante ( <i>Lopap</i> ), Sequência de Aminoácidos da Proteína Recombinante assim obtida e Uso como Agente Desfibrinogenante e Kit Diagnóstico para Desprotrombinemias	FAPESP (Brasil) e Biolab Sanus Farmacêutica Ltda. (Brasil)
PI 0200269-8 A2	31/01/2002	Processo de Purificação de Proteínas Solúveis das Cerdas da <i>L. obliqua</i> com Atividade Ativadora de Protrombina; Processo para Determinação Parcial da Sequência de Aminoácidos do Ativador de Protrombina; Processo de Determinação da Atividade Ativadora de Protrombina da Fração II, Sequência N-Terminal e Sequência de Fragmentos Internos da Fração Ativadora de Protrombina, Ativador de Protrombina e Uso do Ativador de Protrombina	FAPESP (Brasil) e Biolab Sanus Farmacêutica Ltda. (Brasil)
PI 0504199-6 A2	08/09/2005	Composições Farmacêuticas Baseadas em <i>Lopap</i> e Usos das Ditas Composições	FAPESP (Brasil) e Biolab Sanus Farmacêutica Ltda. (Brasil)

Adaptado de Chudzinski-Tavassi *et al.* (2013). *WIPO: World Intellectual Property Organization*. INPI: Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

Dentre as variadas propriedades atribuídas ao veneno de lagartas de *L. obliqua*, uma delas foi de particular interesse no presente trabalho. Trata-se do potencial aumento da sobrevivência e da proliferação celular, os quais são relacionados às proteínas presentes na hemolinfa e cerdas da forma larval. Desta forma, é conferida a proteção das células frente à indução de morte celular por mecanismos apoptóticos (SOUZA *et al.*, 2005). Trabalhos recentes confirmam a propriedade da hemolinfa de alguns insetos de fornecer proteção celular contra injúrias responsáveis por ativar mecanismos apoptóticos (VIEIRA *et al.*, 2010; RHEE *et al.*, 2013; HEINEN *et al.*, 2014).

#### **2.4 *Lonomia obliqua* Walker, 1855**

No Brasil, a espécie *Lonomia obliqua* tem maior ocorrência nas regiões situadas entre as coordenadas 26° 35' 50'' sul e 53° 31' 50'' oeste (São Miguel do Oeste, no Extremo Oeste de Santa Catarina) e 28° 15' 39'' sul e 52° 24' 32'' oeste (Passo Fundo, no Norte do Rio Grande do Sul) (MORAES, 2002). No entanto, também tem sido relatada nos estados de São Paulo, Espírito Santo, Amazonas, Pará, Amapá, Bahia (DUARTE *et al.*, 1994) e Paraná (DUARTE *et al.*, 1994; GARCIA & DANNI-OLIVEIRA, 2007).

A descaracterização da cobertura vegetal nos locais de ocorrência de *Lonomia*, aliados à diminuição dos inimigos naturais da espécie, principalmente pela ampla utilização de agrotóxicos, podem estar implicados em aumento da população destes lepidópteros (KELEN *et al.*, 1995; MORAES, 2002).

Lagartas de *L. obliqua* manifestam hábito gregário, permanecendo agrupadas com a cabeça voltada ao sentido externo do agrupamento, sobre os vegetais hospedeiros. Este comportamento é observado desde a eclosão até a fase de pré-pupa. Durante o dia, as larvas

normalmente repousam sobre o tronco das árvores e à noite, dirigem-se até as extremidades dos galhos para alimentarem-se (LORINI, 1999).

Embora considerada uma espécie polífitófaga na fase larval, de maneira geral, foi observado que as lagartas de *L. obliqua* mantêm a mesma espécie hospedeira durante seu desenvolvimento (SPECHT *et al.*, 2008).

As espécies vegetais demonstradas na **Tabela 2** foram referidas como hospedeiras de *L. obliqua*.

**Tabela 2.** Plantas hospedeiras de *L. obliqua*.

Nome científico	Nome comum	Referência
<i>Cedrella fissilis</i>	Cedro	Duarte <i>et al.</i> , 1990
<i>Erythrina crista-galli</i>	Eritrina	Biezanko & Seta, 1939
<i>Ficus carica</i>	Figueira	Lorini, 1993
<i>Ficus elástica</i>	Seringueira	Lorini, 1999
<i>Ficus subtiplinervia</i>	Figueira-do-mato	Duarte <i>et al.</i> , 1990
<i>Persea gratíssima</i>	Abacateiro	Lorini, 1993
<i>Platanus acerifolia</i>	Plátano	Lorini, 1999
<i>Pyrus communis</i>	Pereira	Lorini, 1999
<i>Prunus domestica</i>	Ameixeira	Lorini, 1999
<i>Prunus pérsica</i>	Pessegueiro	Lorini, 1993
<i>Psidium guayava</i>	Goiabeira	Lorini, 1999
<i>Rollinia emarginata</i>	Araticum	Duarte <i>et al.</i> , 1990
<i>Tabebuia pulcherrima</i>	Ipê	Duarte <i>et al.</i> , 1990

Adaptado de Lorini (1999).

Apesar da variedade de espécies vegetais em que foram encontradas, um estudo envolvendo a coleta de 518 colônias no período entre 2001 e 2004, evidenciou a predominância das larvas em plátanos (*Platanus acerifolia*) em 71% dos casos, seguida por pereira (*Pyrus communis*) em 14%, ameixeira (*Prunus domestica*) em 2% e 14% em outras espécies vegetais (LORINI, 2005).

Os inimigos naturais de *L. obliqua* são representados principalmente por parasitoides que alimentam-se das estruturas internas da larva e impedem o prosseguimento do ciclo biológico. Também são representantes vírus, fungos e parasitas, além de predadores, os quais possuem fundamental importância como agentes biológicos atuando no equilíbrio populacional da espécie em seu habitat natural (MORAES, 2002; LORINI, 2005).

Na **Tabela 3** são apresentados os inimigos naturais descritos para as formas larvais e pupas de *L. obliqua*.

**Tabela 3.** Inimigos naturais de lagartas e pupas de *L. obliqua*.

Nome científico	Característica	Referência
<i>Enicospilus</i> sp. Stephens, 1835 (Hymenoptera: Ichneumonidae)	Parasitoide	LORINI, 1999; 2005; MORAES, 2002
<i>Moreiria wiedemanni</i> (Diptera: Tachinidae)	Parasitoide	MORAES, 2002; LORINI, 2005
<i>Lespesia affinis</i> Townsend, 1927 (Diptera: Tachinidae)	Parasitoide	MORAES, 2002; LORINI, 2005
<i>Belvosia viedemanni</i> Aldrich, 1928 (Diptera: Tachinidae)	Parasitoide	LORINI, 1999; MORAES, 2002
<i>Leschenaultia</i> sp. (Diptera: Tachinidae)	Parasitoide	LORINI, 1999; 2005
<i>Lonomia obliqua</i> Múltiplo Polyhedrovirus (LoobMNPV)	Vírus	WOLFF <i>et al.</i> , 2002; MORAES, 2002
<i>Hexameris</i> sp. (Nematoda: Mermithidae)	Parasita	MORAES, 2002
<i>Alcaeorrhynchus grandis</i> (Hemiptera: Pentatomidae)	Predador	MORAES, 2002
<i>Isaria javanica</i> (Frieder & Bally) Samson & Hywell-Jones (Fungi: Sordariomycetes)	Fungo	SPECHT <i>et al.</i> , 2009
<i>Patelloa</i> sp. (Diptera: Tachinidae)	Parasitoide	LORINI, 2005
<i>Chetogena</i> sp. (Diptera: Tachinidae)	Parasitoide	LORINI, 2005
<i>Enicospilus mexicanus</i> (Hymenoptera: Ichneumonidae)	Parasitoide	LORINI, 2005
<i>Winthemia</i> sp. (Diptera: Tachinidae)	Parasitoide	LORINI, 2005

#### 2.4.1 Morfologia

Quatro etapas de desenvolvimento são verificadas no gênero, sendo elas classificadas como ovo, larva (lagarta), pupa e adulto. Os ovos têm coloração verde-clara uniforme, forma elipsoide, sendo o polo superior ligeiramente mais achatado quando comparado ao inferior. A adesão ao substrato se dá pelo polo inferior, por meio de substância adesiva que seca e endurece em contato com o ar. Durante um período médio de 17 dias a partir da oviposição, os ovos são incubados, geralmente sobre folhas, até a eclosão das larvas (LORINI, 1999).

As larvas desenvolvem-se em seis estágios (instares), sendo o último (**Figura 2**) de maior importância médica, pois frequentemente está envolvido em acidentes com humanos. As lagartas são caracterizadas por apresentarem corpo castanho-claro-esverdeado com uma linha longitudinal contínua marrom-escura marginada em preto na região dorsal, por toda a extensão do corpo, sendo seus segmentos recobertos por conjuntos de cerdas denominados



escolos. Os escolos do corpo são verde-claros com extremidades pretas (LORINI, 1999; LORINI & CORSEUIL, 2001).



**Figura 2.** Lagarta de 6º instar de *Lonomia obliqua*.

Ao final da fase larval, as lagartas manifestam redução dos movimentos, facilidade na dispersão em relação ao agrupamento, escurecimento e contração do corpo e encerram a fase alimentar, o que caracteriza o período de pré-pupa. A partir daí, dirigem-se ao solo, sob restos vegetais, onde passam ao estágio de pupa, assim permanecendo até alcançar a fase adulta (LORINI, 1999). As pupas ou crisálidas por sua vez, apresentam-se foscas, esclerotinizadas, castanho-avermelhadas, e fornecem características que permitem distinguir o sexo dos insetos que abrigam (LORINI & CORSEUIL, 2001).

Já as formas adultas, que são representadas pelas mariposas ou imagos, são caracterizadas por acentuado dimorfismo sexual, onde o macho é menor e de cor predominante amarelo-forte, enquanto a fêmea é mais robusta, com prevalência da cor castanho-acinzentada. Neste estágio, o inseto alcança tempo de vida de no máximo duas semanas (LORINI, 1999; LORINI & CORSEUIL, 2001) e em função de apresentarem as peças bucais atrofiadas, não se alimentam (LEMAIRE, 2002).

As lagartas não atacam potenciais inimigos, mas as cerdas que revestem seu corpo são providas de conteúdo tóxico. A inoculação do veneno ocorre, quando as vítimas entram em

contato com as cerdas do inseto, promovendo a ruptura do ápice destas e a liberação de seu conteúdo na pele do acidentado. A ruptura das cerdas é favorecida pela composição mais pobre em quitina de suas extremidades, que determina sua maior fragilidade (VEIGA *et al.*, 2001).

A produção da secreção venenosa é atribuída a um epitélio secretor especializado, caracterizado pela presença de núcleos volumosos e numerosos grânulos no citoplasma, já que não foram localizadas estruturas glandulares produtoras de veneno na base das cerdas. Esta secreção é armazenada na região subcuticular e no canal interno das cerdas, que são revestidas como uma evaginação do tegumento (VEIGA *et al.*, 2001).

#### *2.4.2 Manifestações clínicas e laboratoriais nos acidentes com lagartas do gênero *Lonomia**

Indivíduos que acidentalmente entraram em contato com lagartas de *Lonomia achelous* referiram dor e sensação de queimação intensas no local do contato logo após o mesmo, seguidas de desconforto generalizado e cefaleia occipital. Dentro de um período variável após o início dos sintomas (entre 8 e 72 horas), tem sido relatado o surgimento de região de equimose extensa na área afetada e sangramentos profusos de outros locais como nariz, ouvidos, intestino, vagina e pele (AROCHA-PIÑANGO & LAYRISSE, 1969). Em comum, estes pacientes apresentaram uma baixa concentração de fibrinogênio, plasminogênio, Fator V e VIII, com aumento de Fator VIII:C, Von Willebrand e de produtos de degradação de fibrinogênio, além de tempo curto de lise de euglobulina. Os demais fatores e inibidores da coagulação se mantiveram dentro dos níveis de normalidade, o que ocorre também com a contagem de plaquetas, sugerindo uma intensa atividade fibrinolítica (AROCHA-PIÑANGO & LAYRISSE, 1969; AROCHA-PIÑANGO & MARVAL, 1992).

Já no envenenamento por lagartas de *L. obliqua*, os sinais e sintomas referidos após o contato consistiram de dor e sensação de queimação, eritema e edema no local de contato, mal-estar geral, vômitos, dispneia, equimoses, hemorragia de mucosas e de cicatrizes recentes, epistaxe, melena, hematúria, anúria, hipotensão, cefaleia, artralgia, mialgia, dor lombar, fraqueza e febre (DUARTE *et al.*, 1990; DUARTE *et al.*, 1994; KELEN *et al.*, 1995; BURDMANN *et al.*, 1996; FAN *et al.*, 1998; MALAQUE *et al.*, 2006; RIELLA *et al.*, 2008). Dentre os achados mais comuns que permeiam a evolução do quadro, pode-se citar a síndrome hemorrágica característica, que é desencadeada por coagulopatia de consumo e que pode evoluir com queda dos níveis pressóricos sanguíneos, surgimento de edema e eritema e hemólise intravascular.

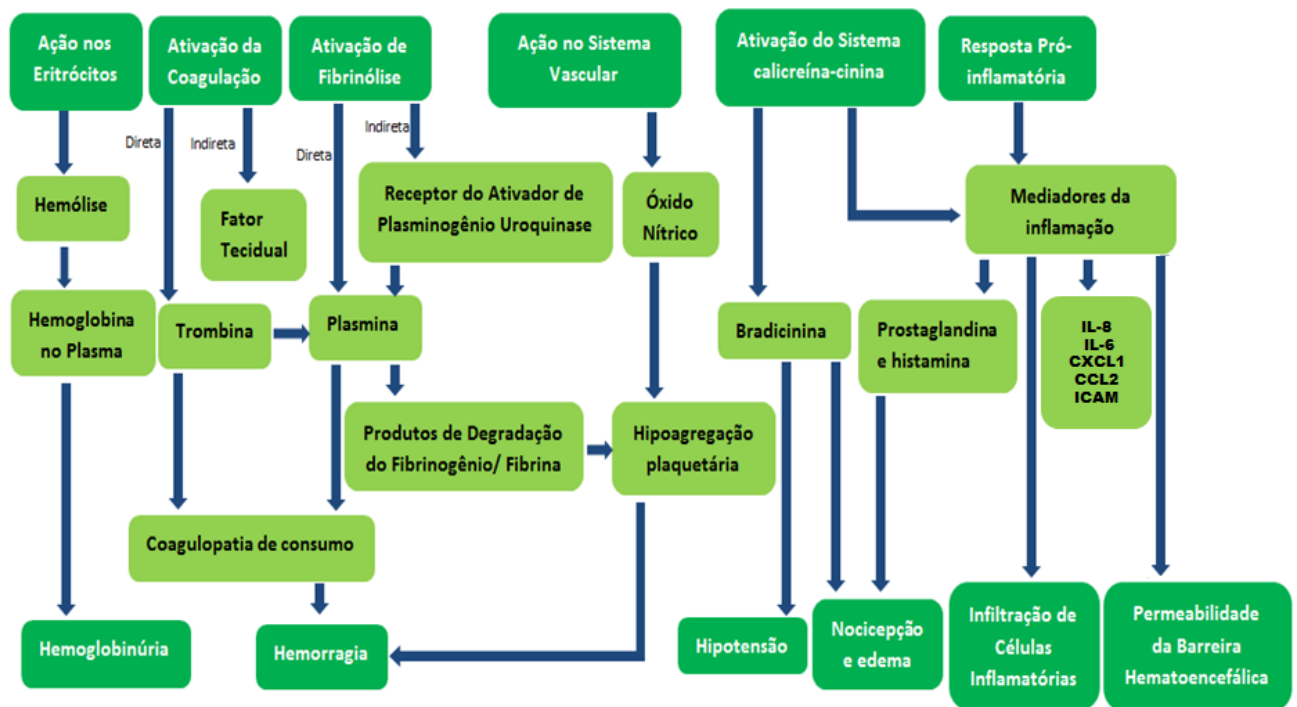
O envenenamento pode também prosseguir com o desenvolvimento de insuficiência renal aguda (IRA) e de hemorragias pulmonar e intracerebral, que estão associadas ao agravamento do quadro e a um maior risco (DUARTE *et al.*, 1990; DUARTE *et al.*, 1994; KELEN *et al.*, 1995; DUARTE *et al.*, 1996; KOWACS *et al.*, 2006). O óbito foi ainda registrado como desfecho de envenenamentos pelo contato com lagartas de *L. obliqua* (DUARTE *et al.*, 1994; KELEN *et al.*, 1995; DUARTE *et al.*, 1996; KOWACS *et al.*, 2006).

Não há um consenso sobre os determinantes da IRA nestes casos, que não ocorre em todos os pacientes, mas várias hipóteses foram apontadas em diferentes estudos. Burdmann *et al.* (1996) especulam que alterações discretas constatadas por biópsia renal podem estar associadas às lesões isquêmicas possivelmente produzidas pela deposição maciça de fibrina nos glomérulos, que seria decorrente da síndrome hemorrágica similar a coagulação intravascular disseminada. Para Fan *et al.* (1998), o choque hemorrágico poderia produzir necrose tubular aguda, com desenvolvimento de IRA. O desenvolvimento de IRA após o envenenamento por *L. obliqua* está relacionado a uma maior mortalidade (50% - 3 em 6 pacientes, sendo 2 deles por hemorragia cerebral e 1 por hemorragia pulmonar maciça)

quando comparado aos pacientes que mantiveram a função renal preservada (4% - 1 em 27 pacientes) (DUARTE *et al.*, 1994).

Em doses baixas e não hemorrágicas, o veneno de *L. obliqua* desenvolve também um efeito pró-inflamatório direto em células endoteliais, promovendo a reorganização do citoesqueleto, aumentando a adesão focal e a expressão de moléculas cruciais para o início de uma resposta inflamatória vascular (NASCIMENTO-SILVA *et al.*, 2012).

Os efeitos biológicos do veneno de *L. obliqua* estão apresentados resumidamente no esquema da **Figura 3**.



**Figura 3.** Representação esquemática dos efeitos biológicos do veneno de *L. obliqua*. Adaptado de Pinto *et al.* (2010). IL-8: Interleucina-8; IL-6: Interleucina-6; ICAM: molécula de adesão intracelular.

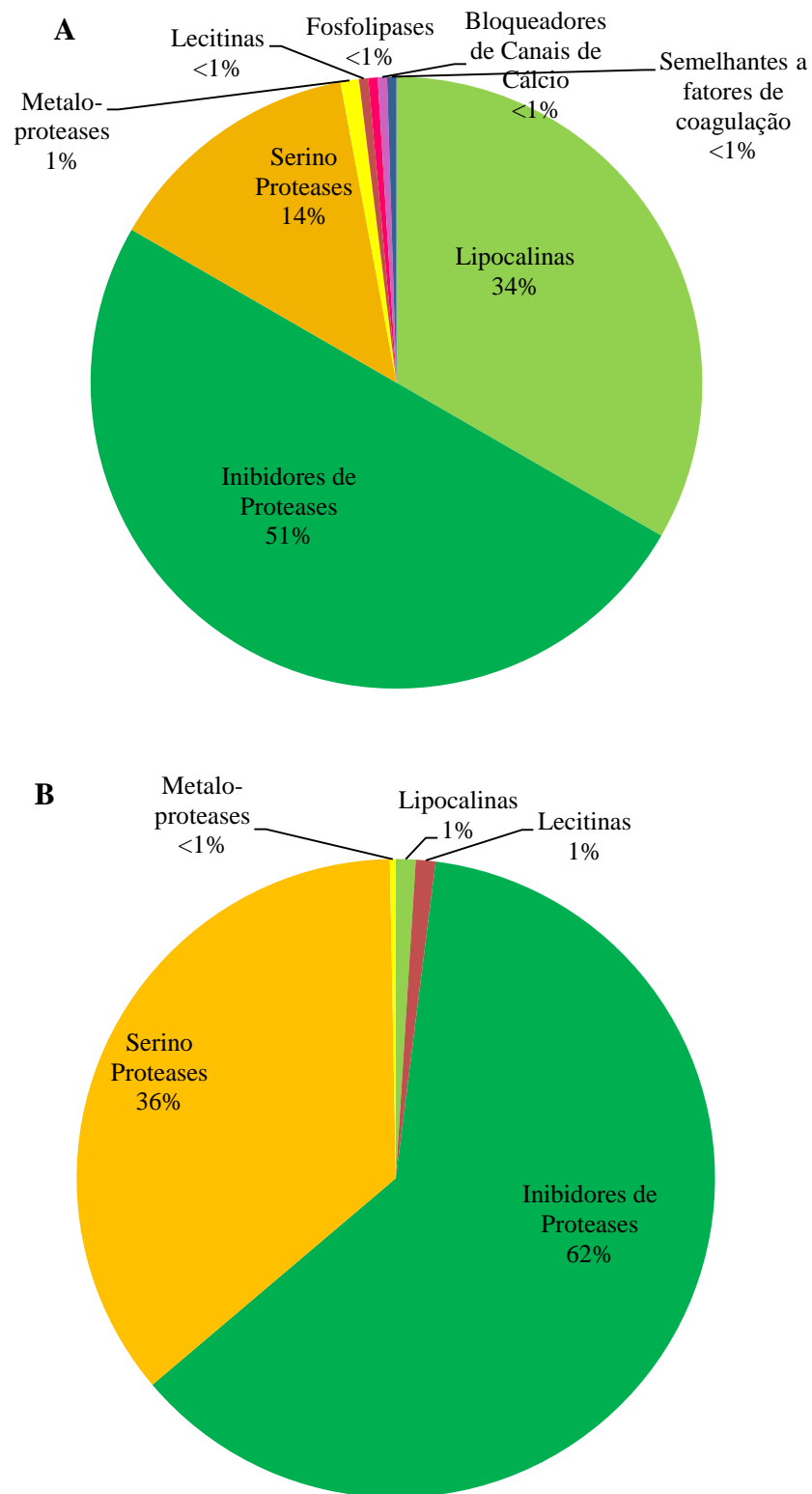
### 2.4.3 Composição do veneno

Diversos estudos têm sido conduzidos no intuito de identificar os principais componentes do veneno. A composição química descrita na literatura refere uma predominância proteica, como observado em outros venenos e peçonhas animais.

O extrato bruto de cerdas das lagartas de *L. obliqua* apresenta composição proteica caracterizada por 51% de inibidores de proteases, 34% lipocalinas e 14% serino proteases. A presença de metaloproteases, lecitinas e fosfolipases, também foi identificada em caráter minoritário (TERRA *et al.*, 2010). Por outro lado, a hemolinfa apresenta 62% de inibidores de proteases e 36% de serino proteases, além de metaloproteases e lecitinas em menor quantidade, da mesma forma que no extrato de cerdas (TERRA *et al.*, 2010).

Contraditoriamente, metaloproteases não foram identificadas em estudo anterior de transcriptômica (VEIGA *et al.*, 2005), ao passo que sua presença pôde ser evidenciada em estudo de proteômica posterior (TERRA, 2010). Este fato pode ser atribuído às amostras diferentes que foram utilizadas nos dois estudos, sendo que no primeiro, foi avaliada a secreção expelida pelo tegumento e no segundo, o extrato de cerdas e a hemolinfa. Diante deste achado, pode ser cogitada a hipótese de que as referidas proteínas poderiam encontrar-se no interior dos hemócitos, que não teriam participação no conteúdo da amostra utilizada no estudo transcriptômico.

A distribuição dos grupos de proteínas de hemolinfa e extrato de cerdas de *L. obliqua* descrita por TERRA *et al.* (2010) é demonstrada no gráfico da **Figura 4** e as características e atividades que foram atribuídas a elas são apresentadas na **Tabela 4**.



**Figura 4.** Distribuição de proteínas em A: extrato de cerdas e B: hemolinfa de lagartas de *L. obliqua* (Adaptado de TERRA *et al.*, 2010).

**Tabela 4.** Proteínas e suas respectivas atividades descritas para hemolinfa e extrato de cerdas de lagartas de *L. obliqua*.

Toxina	Nome	Amostra	Atividade	MM <sup>**</sup> (Da)	Método de Identificação	Gen Bank	Referência
Ativador de Protrombina Ca <sup>2+</sup> -dependente	<i>Lopap</i> ( <i>Lonomia obliqua</i> Protrhombin Activator Protease) Serino protease (Lipocalinas)	Extrato de cerdas	Pró-coagulante (plasma humano) Induz produção de NO, PGI2 e IL-8 pelas células endoteliais	69.000	Isolamento	AY908986	Donato <i>et al.</i> , 1998; Reis <i>et al.</i> , 2001a; Fritzen <i>et al.</i> , 2005; Reis <i>et al.</i> , 2006
Ativador de Fator X, Ca <sup>2+</sup> -independente	<i>Losac</i> ( <i>Lonomia obliqua</i> Stuart-Factor Activator) Loqua-PPOAF	Extrato de cerdas	Pró-coagulante (plasma humano) Induz a produção de NO e aumenta a proliferação celular	45.000	Isolamento	ND	Alvarez-Flores <i>et al.</i> , 2006; Veiga <i>et al.</i> , 2005
Fibrinogenase (enzima fibrin(ogen)olítica)	Lonofibrase LOqua-SP6	Hemolinfa	Anticoagulante (plasma humano)	35.000	Isolamento	ND	Pinto <i>et al.</i> , 2004; Veiga <i>et al.</i> , 2005
Proteína com atividade de Fator Xa*	ND	Extrato de cerdas	Fator Xa	20.745,7	Isolamento	ND	Lilla <i>et al.</i> , 2005
Hialuronidases	Lonogliases	Extrato de cerdas	Hidrolítica sobre a matriz extracelular	53.000 49.000	Isolamento	ND	Gouveia <i>et al.</i> , 2005
Fosfolipases A2	LOqua-PLA	Extrato de cerdas	Hemolítica indireta	15.000 9.600	Isolamento Transcriptoma	ND/ AY829845	Seibert <i>et al.</i> , 2006; Veiga <i>et al.</i> , 2005
Serino Proteases	LOqua- PPOAF1	Cerdas	Fator ativador de PPO	Desconhecida	Transcriptoma	AY829844	Veiga <i>et al.</i> , 2005
	LOqua-SP1	Tegumento	Serino Protease	55.200	Transcriptoma	AY829818	
	LOqua-SP2	Tegumento	Serino Protease	Desconhecida	Transcriptoma	AY829819	
	LOqua-SP3	Tegumento	Tipo quimotripsina	Desconhecida	Transcriptoma	AY829820	
	LOqua-SP4	Tegumento	Fator ativador de PPO	Desconhecida	Transcriptoma	AY829821	
	LOqua-SP5	Cerdas	Fator ativador de PPO	Desconhecida	Transcriptoma	AY829842	
	LOqua-SP6	Cerdas	Ativador de Plasminogênio	30.100	Transcriptoma	AY829843	
Lectinas	LOqua-SP7	Cerdas	Ativador de Plasminogênio	Desconhecida	Transcriptoma	AY829841	Veiga <i>et al.</i> , 2005
	LOqua-Lect1	Tegumento	Imunolectina	33.300	Transcriptoma	AY829822	
	LOqua-Lect3	Cerdas	Lectina	33.900	Transcriptoma	AY829836	
	LOqua-Lect4	Cerdas	Lectina do tipo C	Desconhecida	Transcriptoma	AY829849	

Lipocalinas	LOqua-Lect5	Cerdas	Lectina	16.300	Transcriptoma	AY829846	
	LOqua-Lipc11	Cerdas	Lipocalina	20.600	Transcriptoma	AY829833	Veiga <i>et al.</i> , 2005
	LOqua-Lipc13	Cerdas	Lipocalina	13.500	Transcriptoma	AY829856	
Serpinas	LOqua-Lipc14	Tegumento	Lipocalina	Desconhecida	Transcriptoma	AY829809	
	LOqua-Serp1	Tegumento	Serpina	50.200	Transcriptoma	AY829814	Veiga <i>et al.</i> , 2005
	LOqua-Serp2	Tegumento	Serpina	41.600	Transcriptoma	AY829815	
	LOqua-Serp3	Tegumento	Serpina	Desconhecida	Transcriptoma	AY829816	
	LOqua-Serp4	Tegumento	Serpina	Desconhecida	Transcriptoma	AY829817	
	LOqua-Serp6	Tegumento	Serpina	Desconhecida	Transcriptoma	AY829847	
Outros inibidores de proteases	LOqua-PI1	Tegumento	Inibidor de protease	14.600	Transcriptoma	AY829810	Veiga <i>et al.</i> , 2005
	LOqua-PI3	Tegumento	Tipo Inibidor de tripsina	41.800	Transcriptoma	AY829811	
	LOqua-PI4	Tegumento	Tipo Inibidor de tripsina	8.600	Transcriptoma	AY829812	
	LOqua-PI5	Tegumento	Tipo Inibidor de tripsina	7.300	Transcriptoma	AY829813	
	LOqua-PI6	Cerdas	Tipo Inibidor de tripsina	7.200	Transcriptoma	AY829839	
	LOqua-PI7	Cerdas	Inibidor de protease tipo Kazal	8.000	Transcriptoma	AY829835	
	LOqua-PI9	Cerdas	Inibidor de proteinase	4.100	Transcriptoma	AY829837	
Cisteíno proteinases	LOqua-CysPep1	Tegumento	Tipo catepsina	Desconhecida	Transcriptoma	AY829805	Veiga <i>et al.</i> , 2005
	LOqua-CysPep1	Cerdas	Tipo catepsina	35.000	Transcriptoma	AY829838	
Proteínas de defesa	LOqua-Cyst	Tegumento	Cistatina	11.000	Transcriptoma	AY829806	
	LOqua-Def2	Tegumento	Atacina	Desconhecida	Transcriptoma	AY829737	Veiga <i>et al.</i> , 2005
	LOqua-Def3	Cerdas	Precursor de atacina	23.000	Transcriptoma	AY829840	
	LOqua-Def4	Cerdas	Cecropina	4.300	Transcriptoma	AY829848	
	LOqua-Def6	Cerdas	Toxina antimicrobiana	5.800	Transcriptoma	AY829857	
	LOqua-Ease1	Tegumento	Esterase	Desconhecida	Transcriptoma	AY829807	
Inibidor de serino protease	LOSPI	Hemolinfa	Inibidor de enzimas do tipo serino proteases	21.000 Da	Isolamento	ND	Gouveia, 2004
Proteína Antiapoptótica	ND	Hemolinfa	Inibe apoptose de células de inseto ( <i>Sf-9</i> ) em cultura, células de mamífero da linhagem <i>Vero</i> , células da linhagem V-79 e células humanas HEK-293	51.000 Da	Isolamento	ND	Souza <i>et al.</i> , 2005; Greco, 2009; Martins, 2011; Heinen <i>et al.</i> , 2013; Mendonça <i>et al.</i> , 2007
Proteína Antiviral	<i>AVLO (Antiviral protein of Lonomia obliqua)</i>	Hemolinfa	Inibe a replicação de vírus do sarampo, pólio e influenza em cultura de células	20.000	Isolamento	JN807330	Greco <i>et al.</i> , 2009; Carmo <i>et al.</i> , 2014

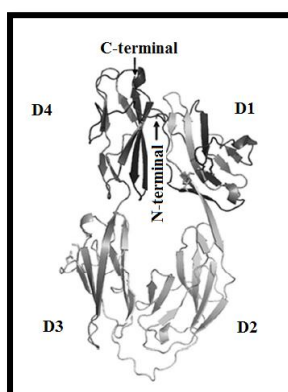
\*Segundo Reis *et al.* (2006), a sequência identificada pelos autores corresponde à Lopap; \*\*Massa molecular predita/observada; ND: Não disponível; NI: Não Identificada; Adaptado de Pinto *et al.*, 2010 e Veiga *et al.*, 2005.



### 2.4.3.1 Hemolinas

Hemolinas são proteínas do tipo imunoglobulinas induzidas por bactérias, expressas exclusivamente por lepidópteros e envolvidas em vários tipos de interações celulares, com papel na defesa celular e humoral e no desenvolvimento do inseto. Promovem efeitos do tipo opsonina, como um aumento da adesão celular e fagocitose. Ainda, são responsáveis por aglutinar células bacterianas, ligam-se a hemócitos impedindo sua agregação e regulam o desenvolvimento embrionário (ALVAREZ-FLORES *et al.*, 2011).

Dentre as proteínas isoladas de extratos de cerdas de *Lonomia obliqua*, está a proteína *Losac* (*Lonomia obliqua* Stuart-factor Activator) que é classificada como hemolina e consiste de um ativador de fator X que não necessita de íons cálcio para sua ativação (ALVAREZ-FLORES *et al.*, 2011). Alvarez-Flores *et al.* (2006) demonstraram que esta proteína é capaz de desencadear a liberação de óxido nítrico (NO), mas não de prostaciclina (PGI<sub>2</sub>). *Losac* foi a primeira hemolina descrita apresentando atividade enzimática proteolítica (ALVAREZ-FLORES *et al.*, 2011). O modelo estrutural predito da *Losac* é apresentado na **Figura 5**.

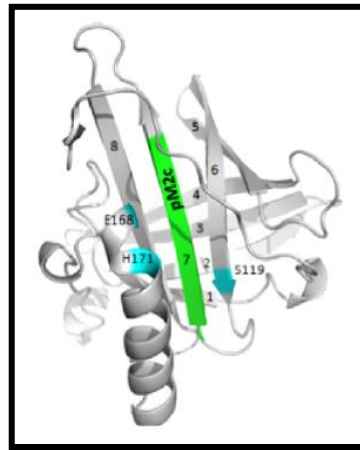


**Figura 5.** Modelo predito de *Losac*. C-terminal: carboxi-terminal; N-terminal: amino-terminal; D1-4: domínios 1-4 (Adaptado de ALVAREZ-FLORES *et al.*, 2011).

#### 2.4.3.2 Lipocalinas

As lipocalinas caracterizam-se de maneira geral como proteínas extracelulares que se ligam a pequenas moléculas hidrofóbicas e formam complexos covalentes e não covalentes com outras macromoléculas solúveis, sendo classificadas principalmente como proteínas de transporte, apesar de desempenharem uma ampla variedade de funções (FLOWER *et al.*, 2000). As referidas proteínas constituem o grupo mais abundante presente nas cerdas e na hemolinfa da lagarta de *L. obliqua* (VEIGA *et al.*, 2005; CHUDZINSKI-TAVASSI & CARRIJO-CARVALHO, 2006; RICCI-SILVA *et al.*, 2008).

Donato *et al.* (1998) referiram a propriedade do extrato de cerdas da lagarta de ativar protrombina na dependência de íons cálcio. Posteriormente, dentro do grupo das lipocalinas, foi isolada uma proteína a partir do extrato de cerdas, a qual foi denominada *Lopap* (*Lonomia obliqua Prothrombin Activator Protease*). Esta proteína consiste de um tetrâmero caracterizado por massa molecular de 69 kDa em sua forma nativa e que apresenta atividade do tipo serino protease, ativada por íons cálcio (REIS *et al.*, 2001a). Em sua forma recombinante (*rLopap*) é expressa como uma proteína ativa de 21 kDa, que apresenta menor atividade em relação à protrombina do que a proteína nativa, o que pode estar associado à diversidade de dobramentos observada entre as duas formas (REIS *et al.*, 2006). A *Lopap* não demonstrou similaridade na sequência parcial de aminoácidos da proteína purificada com nenhum outro ativador de protrombina conhecido (REIS *et al.*, 2001a). Apesar desta ausência de similaridade com outros ativadores de protrombina ou serino proteases conhecidos, esta proteína apresenta domínios conservados na sequência primária, característicos de lipocalinas, e a estrutura secundária e terciária possuem padrão similar às proteínas desta família (REIS *et al.*, 2006). O modelo estrutural predito de *Lopap* é apresentado na **Figura 6**.



**Figura 6.** Modelo estrutural predito de *Lopap* (CHUDZINSKI-TAVASSI *et al.*, 2010).

A *Lopap* foi classificada como um ativador de protrombina do tipo 4, mas consiste uma exceção dentro deste grupo, pois ao contrário dos outros membros desta classe, é capaz de produzir trombina ativa (REIS *et al.*, 2001a). Foi demonstrado que esta proteína apresenta atividade pró-coagulante em ratos (REIS *et al.*, 1999, 2001a) e a mesma na forma purificada é capaz de ativar a protrombina de forma dose dependente, sendo que os íons cálcio aumentam esta atividade (REIS *et al.*, 2001a).

De acordo com os resultados obtidos por Ricci-Silva *et al.* (2008) em estudos proteômicos e imunoquímicos com o extrato de cerdas de *L. obliqua*, os autores sugerem que *Lopap* está presente como múltiplas isoformas ou que ela compartilha epítomos com outros componentes do extrato.

Recentemente foi relatado que as lipocalinas presentes em *L. obliqua* podem atuar modulando fibroblastos e matriz extracelular, o que pode ter relação com sua ação em morfogênese e homeostasia tecidual (CARRIJO-CARVALHO *et al.*, 2012).

Atividade citoprotetora foi associada à *Lopap*, sendo que esta atividade é restrita a uma sequência curta de aminoácidos. O tratamento de neutrófilos e células endoteliais de ratos com este peptídeo, na presença de inibidor de NO sintase L-NAME (N $\omega$ -nitro-L-arginina

metil éster) promoveu aumento dos níveis de *NO* liberados e sobrevivência celular. O efeito de tal peptídeo foi caracterizado como atividade antiapoptótica, já que o tratamento com este evitou a apoptose (CHUDZINSKI-TAVASSI *et al.*, 2010). Em outro estudo, a produção de *NO* também foi associada aos efeitos antiapoptóticos verificados em células endoteliais e neutrófilos, na exposição à *Lopap* recombinante (*rLopap*) (WAISMAM *et al.*, 2009).

A incubação de células endoteliais de veias humanas (HUVECs – *Human Vein Endothelial Cells*) com *Lopap* purificada levou a alta expressão de moléculas de adesão intracelulares 1 (*ICAM-1 – Intracellular Adhesion Molecule-1*) e E-selectina (CHUDZINSKI-TAVASSI *et al.*, 2001).

Em estudo desenvolvido por Fritzen *et al.* (2005), *Lopap* aumentou significativamente a geração de *NO*, desencadeou a liberação de prostaciclina-1 (*PGI2*) e de Interleucina-8 (*IL-8*), porém não foi capaz de modular a expressão de mediadores envolvidos na coagulação e sistema de fibrinólise como a incapacidade de induzir a liberação de fator de von Willebrand ou sua síntese por células endoteliais e modular *TF* (Fator Tecidual – *Tissue Factor*) e *t-PA* (Ativador de Plasminogênio Tecidual – *Tissue Plasminogen Activator*). Os autores relacionaram ainda a ação da proteína promovendo sobrevivência celular pela regulação da expressão de *NO*. Durante o envenenamento experimental de ratos, também foi observado aumento dos níveis de *NO* (BERGER *et al.*, 2010b).

A *rLopap* (*Lopap* recombinante) não induziu interação de leucócitos no endotélio em ratos *in vivo*, nem secreção de citocinas pró-inflamatórias por neutrófilos e células endoteliais, não demonstrando propriedades inflamatórias *in vivo* e *in vitro* (WAISMAM *et al.*, 2009).

Nas lagartas, as lipocalinas podem ser responsáveis pela sobrevivência celular durante o fenômeno de metamorfose pelo qual passam estes animais no decorrer do ciclo biológico (CHUDZINSKI-TAVASSI *et al.*, 2010). *Lopap* está presente em todas as fases de

desenvolvimento, de ovo à larva, podendo estar relacionada à proteção das células envolvidas nas etapas de transformação presentes neste fenômeno (FRITZEN *et al.*, 2005).

#### 2.4.3.3 Fosfolipases A2

Fosfolipases são uma família de proteínas com atividade enzimática que promovem a hidrólise das ligações éster de fosfolípidos, liberando produtos bioativos que podem atuar como mensageiros químicos celulares. Podem ser encontradas em procariotos e eucariotos e são divididas em esterases alifáticas (fosfolipases A1 - *PLA1*, fosfolipases A2 - *PLA2* e fosfolipases B - *PLB*) e fosfodiesterases (fosfolipases C - *PLC* e fosfolipases D - *PLD*) (ROBERTS, 1996).

Campos & Dias-da-Silva (1996) identificaram ação de Fosfolipase A2 (*PLA2*) no extrato de cerdas de *L. obliqua*. A atividade do extrato bruto é dependente da presença de um substrato fosfolípido (lectina) e de  $\text{Ca}^{2+}$ . A *PLA2* de *L. obliqua* caracteriza-se como uma enzima extracelular, de baixa massa molecular (15 kDa) e dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  para sua atividade. Na hemolinfa, também foi constatada a presença da enzima, sugerindo que a mesma pode ter papel importante na manutenção da homeostasia de *L. obliqua* (SEIBERT *et al.*, 2006). A *PLA2* purificada por Seibert *et al.* (2006) caracterizou-se como ácida, com ponto isoelétrico 5,9, um pH ótimo de 8,0 e estabilidade a temperatura tão baixa quanto 4°C, embora tenha demonstrado instabilidade a altas temperaturas, perdendo gradativamente a atividade enzimática. A mesma apresentou exclusivamente atividade hemolítica indireta.

Berger *et al.* (2010a) demonstraram que o veneno de *L. obliqua* é capaz de produzir agregação plaquetária em humanos por meio de um mecanismo cálcio-dependente envolvendo metabólitos do ácido aracônico. Isto ocorre pela via das ciclooxygenases

ativando PDE3A, o qual provavelmente leva ao consumo do conteúdo intracelular de *cAMP*. Este estudo sugere que o maior componente do veneno responsável por esta atividade seja uma Fosfolipase A2.

#### 2.4.3.4 Hialuronidasas

As hialuronidasas presentes no extrato de cerdas de *L. obliqua* foram identificadas como enzimas do tipo endo- $\beta$ -*N*-acetilhexosaminidase. Estas possuem atividade hidrolítica, que degrada ácido hialurônico contendo resíduos de  $\beta$ -*D*-*N*-acetilglucosamina tanto na forma purificada, como organizada e ligada a componentes da matriz extracelular. Possui adicionalmente a capacidade de degradar sulfato de condroitina purificado que contém unidades de  $\beta$ -*D*-*N*-acetilglucosamina (GOUVEIA, 2004). Estas enzimas foram denominadas Lonoglyases em referência ao gênero da lagarta (Lono) e às suas atividades sobre glicosaminoglicanos (gliases). O pH ótimo de ação foi de 6,0, o que permite pensar que pode agir em pH fisiológico pela sua proximidade ao pH 7,0, podendo desta forma contribuir para as ações do veneno na vítima de acidente com as lagartas (GOUVEIA, 2004).

A presença de um inibidor de proteases na hemolinfa da lagarta com capacidade de inibir fortemente enzimas do tipo serino protease e mais fracamente metaloproteases foi sugerida pelos resultados obtidos por Gouveia (2004).

#### 2.4.3.5 Lonofibrase

O veneno apresenta enzimas fibrin(ogen)olíticas capazes de clivar fibrinogênio e fibrina, denominadas lonofibrases. Estas enzimas tem massa molecular aproximada de 35

kDa, e são capazes de degradar rapidamente cadeias A $\alpha$  e B $\beta$  de fibrinogênio, com marcada predominância de cadeias A $\alpha$ , além de apresentarem a capacidade de clivagem da fibrina por uma via distinta da plasmina. Isto pode auxiliar a justificar os quadros hemorrágicos graves observados nos envenenamentos com *L. obliqua* (PINTO *et al.*, 2004).

#### 2.4.3.6 Serpinas

Serpinas são inibidores de serino proteases que estão envolvidos em vários processos fisiológicos dos artrópodes, como na imunidade e coagulação da hemolinfa (VEIGA *et al.*, 2005). Terra (2010) demonstrou por meio de estudo proteômico que no extrato de cerdas e hemolinfa de lagartas de *L. obliqua* as proteínas predominantemente encontradas são Serpinas.

#### 2.4.3.7 Proteína Antiapoptótica

Souza *et al.* (2005) purificaram uma proteína de aproximadamente 51 kDa da hemolinfa de lagartas de *L. obliqua* que inibiu a apoptose induzida tanto por privação de nutrientes, como por agentes químicos em cultura de células de inseto *Spodoptera frugiperda* (Sf-9). A suplementação dos cultivos celulares com a proteína em questão permitiu o prolongamento da viabilidade dos mesmos.

Manutenção da viabilidade celular por períodos maiores, bem como a indução de altos níveis de crescimento celular também foram verificadas por Maranga *et al.* (2003) em meios

de cultura de células *Sf-9* suplementados com hemolinfa de *L. obliqua*. Um fator potencialmente antiapoptótico, provavelmente seria responsável pela manutenção de altos níveis de viabilidade celular em cultura, enquanto que um fator promotor de crescimento responderia pelo melhor rendimento celular em cultura. Ainda, uma enzima que hidrolisa sucrose, promoveria a produção de significativas quantidades de glicose em meio de cultura (MARANGA *et al.*, 2003).

Cultivos de células de inseto *Sf-9* e humanas HEK-293 sobreviveram à indução de apoptose por infecção por baculovírus e pelos indutores químicos *t*-BHP e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> após a adição de hemolinfa. Além disso, após o tratamento, foi observado que as células mantiveram alto potencial eletroquímico nas membranas das mitocôndrias. Isto poderia estar implicado em um efeito da hemolinfa diretamente sobre a membrana mitocondrial, evitando a liberação de citocromo *c* e desta forma, aumentando o tempo de vida celular (MENDONÇA *et al.*, 2007).

Vieira *et al.* (2010) também evidenciaram que a suplementação do meio de cultura de células *Sf-9* com hemolinfa bruta ou fração purificada protegeu as células da apoptose produzida por estresse oxidativo induzido por *t*-BHP e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e pela infecção por baculovírus. Desta forma, os autores obtiveram aumento da viabilidade celular da cultura e da produtividade de proteínas recombinantes pela suplementação com hemolinfa.

Em estudo desenvolvido por Martins (2011) a hemolinfa também foi capaz de proteger células de inseto da linhagem *Sf-9* e células de mamífero da linhagem Vero da apoptose após a infecção das mesmas por baculovírus, além de bloquear a morte fisiológica normalmente observada por estresse de cultivo. Da mesma forma, Greco (2009) observou o efeito antiapoptótico de uma proteína de 51 kDa obtida da hemolinfa sobre cultivos de células Vero.

Em estudo recente, o veneno bruto demonstrou efeitos proliferativos em cultura de células de linhagem tumoral U138-MG e HT-29, porém reduziu significativamente a



viabilidade de células não tumorais V-79. Por outro lado, a proteína purificada da hemolinfa que apresentou atividade antiapoptótica em células de inseto *Sf-9* (SOUZA *et al.*, 2005) não apresentou efeitos sobre U138-MG e HT-29, mas aumentou a viabilidade de células V-79 (HEINEN *et al.*, 2014).

#### 2.4.3.8 Proteína antiviral

Atividade inibitória sobre a replicação viral de poliovírus e vírus do sarampo em células Vero e para vírus Influenza (H1N1) em células MDCK foi demonstrada para uma proteína de 20 kDa purificada da hemolinfa de *L. obliqua*. Os achados sugerem que ela possa atuar nas etapas do ciclo de replicação do vírus que ocorrem intracelularmente, ou ainda, nas fases tardias da infecção causadas por estes vírus, visto que não apresentou atividade virucida, não sendo capaz de inativá-los antes de atingirem a célula-alvo ou impedir o processo de adsorção (GRECO, 2009; GRECO *et al.*, 2009).

A adição de hemolinfa mostrou melhores resultados quando ocorreu antes da infecção viral, embora quando adicionada posteriormente, também se observou redução da produção viral. Os mecanismos pelos quais a inibição da replicação viral proporcionada pela hemolinfa ocorre são ainda desconhecidos, porém a ativação de mecanismos antivirais não-específicos podem estar implicados. Ainda, visto que a produção de *NO* é afetada pela adição de hemolinfa, este fato pode estar relacionado com a modulação da imunidade inata (GRECO *et al.*, 2009).

Carmo *et al.* (2012) clonaram e expressaram uma proteína recombinante a partir da hemolinfa de lagartas de *L. obliqua* (*rAVLO*), que demonstrou a mesma atividade antiviral observada na proteína nativa da hemolinfa. Os autores verificaram que a replicação do vírus

não envelopado da encefalomiocardite foi inibida por *rAVLO*. A redução da replicação dos vírus da rubéola e herpes em  $1.10^4$  e  $1.10^6$  vezes, respectivamente, pela *rAVLO*, também foi observada em estudo recente (CARMO *et al.*, 2014).

#### 2.4.3.9 Outras

Ricci-Silva *et al.* (2008) identificaram proteínas da cutícula e peptídeos presentes em extrato de cerdas, com base em estudos de proteômica, que não foram relacionados com proteínas conhecidas.

#### 2.4.4 Tratamento do envenenamento

A partir de 1994, pesquisadores do Instituto Butantan (São Paulo, Brasil) iniciaram a produção de um soro hiperimune específico para o tratamento de envenenamento por *L. obliqua* (DIAS-DA-SILVA *et al.*, 1996). O soro produzido, denominado soro antilonômico (SALon) é constituído de uma solução de imunoglobulinas específicas purificadas obtidas a partir da hiperimunização de equinos com extrato de cerdas das lagartas de *L. obliqua*.

#### 2.4.5 Avaliação da hemolinfa e extrato de cerdas de *Lonomia*

##### 2.4.5.1 Amostras

Um estudo foi desenvolvido por Fugiwara (2006) onde foram observadas reduções em algumas atividades biológicas presentes no extrato de cerdas de *L. obliqua* após diferentes

períodos de congelamento a  $-20^{\circ}\text{C}$  em relação a amostras não congeladas. Dentre as atividades avaliadas, houve diminuição significativa na atividade procoagulante e fosfolipásica entre amostras congeladas e não congeladas, entretanto, não foram observadas alterações na atividade hemolítica indireta, e na resposta imunogênica. Uma diminuição significativa na concentração de proteínas entre as amostras submetidas ou não ao congelamento também pode ser observada. A atividade hemolítica indireta do extrato de cerdas está ligada a ação de Fosfolipase A2 (SEIBERT *et al.*, 2006) e a metodologia utilizada para determinação da atividade pode ter influenciado na ausência de diferença significativa na atividade hemolítica indireta apesar da marcada queda observada na atividade fosfolipásica. A diminuição na concentração proteica pode ser devida a degradação das proteínas possivelmente pelas enzimas presentes nas cerdas, ocasionando quebras das ligações peptídicas.

#### *2.4.5.2 Proteômica baseada em Espectrometria de Massas*

Ao conjunto de proteínas expresso por um genoma, é atribuída a denominação de proteoma. Ao contrário do genoma, que é essencialmente estático, o proteoma é altamente dinâmico e muda com o desenvolvimento do organismo e com as mudanças de seu ambiente (WILKINS *et al.*, 1997). Desta forma, o estudo do proteoma dos organismos fornece mais informações sobre os mesmos do que o genoma, mas é característico para um dado organismo em dada situação.

Muitas proteínas que compõe os venenos animais são caracterizadas por um alto conteúdo de cisteína. Em proteínas pequenas, os dobramentos são estabilizados primariamente por ligações dissulfeto. A determinação da razão massa/carga ( $m/z$ ) por meio

de espectrometria de massas (*MS*), além do número de grupos sulfidrila e pontes dissulfeto, representam uma ferramenta aplicável a uma classificação preliminar em um conjunto restrito de famílias de proteínas (CALVETE, 2009).

Dentro deste contexto, as abordagens *bottom-up* e *top-down* são opções para os estudos proteômicos (MATYSIAK *et al.*, 2014; BARACCHI *et al.*, 2013). Na primeira, as proteínas podem ou não ser previamente submetidas à separação em gel de eletroforese. Em seguida, são digeridas por enzimas proteolíticas para produzirem fragmentos peptídicos com perfil de clivagem previsível. Após, os peptídeos podem ser separados por cromatografia, e são analisados por espectrometria de massas *MS/MS*. As proteínas são então identificadas por comparação com bancos de dados. Já na abordagem *top-down*, as proteínas intactas (sem necessidade de digestão e fracionamento prévios) são submetidas à espectrometria de massas. A identificação é então feita por estratégia de “sequência alvo” por meio de busca em banco de dados ou por análise *de novo* da sequência completa de aminoácidos (REID & MCLUCKEY, 2002).

No intuito de concentrar e separar os peptídeos de misturas complexas de proteínas utilizando abordagem *bottom-up*, é possível valer-se de um sistema de cromatografia líquida conectada “*on-line*” em um espectrômetro de massas. Estratégias cromatográficas distintas podem ser empregadas neste sentido, dentre elas a cromatografia de fase reversa e a de troca iônica. Na cromatografia de fase reversa (*RPLC – Reversed phase liquid chromatography*), a resina que compõe a fase estacionária da coluna promove a separação dos compostos com base na sua hidrofobicidade. Além de oferecer alta resolução, eficiência e reprodutibilidade, esta estratégia cromatográfica é vantajosa especialmente quando adotado o sistema *online* com *MS/MS* em que a fonte de ionização é *ESI*, já que os tampões empregados como fase móvel são compatíveis com a mesma (YATES *et al.*, 2009). Já a cromatografia de troca

iônica, baseia-se no equilíbrio de troca entre íons em solução e íons de mesmo sinal na superfície da fase estacionária da coluna cromatográfica (HOLLER *et al.*, 2009).

Ainda, estratégias de cromatografia líquida em duas dimensões (bidimensional), usando o mesmo ou distintos mecanismos de separação podem conferir vantagens na segregação de misturas complexas de proteínas. Neste sentido, podem ser associadas, dentre outras técnicas, as cromatografias de troca iônica e de fase reversa por exemplo. Arranjos incluindo combinações com cromatografia por exclusão de tamanho e de fase normal também podem ser empregados (EGGINK *et al.*, 2008).

A utilização de géis de eletroforese bidimensional, onde as proteínas e peptídeos são previamente separados no gel de acordo com seu ponto isoelétrico e massa molecular também pode ser adotada como estratégia de separação de amostras proteicas complexas. Nesta metodologia, os *spots* adquiridos no gel são extraídos e digeridos, para posteriormente serem injetados em sistemas *LC-MS/MS* (WANG *et al.*, 2010).

Quanto aos espectrômetros de massas, de uma maneira geral, estes possuem uma configuração básica que consiste de uma fonte de íons, um analisador de massas, um detector e um processador de sinais. Os variados equipamentos comerciais disponíveis variam na estratégia empregada para estas características e suas combinações possíveis, resultando basicamente em diferenças no intervalo de massas a ser analisado ( $m/z$ ) e na resolução dos sinais. Desta forma, o conjunto das estratégias adotadas na configuração os define em relação à adequação ao propósito da análise de diferentes amostras.

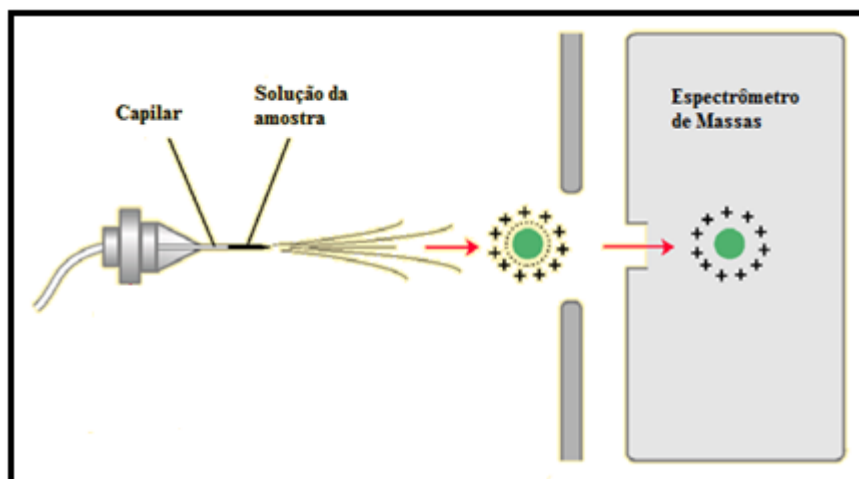
Neste contexto, configurações com filtro de Massas de Quadrupolo, Setor Magnético, Armadilha de Íons (*Ion Trap*), Tempo de Voo (*TOF – Time-of-flight*) e Ressonância Ciclotrônica de Íons com Transformada de Fourier (*FT-MS – Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance*) são as encontradas no mercado atualmente.

Já dentre as possíveis fontes de ionização empregadas em estudos proteômicos estão a de *electrospray* (*ESI – Electrospray Ionization*) e a de ionização e dessorção a laser assistida por matriz (*MALDI – Matrix-assisted Laser Desorption Ionization*).

Pelo sistema *ESI*, uma solução de amostra passa por uma agulha capilar mantida a vários quilovolts em relação ao eletrodo que a circunda, gerando uma nuvem carregada. Esta nuvem passa então por um capilar de dessolvatação, promovendo a evaporação do solvente e a ligação da carga à moléculas do analito (HOLLER *et al.*, 2009). A *ESI* normalmente consiste de uma fonte de baixa energia de ionização desenhada para que íons moleculares e espectros com baixa fragmentação sejam obtidos. Porém, apenas a análise de compostos polares (bases orgânicas de Lewis e ácidos orgânicos de Lewis) facilmente ionizáveis por dissociação ou por formação de *addutos* para a produção de cátions ou ânions é beneficiada por esta estratégia de ionização (VEENSTRA, 1999). Compostos de caráter básico tais como aminas, ésteres e aminoácidos são ionizáveis pela indução de formação de adutos com ácidos de Lewis adicionados ao meio, como ácidos orgânicos fortes de baixa massa e sais inorgânicos de sódio e potássio (CARLTON & SCHUG, 2011).

Na ionização por *MALDI* por sua vez, o analito é disperso de maneira uniforme em uma matriz sólida ou líquida disposta na extremidade de uma sonda ou em uma placa. No instrumento, um feixe de laser é focalizado na amostra promovendo a dessorção e ionização da matriz e do analito (HOLLER *et al.*, 2009).

Embora considerado como uma fonte de ionização, o *electrospray* na realidade consiste de um processo de transferência de íons pré-existentes em solução para a fase gasosa (MORAES & LAGO, 2003). Este processo é ilustrado na **Figura 7**.



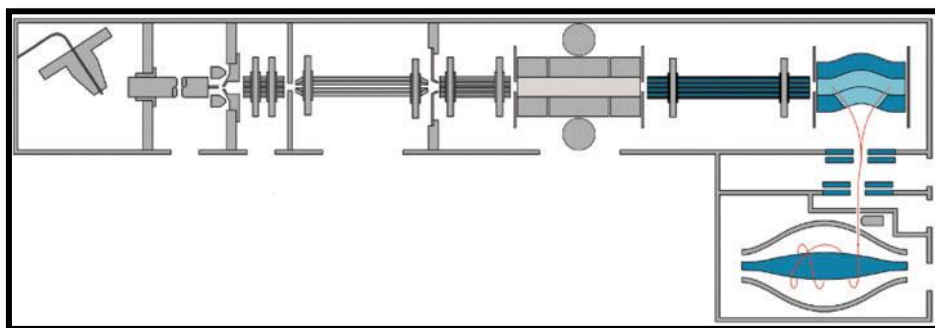
**Figura 7.** Esquema representando a Ionização por *Electrospray* (ESI) em modo positivo.

No processo de ionização, espécies individualmente carregadas são produzidas, o que resulta em espectros de massa simples, com picos de  $m/z$  que se relacionam diretamente com as espécies em solução ou como adutos destas espécies (KEITH-ROACH, 2010).

Ainda, quanto às estratégias de espectrometria de massas, uma opção são equipamentos com analisadores *Ion Trap* associados à *Orbitrap*. Neste tipo de análise o espectrômetro de massas promove o isolamento do íon peptídico de interesse de outros íons co-eluídos e avalia o mesmo no primeiro analisador. Na sequência, o equipamento realiza a fragmentação do íon por meio da colisão com um gás, nas regiões das ligações peptídicas e os fragmentos gerados são avaliados pelo segundo analisador e registrados como espectro de massas MS/MS. Por fim, os fragmentos e o perfil de fragmentação gerados permitem a comparação com os bancos de dados e a determinação da sequência peptídica. No analisador *ion trap*, os íons peptídeos são focalizados, transferidos, retidos e armazenados em órbitas estáveis. Para a aquisição do espectros de massas, esses íons são sequencialmente ejetados a partir de sua  $m/z$  para o detector que mede o sinal gerado (LANÇAS *et al.*, 2003).

Na análise de amostras complexas onde se deseja identificação e quantificação de proteínas, espectrômetros de massas *LTQ-Orbitrap* representam uma valiosa ferramenta. O

*LTQ-Orbitrap* utiliza uma armadilha de íons orbital em seus campos eletrostáticos estáticos, onde os íons orbitam em torno de um eletrodo central e oscilam em direção axial. Esse analisador de massas vale-se então de um algoritmo de Transformada de Fourier Rápida para converter o sinal de domínio do tempo em um espectro massa-carga. O instrumento oferece alta resolução (superior a 150.000), elevada precisão (2-5 ppm), intervalo de massa-carga de 6.000 e faixa dinâmica maior que  $10^3$ , consistindo em uma ótima ferramenta para identificação e quantificação de proteínas. A análise por *LTQ-Orbitrap* possibilita vantagens como melhoria da quantificação de peptídeos de baixa abundância, obtenção de perfis de amostras biológicas muito complexas e identificação de proteínas a partir de proteomas de sequências limitadas (YATES *et al.*, 2009). Na **Figura 8** é apresentada uma representação esquemática de um *LTQ-Orbitrap*.



**Figura 8.** Esquema de um *LTQ-Orbitrap*.

O *LTQ-Orbitrap* pode ser associado a um *LTQ-Ion Trap*, o que permite que o híbrido conte com a alta resolução e precisão de massas do *Orbitrap* e com a velocidade e sensibilidade do *Ion Trap*. Ainda, o *Orbitrap* pode obter os *scans* MS completos, enquanto o *Ion Trap* realiza as reações de fragmentação em paralelo (YATES *et al.*, 2009).



#### 2.4.5.2.1 Abordagem *Shotgun*

Esta estratégia consiste em uma ferramenta que permite a análise de misturas complexas de proteínas, tais como fluidos biológicos, onde se inclui a hemolinfa de insetos, por meio de abordagem proteômica *bottom-up*.

Previamente à análise, as amostras são submetidas a procedimentos que visam concentrar as proteínas e reduzir ou eliminar compostos não proteicos que estejam presentes nas mesmas. Uma estratégia que produz este resultado é a precipitação de proteínas, que pode por sua vez, valer-se de métodos diferentes dentro do mesmo objetivo.

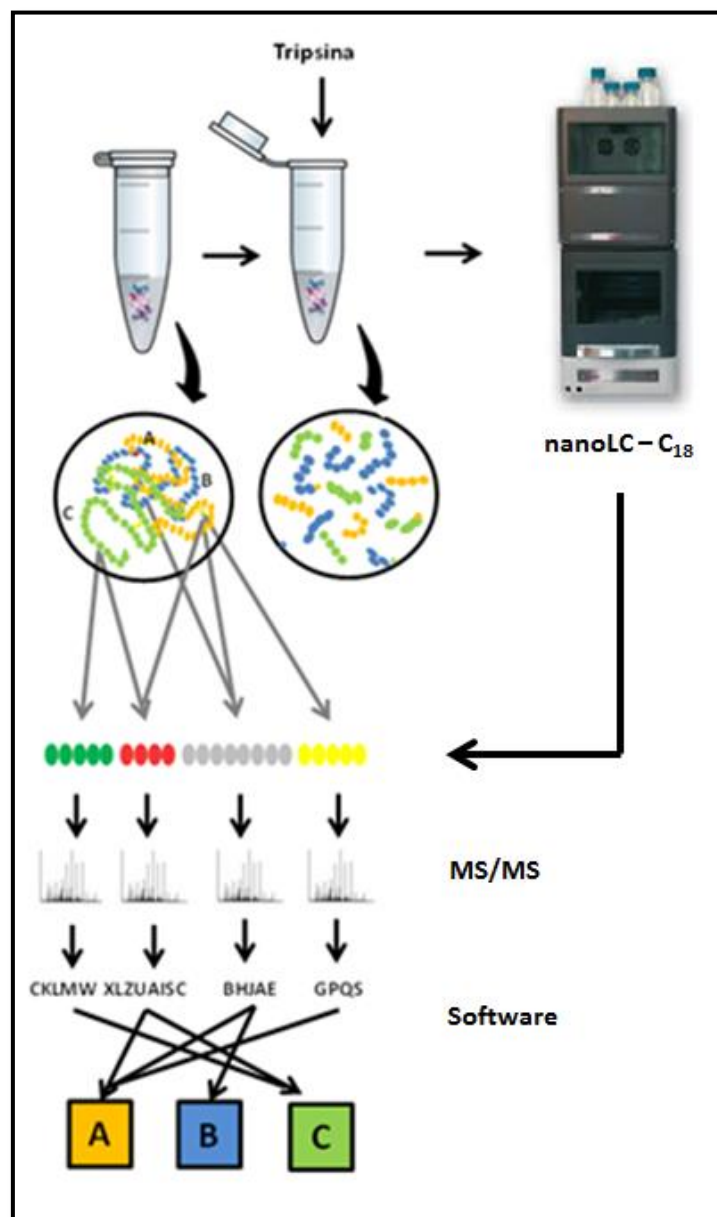
Após a concentração das proteínas por precipitação, estas são submetidas à digestão. Existem várias estratégias que podem ser adotadas para este fim, e a digestão *in silico* é uma ferramenta que permite inferir qual a melhor opção de protocolo, com vistas ao objetivo da análise. Independente disso, a tripsina é a enzima proteolítica mais utilizada com este propósito, apresentando alta especificidade para a clivagem da ligação entre os aminoácidos arginina e lisina. Desta maneira, o padrão de extremidades trípticas dos fragmentos gerado na digestão possibilita a identificação do sentido das sequências peptídicas na proteína.

A abordagem *shotgun* é marcada pela vantagem de que os resultados obtidos por este método apresentam maiores coberturas de sequências (e conseqüentemente de amostras) do que as tradicionais estratégias *GelLC-MS/MS*, já que os digestos peptídicos podem ficar retidos na matriz do gel nesta última abordagem (JONSSON *et al.*, 2001).

O software livre *Comet* (disponível em <http://comet-ms.sourceforge.net>), desenvolvido na Universidade de Washington (EUA), consiste de uma ferramenta de busca de sequências *MS/MS* em bases de dados, empregada na identificação de peptídeos e proteínas. A ferramenta utiliza um algoritmo para uma rápida correlação cruzada entre sequências peptídicas e

espectros de massas em *tandem* experimentais, de forma que a referida correlação seja obtida pela soma das intensidades dos picos pré-processadas, para cada massa de fragmento de íon calculada e para todos os peptídeos candidatos da pesquisa em banco de dados (ENG *et al.*, 2013).

A **Figura 9** apresenta uma representação esquemática de uma identificação de proteínas por abordagem *shotgun*.



**Figura 9.** Esquema ilustrativo de abordagem proteômica *shotgun*.

Para a análise dos dados *MS*, normalização destes, seleção e análise de características, uma das ferramentas disponíveis é o software livre *Pattern Lab for Proteomics* (disponível em: <http://pcarvalho.com/patternlab>).

O *PatternLab for Proteomics* também abriga em sua plataforma o *Search Engine Processor*, que compreende uma ferramenta com a finalidade de filtrar, organizar, compartilhar e visualizar correspondências de espectros peptídicas. Para isso, vale-se de uma abordagem bayesiana de 3 níveis: espectro, peptídeo e proteína lógica, o que permite a convergência dos dados em uma lista única confiável de proteínas identificadas (CARVALHO *et al.*, 2012).

#### 2.4.5.3 Eletroforese bidimensional

A eletroforese bidimensional (2D) de proteínas é uma ferramenta amplamente aplicada em proteômica, já que permite a separação de misturas proteicas complexas com base em duas propriedades das mesmas. A técnica permite que as proteínas sejam separadas de acordo com seu pI e sua massa molecular, cada propriedade em uma dimensão. A primeira dimensão consiste da focalização isoeletrica, onde as proteínas são separadas de acordo com seu pI. Posteriormente, na segunda dimensão, são então separadas de acordo com sua massa molecular. Estes processos resultam na produção de manchas de aspecto puntiforme no gel, das quais podem ser extraídas as proteínas isoladas total ou parcialmente. Os géis podem também ser escaneados e analisados em softwares específicos que avaliam a profundidade e intensidade das manchas. Desta forma, o gel 2D permite que o perfil proteico, em relação as referidas propriedades, possa ser analisado visualmente após a coloração.

#### 2.4.5.4 Culturas primárias hipocampais

As culturas primárias de células do sistema nervoso constituem uma ferramenta apropriada para o estudo de substâncias para as quais se deseja avaliar o efeito neste tipo celular, já que cultivos primários mantêm as características genótípicas e fenotípicas de seu tecido de origem. Neste tipo de cultura, as células são extraídas de organismos vivos dos quais são removidas as estruturas encefálicas. Culturas primárias possuem um grau de similaridade à condição fisiológica *in vivo* superior em relação às linhagens celulares, menos complexas. Culturas deste tipo permitem também a avaliação de características morfológicas, metabolismo energético, interação com receptores e metabolismo de neurotransmissores das células sob efeito direto de substâncias de interesse (SILVA *et al.*, 2006).

Em situações neurodegenerativas como a doença de Alzheimer, a morte celular é observada principalmente em regiões do hipocampo, estrutura curva localizada no centro do lobo temporal, envolvida em processos cognitivos. Neurônios hipocampais imaturos em cultivo primário são mais suscetíveis a danos oxidativos em relação aos mais maduros e por isso, frequentemente usados como um modelo experimental *in vitro* para a avaliação de neuroproteção frente a indução por estresse oxidativo (CHEN *et al.*, 2009).

No hipocampo são encontrados basicamente dois tipos celulares: as células piramidais, principais neurônios excitatórios da estrutura, e células granulares. Nas culturas embrionárias, há uma predominância das células piramidais, uma vez que as granulares não são características do período pré-natal (ARACAVA *et al.*, 1987).

Perda neuronal por apoptose tem sido envolvida na patogênese de condições neurodegenerativas, como nas doenças de Alzheimer, Parkinson, Huntington e Esclerose Lateral Amiotrófica. Além disso, ainda não são disponíveis recursos terapêuticos

verdadeiramente efetivos (MATTSON, 2000). Desta forma, o estudo de novas substâncias que possam apresentar atividade protetora em relação à apoptose em células neuronais tem grande importância na tentativa de impedir ou minimizar o desenvolvimento destas patologias.

As culturas celulares primárias hipocampais são obtidas pela remoção dos hipocampus de fetos de ratos, fragmentação do tecido e isolamento das células por dispersão mecânica. Posteriormente são cultivadas em meio específico para cada modelo, adicionando-se suplementos que inibem a proliferação de células não neuronais, de modo a se obter a maior pureza da cultura para neurônios.

Ratos Wistar alcançam a maturidade sexual entre 50 a 60 dias e as fêmeas possuem ciclo estral curto, de 4 a 5 dias, bem como sua gestação tem duração breve (média de 20-22 dias). As prenhes produzem uma média de 8 filhotes, mas podem chegar a 16 (ANDERSEN *et al.*, 2004). Estas características, entre outras, tornam a espécie apropriada para este tipo de estudo, que utiliza fetos no 19º dia da gestação e que necessita vários deles para permitir a obtenção da celularidade adequada para cada cultura. A espécie também produz fetos com tamanho que permite a visualização e dissecação da estrutura hipocampal.

Fetos com 19 dias de vida embrionária (E19) proporcionam uma menor população de células gliais no hipocampo (SILVA *et al.*, 2006) e possuem tamanho que possibilita a visualização e dissecação da estrutura. No intuito de reduzir ainda mais a contaminação da cultura por células da glia, utiliza-se meio de cultura adicionado de suplemento B-27, que além de diminuir a proliferação de células gliais, aumenta a sobrevivência celular e promove o desenvolvimento dos neuritos de neurônios hipocampais (XIE *et al.*, 2000).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Animais

##### 3.1.1 Insetos

No presente trabalho utilizaram-se larvas da espécie *Lonomia obliqua* Walker, 1855, (Lepidoptera: Saturniidae). Para tal estudo, foi obtida autorização de acesso ao patrimônio genético pelo CGEN (Conselho de Gestão do Patrimônio Genético) nº 02001.004238/2013-52 (Anexo A). As larvas (lagartas) de 6º instar de desenvolvimento foram coletadas diretamente na natureza. A coleta e transporte dos insetos foram autorizados pelo IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis), por meio do SISBIO (Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade) conforme o documento de nº 42780-1 de 29/05/2014 (Anexo B).

As lagartas foram coletadas e divididas em três lotes, cada um correspondendo aos animais encontrados em determinada posição geográfica e período de coleta.

O primeiro lote foi coletado em dezembro de 2012, na cidade de Monte Belo do Sul/RS (latitude 29° 09' 46" sul e longitude 51° 37' 54" oeste), em uma propriedade particular, a partir de um galho de camboatá (*Cupania vernalis*). Neste lote foram obtidas 41 lagartas de 6º instar.

O segundo lote por sua vez, teve origem de quatro colônias distintas, provenientes de localidades da região do município de Passo Fundo/RS (latitude 28° 15' 46" sul e longitude 52° 24' 25" oeste), com um total de 52 exemplares de 6º instar. As referidas colônias foram recolhidas de plátanos (*Platanus acerifolia*), em março de 2013.

E por fim, o terceiro lote foi composto de uma colônia com 55 animais, também de 6º instar, encontrados em plátano (*Platanus acerifolia*), no distrito de Faria Lemos do município de Bento Gonçalves/RS (latitude 29° 10' 15" sul e longitude 51° 31' 8" oeste), cuja coleta ocorreu em abril de 2013.

Na **Figura 10**, um lote de lagartas de 6º instar em caixa de transporte é apresentado.



**Figura 10.** Lote de lagartas coletadas em caixa de transporte.

O transporte ocorreu em caixa de polipropileno com tampa, orifícios de ventilação e contendo folhas da árvore hospedeira no seu interior. Após, os insetos foram imediatamente congelados a -20°C e, em seguida, foi procedida a coleta da hemolinfa. A identificação dos insetos do primeiro lote foi confirmada pelo CIT-RS (Centro de Informações Toxicológicas do Rio Grande do Sul). A identificação do segundo lote pela bióloga Dr<sup>a</sup>. Lisete M. Lorini e do terceiro lote pelo biólogo Dr. Edegar Fronza, a partir das características morfológicas das lagartas.

### 3.1.2 Ratos

Para este estudo foram utilizados Ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de

Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF-USP) protocolo CEUA/FCF n° 459, conforme ofício CEUA/FCF 58.2014-P459 (Anexo C), sendo observadas as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Os animais utilizados foram oriundos do Biotério de Criação da FCF-USP.

Foram utilizadas fêmeas virgens, em maturidade sexual, a com idade a partir de 90 dias, pesando cerca de 190 g e machos com idade a partir de 100 dias, pesando em torno de 200 g. Os animais foram mantidos no Biotério de Criação da FCF-USP, em gaiolas de policarbonato transparentes, do tipo microisoladores (16 cm de altura × 30 cm de largura × 38 cm de comprimento), forradas com maravalha, onde água filtrada (pH ± 7,0) e alimento (ração para roedores Nuvilab CR1<sup>®</sup>) foram fornecidos *ad libitum*. A temperatura do ambiente foi controlada (21°C ± 2°C) e foi mantido ciclo claro:escuro de 12 h (iluminação a partir das 7:00 h). Os experimentos foram realizados durante o ciclo claro.

No decorrer do desenvolvimento do estudo, foram usadas ratas prenhes, cuja gestação foi verificada por meio de citologia vaginal. A partir destas ratas foram obtidos os fetos empregados no estudo. Em média, cada rata apresentou 8 fetos, que forneceram aproximadamente  $8 \cdot 10^6$  células no total.

#### *3.1.2.1 Obtenção das fêmeas prenhes e verificação da prenhez*

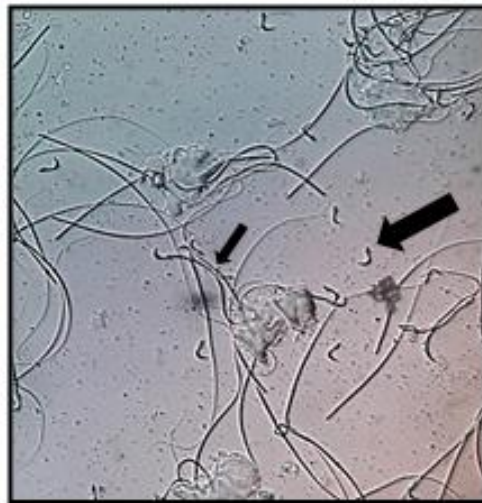
As ratas foram colocadas na gaiola de um rato macho na proporção de 3 fêmeas para cada macho, ao final do ciclo claro, para a cópula. No início da manhã seguinte, foi feita a citologia vaginal das ratas, para verificar a prenhez.

Para diagnóstico de prenhez, as ratas foram contidas manualmente e foi introduzido um *swab* umedecido em água, no canal vaginal, com suaves movimentos de rotação. O *swab*



então foi rolado em uma lâmina de microscopia para a confecção do esfregaço (técnica adaptada de MARCONDES *et al.*, 2002). As ratas foram identificadas e separadas do macho.

A citologia do epitélio vaginal no esfregaço das ratas foi observada ao microscópio óptico (objetiva em aumento de 40×), de forma que a prenhez é considerada positiva quando a celularidade é característica da fase estro (fase fértil) do ciclo estral, sendo ainda constatada a presença de espermatozoides. Se constatada a prenhez, a fêmea é identificada e a data da citologia vaginal é registrada como “dia zero” de gestação (DG0). A partir desta data, são contabilizados os dias de gestação. A **Figura 11** apresenta uma imagem do microscópio de um esfregaço vaginal, onde podem ser observados espermatozoides e células do epitélio vaginal.



**Figura 11.** Espermatozoides e células do epitélio vaginal de ratos Wistar observados ao microscópio óptico. Aumento de 40×. Seta maior: porção da cabeça de um espermatozoide. Seta menor: espermatozoide.

### 3.2 Amostras de hemolinfa

As lagartas coletadas foram submetidas a congelamento (RICCI-SILVA *et al.*, 2008) (-20°C, por aproximadamente 4 h), em recipiente plástico, para promover sua imobilização e

possibilitar a extração. Após este período, a hemolinfa foi recolhida com uma pipeta a partir de incisões feitas no corpo da lagarta na região das falsas patas e por meio do extravasamento obtido dos orifícios produzidos pelo corte das cerdas na base, na região da inserção com o tegumento, com tesoura cirúrgica, conforme descrito por SOUZA *et al.* (2005). Valendo-se desta estratégia, a contaminação com outros fluidos da lagarta como regurgitos pode ser evitada ou minimizada.

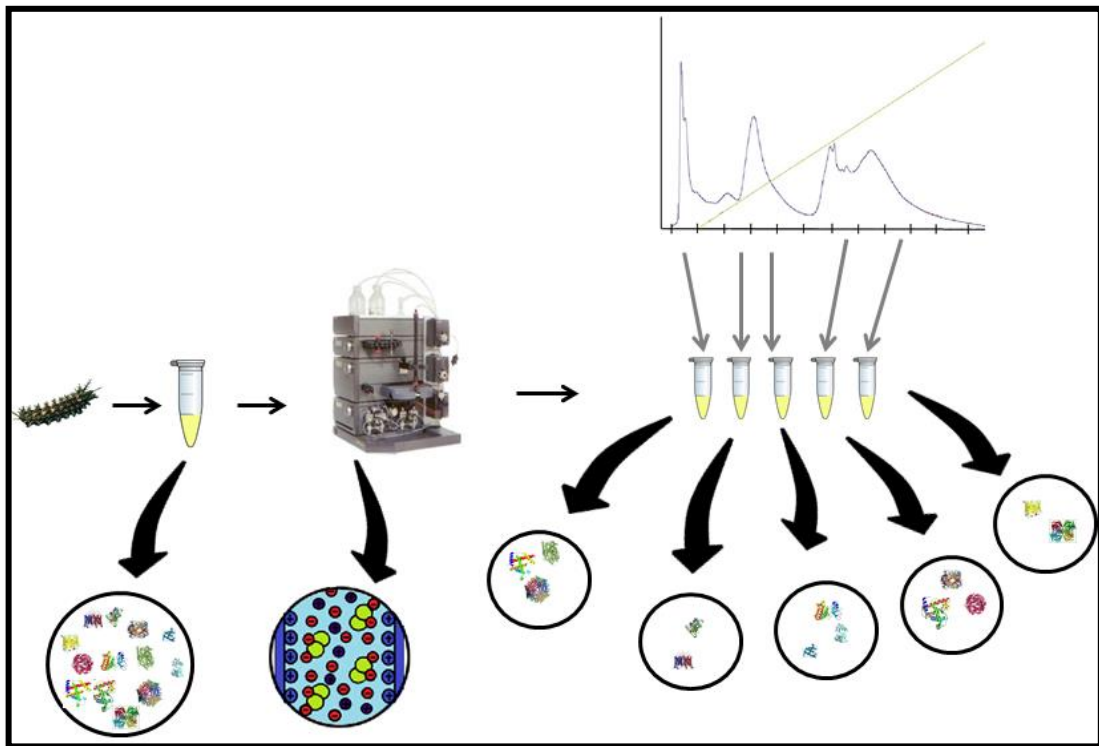
O material foi centrifugado (14.000 rpm, 20 min, 4°C) para promover a liberação do conteúdo intracelular das células livres encontradas na hemolinfa, pela ruptura das membranas celulares. Após, o sobrenadante foi submetido à filtração em membrana esterilizante de nitrocelulose com 0,22 µm de porosidade no intuito de reduzir o conteúdo de partículas em suspensão e restos celulares. Todo o processamento da hemolinfa foi realizado mantendo-a em gelo ou garantindo a refrigeração, na tentativa de reduzir ao máximo a atividade enzimática (principalmente proteásica), que poderia produzir degradação da amostra. Em seguida o filtrado foi identificado e armazenado separadamente em alíquotas de 2 mL (-20°C) de acordo com o respectivo lote, sendo denominado “Hemolinfa Bruta” (HB).

### **3.3 Purificação da hemolinfa**

A purificação de amostras complexas geralmente envolve várias etapas de fracionamento. Neste trabalho, optou-se pela utilização de amostras semi-purificadas (SOUZA *et al.*, 2005). Assim sendo, o fracionamento foi realizado a partir da aplicação da hemolinfa bruta em um sistema cromatográfico *FPLC* (*Fast Protein Liquid Chromatography*) preparativo (com fluxo maior de solvente e coletor de fração) Äkta Purifier, com coletor de frações (*Frac 900*) acoplado (General Electric Healthcare, Reino Unido), equipado com uma

coluna de troca iônica *Resource Q* (General Electric Healthcare, Reino Unido), conforme previamente determinado por SOUZA *et al.* (2005), com modificações. A coluna *Resource Q* é constituída por um trocador aniônico forte, com partículas de poliestireno/divinil benzeno de 15 µm de diâmetro, o que lhe confere uma ótima resolução.

A HB foi fracionada no laboratório de Parasitologia e Entomologia do Instituto Butantan, sob a coordenação do Dr. Ronaldo Zucatelli Mendonça, segundo a metodologia descrita por Souza *et al.*, 2005. A **Figura 12** ilustra o fracionamento das amostras de hemolinfa por cromatografia.



**Figura 12.** Fracionamento das amostras de hemolinfa por cromatografia de troca iônica.

Neste propósito, 500 µL de HB foram colocados no injetor automático de um sistema de cromatografia líquida de alta resolução *Äkta Purifier*, equipado com duas bombas (Binário), detector para ultravioleta, coluna de troca aniônica (*Resource Q*) de 1 mL de volume e coletor de frações *Frac 900* acoplado. A coluna foi equilibrada com tampão Tris-

HCl 20 mmol L<sup>-1</sup>, pH 8,0, com fluxo de eluição de 0,5 mL por min e volume de eluição de 25 mL. O tampão de eluição empregado foi Tris-HCl 20 mmol L<sup>-1</sup>, NaCl 1 mol L<sup>-1</sup>, pH 8,0 com um gradiente de eluição linear de 0-100% (concentração final de NaCl 1 mol L<sup>-1</sup>). Foram coletadas frações de 1 mL, sendo que a eluição das proteínas foi monitorada por leitura de absorvância nos comprimentos de onda de 280 nm, 254 nm e 214 nm, em função da maioria das proteínas serem contempladas nesta faixa (absorção das ligações peptídicas) (SOUZA *et al.*, 2005). O processo de fracionamento foi monitorado pelo software *Unicorn 4.0*.

### **3.4 Determinação da concentração proteica das amostras**

A concentração de proteínas totais das amostras foi estimada pela metodologia colorimétrica do Azul de Coomassie, conforme descrito por Bradford (1976). Inicialmente foi preparada a solução reagente de Bradford {850 mL de água destilada, 30 mL de etanol 95% (Merck, Alemanha), 60 mL de ácido fosfórico 88% (Sigma-Aldrich Co., EUA), 60 mL da solução de estoque de Bradford [200 mL de etanol 95%, 40 mL de ácido fosfórico 88%, 0,70 g de Coomassie Brilliant Blue (Bio-Rad Laboratories Inc., Alemanha)]} e após, esta foi diluída em água destilada na proporção 1:5 e filtrada em papel filtro para a remoção de possíveis partículas em suspensão.

Foram aplicados 10 µL da amostra e 200 µL de solução reagente de Bradford em microplaca de 96 poços, em triplicata. A leitura espectrofotométrica foi realizada após 5 min, em leitor de microplacas, a 595 nm e para a determinação da concentração das amostras foi utilizada uma curva padrão de albumina de soro bovino (*BSA - Bovine Serum Albumin*, Sigma-Aldrich Co., EUA) nas mesmas condições do ensaio.

### 3.5 Eletroforese em gel de Poliacrilamida (*SDS-PAGE*) Bidimensional

#### 3.5.1 Preparação dos géis

**Gel de Separação (12%):** Para o preparo de 100 mL (2 géis) do gel de separação foram adicionados 33,5 mL de Água deionizada, 40 mL de solução de Acrilamida 30%/ *N,N'*-metileno-bis-acrilamida 2,7% (m/v) (Sigma-Aldrich Co., EUA), 25 mL de Tris-HCl 1,5 mol L<sup>-1</sup>, pH 8,8 (m/v); 1 mL de Dodecil Sulfato de Sódio 10% (m/v) (*SDS - Sodium Dodecyl Sulfate*, Bio-Rad Laboratories Inc., Alemanha), 500 µL de Persulfato de amônio 10% (m/v) (*APS - Ammonium Persulfate*, Sigma-Aldrich Co., EUA) e 50 µL de *N,N,N',N'*-tetrametiletilenodiamina (TEMED, Bio-Rad Laboratories Inc., Alemanha).

**Gel de Empilhamento (4%):** Para o preparo de 20 mL (suficiente para 2 géis) foram utilizados 12,2 mL de Água deionizada, 2,6 mL de solução de Acrilamida 30%/ *N,N'*-metileno-bis-acrilamida 2,7% (m/v), 5 mL de Tris-HCl 0,5 mol L<sup>-1</sup>, pH 6,8 (m/v); 200 µL de *SDS* 10% (m/v), 100 µL de *APS* 10% (m/v) e 20 µL de TEMED.

#### 3.5.2 Preparo da amostra de hemolinfa

Como o propósito da utilização desta técnica foi a visualização do perfil proteico da hemolinfa, para nortear a escolha das técnicas subsequentes de fracionamento e identificação de proteínas, e em função do tempo requerido e custo envolvido na sua execução, esta etapa foi realizada somente com a hemolinfa do Lote 1.

Para o preparo da amostra de hemolinfa, primeiramente, foi adicionado ácido tricloroacético (*TCA - Trichloroacetic acid*, Sigma-Aldrich Co., EUA), com a intenção de

promover a precipitação das proteínas. Em sequência o sobrenadante foi desprezado e foram realizadas 5 lavagens com acetona gelada, com duração de 10 min cada. O *pellet* resultante foi ressuspenso com tampão de reidratação [Ureia 7 mol L<sup>-1</sup> (m/v) (Sigma-Aldrich Co., EUA), Tiourea 2 mol L<sup>-1</sup> (m/v) (Sigma-Aldrich Co., EUA), 3-[(3-Colamidopropil) dimetilamonio]-1-propano sulfonato 4% (m/v) (CHAPS, Sigma-Aldrich Co., EUA), 0,2% Anfólito (v/v) (Bio-Lyte 3/10 Ampholyte, Bio-Rad Laboratories Inc., Alemanha), Azul de bromofenol 0,002% (m/v) (Sigma-Aldrich Co., EUA), Água deionizada], para solubilização da amostra. Após, foi adicionado Ditiotereitol 1% (DTT, Bio-Rad Laboratories Inc., Alemanha) na solução e o tubo foi centrifugado a 10.000 rpm por 10 min, a 20°C.

### 3.5.3 Focalização isoelétrica

A etapa de focalização isoelétrica ou isofocalização corresponde à primeira dimensão da eletroforese bidimensional e tem o objetivo de promover a separação eletroforética das proteínas de acordo com seu ponto isoelétrico (pI).

Para esta etapa, o sobrenadante da amostra anteriormente preparada foi previamente adicionado em um aparato *IPG box* (General Electric Healthcare, Reino Unido), disposto ao longo de uma canaleta individual de forma uniforme e sobre esta foi disposta uma tira de pH imobilizado em gradiente linear de 3-10, de 17 cm (Bio-Rad Laboratories Inc., Alemanha), com a parte do gel voltada para a amostra. A tampa do aparato foi fechada e a amostra ali permaneceu com a tira por cerca de 20 h.

Decorrido este período, a tira foi retirada e cuidadosamente colocada com o gel voltado para cima, no focalizador isoelétrico *ETTAN IPGphor 3* (General Electric Healthcare,

Reino Unido), que foi previamente preparado com a distribuição de 80 mL de óleo mineral (Bio-Rad Laboratories *Inc.*, Alemanha) sobre a placa de cerâmica do equipamento.

Em cada extremidade da tira foi posicionado um cartão de papel umedecido com água deionizada (próprio para este fim e fornecido pelo fabricante do equipamento). Os dois eletrodos foram posicionados sobre estes cartões, de forma que os mesmos tocassem o papel na porção sobre o gel. Em seguida, a focalização isoeétrica no software foi programada, conforme protocolo do fabricante do equipamento.

Após esta etapa, promoveu-se o equilíbrio da tira pela adição de 2,5 mL de tampão de equilíbrio [Ureia 6 mol L<sup>-1</sup> (m/v), Glicerol 30% (v/v) (Merck, Alemanha), Azul de bromofenol 0,010% (m/v), Água deionizada] contendo DTT 1% (m/v) na canaleta contendo a tira e agitando por 15 min. Em seguida, a solução foi cuidadosamente desprezada e adicionou-se 2,5 mL de tampão de equilíbrio acrescido de iodoacetamida (IAA - Sigma-Aldrich *Co.*, EUA) 4% na canaleta com a tira. Novamente procedeu-se a agitação por 15 min. Após este procedimento, a solução foi desprezada.

#### 3.5.4 Eletroforese

Em uma cuba vertical para eletroforese *Protean II XI Cell* (General Electric Healthcare, Reino Unido), o gel de acrilamida previamente preparado foi adicionado e posteriormente foi acrescido 1 L de tampão de corrida [Tris 0,18% (m/v), Glicina 0,864% (v/v) (Sigma-Aldrich *Co.*, EUA), SDS 0,06% (m/v), Água deionizada]. Em seguida, a tira de pH imobilizado com a amostra foi posicionada no sentido horizontal, na extremidade superior do gel.

O marcador de proteínas (20 µL - *Precision plus protein*<sup>TM</sup> *unstained standards*, Bio-Rad Laboratories *Inc.*, Alemanha) foi adicionado no local próprio para este no gel, os

eletrodos foram posicionados e a corrida eletroforética foi iniciada com uma corrente de 40 mA por gel, até que a amostra saiu do gel de empacotamento e passou para o gel de separação, momento em que a corrente foi modificada para 50 mA por gel.

A utilização do detergente aniônico chaotrópico *SDS* tem por finalidade a desnaturação das proteínas, já que se liga fortemente as mesmas. Além disso, fornece uma carga negativa constante por unidade de massa. Desta forma, os complexos *SDS*-proteína movem-se para o ânodo durante a eletroforese. O gel permite a separação das proteínas por massas moleculares com base na propriedade de que suas mobilidades são inversamente proporcionais ao logaritmo das mesmas. Proteínas padrão de massas moleculares conhecidas são aplicadas como marcadores na mesma corrida eletroforética, permitindo assim que as massas moleculares de amostras proteicas desconhecidas sejam determinadas. Proteínas abaixo do seu pI, carregadas negativamente migrarão para o cátodo até a região em que o pH corresponda ao seu pI, cessando o movimento de migração. O oposto ocorre em relação as proteínas acima de seu pI. O pI de cada proteína vai depender dos valores individuais de pK (constante de dissociação) de todos os grupamentos ionizáveis presentes nas cadeias laterais dos aminoácidos e dos extremos das cadeias polipeptídicas. Sendo assim, a carga líquida da proteína depende do número de cadeias ionizáveis, do valor do pK e do pH do meio. O pH onde o resultado da soma das cargas negativas é igual ao das cargas positivas é o ponto isoelétrico da proteína (GE HEALTHCARE, 2004).

### *3.5.5 Coloração do gel*

Após o término da corrida eletroforética o gel foi retirado do suporte da cuba e disposto em bandeja plástica com 500 mL de Coomassie Coloidal [ácido fosfórico 2% (v/v)



(Sigma-Aldrich Co., EUA), Metanol 20% (v/v) (Sigma-Aldrich Co., EUA), Sulfato de Amônio 10% (m/v) (Sigma-Aldrich Co., EUA), Coomassie Brilliant Blue-G-250 0,05% (m/v) (Bio-Rad Laboratories Inc., Alemanha), Água deionizada], ao abrigo da luz, durante 4-5 dias, para a etapa de coloração. O corante foi retirado, sendo substituído pelo mesmo volume de água destilada para descorar o gel. A água foi renovada frequentemente para promover o adequado descoramento.

Decorridas 72 h da coloração, o gel foi escaneado em um equipamento *Image Scanner III* (General Electric Healthcare, Reino Unido), avaliado e editado no software *Image Master 2D Platinum 7.0* (General Electric Healthcare, Reino Unido).

### **3.6 Avaliação do perfil proteico por Espectrometria de Massas**

#### *3.6.1 Precipitação de proteínas*

Inicialmente, 20 µg (proteínas totais) de cada amostra foram submetidos à precipitação com clorofórmio e metanol (Sigma-Aldrich Co., EUA) (WESSEL & FLÜGGE, 1984). As amostras foram diluídas em 3:1:3, metanol, clorofórmio e água destilada respectivamente. Em seguida foi realizada uma etapa de centrifugação por 10 min a 17.000 rpm. A fase sobrenadante foi removida e à solução restante foram acrescentados três volumes de metanol, sendo posteriormente realizada mais uma etapa de centrifugação (10 min, 17.000 rpm). Após, a fase líquida foi descartada e o precipitado mantido a temperatura ambiente para secagem.

### 3.6.2 Digestão das Proteínas

A digestão de proteínas totais em solução com tripsina foi escolhida como método de obtenção de fragmentos de peptídeos. A amostra foi inicialmente ressuspensa em tampão com 25  $\mu\text{L}$  de ureia 8  $\text{mol L}^{-1}$  (Sigma-Aldrich Co., EUA) e Tris 0,1  $\text{mol L}^{-1}$  (Sigma-Aldrich Co., EUA).

Para digestão, foi utilizado o protocolo adaptado de Klammer e MacCoss (2006). Resumidamente, pontes dissulfeto das proteínas foram reduzidas pela adição de DTT 10  $\text{mmol L}^{-1}$  (Bio-Rad Laboratories Inc., Alemanha) a 37°C por 20 min e em seguida foram alquiladas pela adição de IAA 50  $\text{mmol L}^{-1}$  (Sigma-Aldrich Co., EUA), à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, por 20 min. Posteriormente, houve a diluição da ureia para 2  $\text{mol L}^{-1}$  pelo acréscimo de 60  $\mu\text{L}$  de Tris 0,1  $\text{mol L}^{-1}$ . As proteínas foram então digeridas com tripsina em uma razão 1:50 (enzima:substrato), na presença de  $\text{CaCl}_2$  1  $\text{mmol L}^{-1}$  por 18 h a 37°C. Ácido fórmico foi adicionado para finalizar a reação (5% v/v, concentração final).

### 3.6.3 Mapeamento Peptídico das Amostras com quantificação label free

As separações cromatográficas das misturas complexas de peptídeos foram realizadas utilizando o sistema cromatográfico *NanoLC Ultra 1D plus* (Eksigent Technologies, EUA), conectado a um espectrômetro de massas híbrido *LTQ-XL Orbitrap Discovery* (Thermo Fischer Scientific, EUA). O sistema foi equipado com *autosampler NanoLC AS-2* (Eksigent Technologies, EUA) e fonte *nano-electrospray* (Thermo Fischer Scientific, EUA). As colunas capilares analíticas (diâmetro interno de 100  $\mu\text{m}$  e 20 cm de comprimento com ponteira de 5

µm de diâmetro interno) e pré-colunas (diâmetro interno de 150 µm e 2 cm de comprimento com extremidade bloqueada por Kasil) foram empacotadas no laboratório com fase estacionária resina de fase reversa (5 µm ODS-AQ C18, Yamamura Chemical Laboratories Co., Japão). As análises foram efetuadas em triplicata, intercaladas com uma etapa de lavagem de 60 min com a fase móvel aquosa.

Foram injetados 10 µL de cada amostra contendo 5 e 1 µg de hemolinfa de *L. obliqua* e frações cromatográficas, respectivamente, com auxílio de um amostrador e durante 15 min foi mantido fluxo de 1 µL min<sup>-1</sup>. As quantidades de hemolinfa e frações utilizadas foram determinadas proporcionalmente em relação às concentrações proteicas das mesmas. A fase móvel A (5% de acetonitrila e 0,1% de ácido fórmico em água e B (90 % de acetonitrila e 0,1% de ácido fórmico) foram adicionadas conforme o gradiente apresentado na **Tabela 5**, a um fluxo de 400 nL min<sup>-1</sup> atingindo um tempo total de separação cromatográfica de 120 min para as amostras de frações e 360 min para as de hemolinfa. O método cromatográfico de 360 minutos empregou o mesmo gradiente de separação, proporcionalmente mais longo.

**Tabela 5.** Composição do gradiente em relação ao tempo de eluição.

Tempo (min)	Fase móvel A (%)	Fase Móvel B (%)
0	100	0
5	95	5
65	75	25
85	50	50
100	20	80
105	20	80
106	95	5
120	95	5

A eluição e emissão em fonte de nano-*electrospray* dos peptídeos ocorreram diretamente da extremidade da coluna analítica. O instrumento foi programado para ciclos de aquisição, em modo de ionização positiva [*ESI* (+)], de um espectro de *MSI* no intervalo de

razão massa/carga ( $m/z$ ) de 400-1.600 com resolução de 30.000 (em  $m/z$  400) no *Orbitrap*, seguido da aquisição de 8 espectros no modo *MS2* dos íons mais abundantes. Para o modo *MS2*, a dissociação Induzida por Colisão (*CID*) foi usado como método de fragmentação, com uma ativação  $Q$  de 0,250, um tempo de ativação de 30 ms, energia de colisão normalizada de 35%, e uma amplitude de isolamento de 1 Da. Para explorar a complexidade da amostra e adquirir espectros de peptídeos menos abundantes, massas de peptídeos adquiridos foram adicionadas a uma lista de exclusão dinâmica com tamanho de 100 íons e tempo de permanência de 30 s durante a aquisição dos espectros *MS2*. Na análise foram empregados voltagem do spray de 2,2 kV, temperatura e voltagem capilar de 275°C e 34 V respectivamente, além de hélio como gás de colisão.

#### 3.6.4 Análise dos dados

Para a identificação de proteínas, foi construído um banco de dados não redundante das sequências referentes às entradas de proteínas individuais para “*Lonomia*” presentes no banco de dados do *NCBI* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), a partir do qual foram realizadas as pesquisas diretas de arquivos do formato da *Thermo Fischer Scientific* (.raw) dos espectros *MS2* com o software de busca *Comet* (ENG *et al.*, 2013).

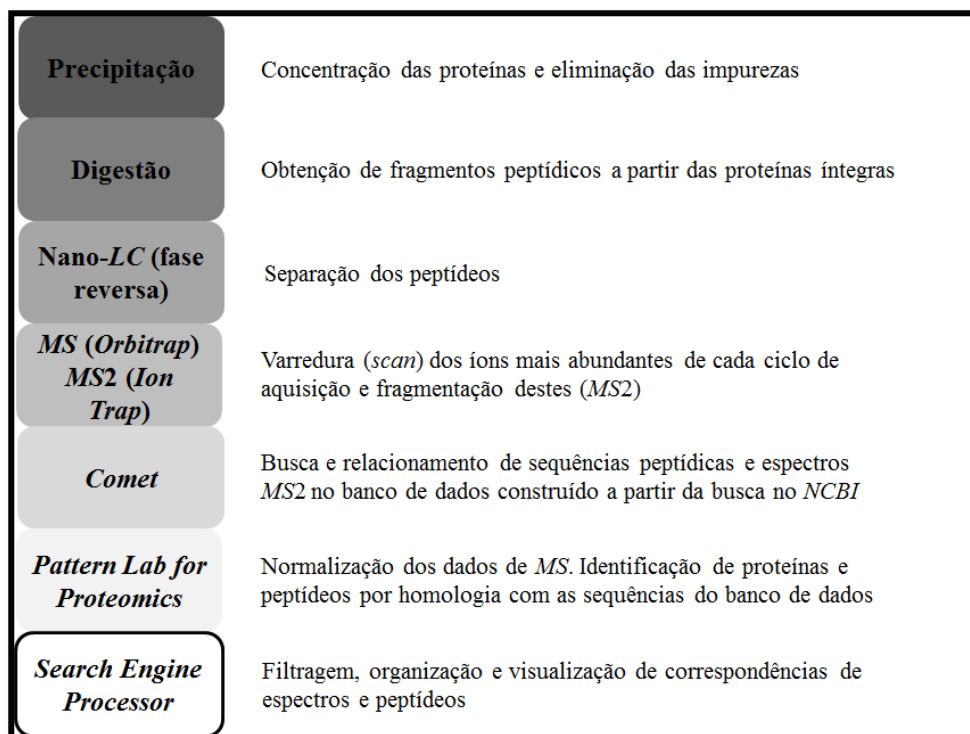
Após processados no *Comet*, os dados foram analisados no software *Pattern Lab for Proteomics* (disponível em <http://pcarvalho.com/patternlab>), onde foi realizada a busca para a identificação de proteínas e peptídeos por homologia com as sequências do banco de dados (CARVALHO *et al.*, 2012).

Peptídeos candidatos foram considerados aqueles contendo uma ou duas extremidades trípticas. Carbamidometilação de cisteínas foi adotada como modificação fixa. Tolerância de

50 ppm para íons precursoros e 1 Da para íons fragmento foram utilizados na busca dos dados.

O software *Search Engine Processor* (CARVALHO *et al.*, 2012) foi empregado para filtrar os espectros identificados. Estado tríplico e carga foram critérios adotados para o agrupamento dos peptídeos identificados. Os parâmetros *Xcorr*, *DeltaCN*, *DeltaMass*, *Peaks Matched* e *Spec Count Score* foram usados para gerar um escore bayesiano. Ficou estabelecido um valor de corte para aceitar 1% de falso positivo com base nas identificações do banco de dados reverso. Além disso, foi adotado o critério de comprimento de sequência mínimo de 6 resíduos. Os resultados foram pós-processados para acertar identificações com menos de 10 ppm de variação de massa.

A **Figura 13** apresenta uma representação esquemática da metodologia adotada para a identificação das proteínas da hemolinfa de *L. obliqua*.



**Figura 13.** Representação esquemática das etapas envolvidas na identificação de proteínas pela estratégia proteômica *shotgun* adotada neste estudo.

### 3.7 Preparação de Culturas de Células Neurônais

Os procedimentos relacionados à realização das culturas primárias hipocâmpais foram desenvolvidos no Laboratório de Toxicologia Celular e Molecular, sob coordenação da Dr.<sup>a</sup> Tania Marcourakis, do Departamento de Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF), da Universidade de São Paulo (USP, São Paulo, SP).

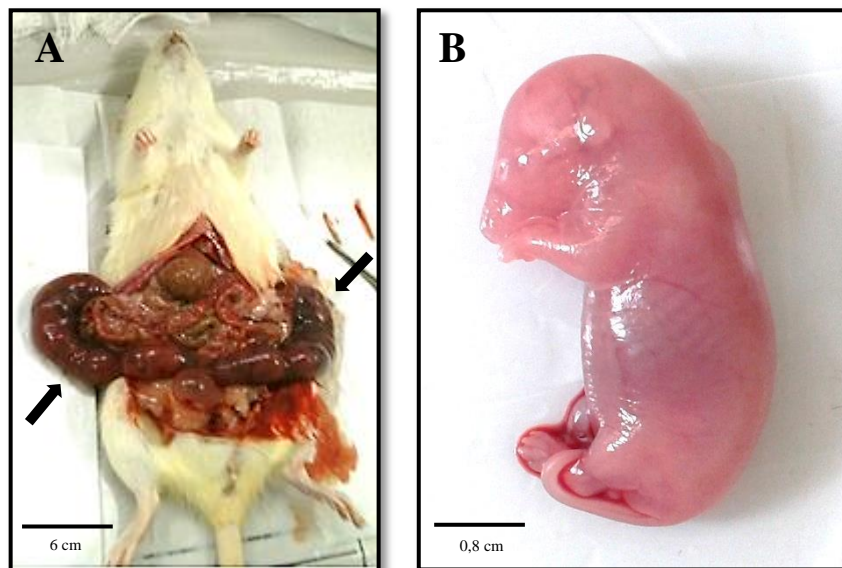
As culturas celulares primárias hipocâmpais embrionárias empregadas neste estudo foram elaboradas conforme Garcia *et al.* (2012), com modificações. Fetos de ratos Wistar com 19 dias de vida embrionária (E19) foram utilizados na confecção das culturas hipocâmpais. A cesariana foi realizada em ratas pré-anestesiadas com pentobarbital (45 mg kg<sup>-1</sup> de animal). A solução anestésica de indução foi aplicada intraperitonealmente (IP) e quando necessário reforço foi aplicada meia dose de anestésico via intramuscular (IM). A verificação do plano anestésico foi efetuada por meio da ausência de reflexos podal e caudal. Além disso, a frequência ventilatória foi monitorada visualmente durante todo o procedimento.

Depois de verificada a ausência de reflexos motores, indicativa do adequado efeito anestésico, o abdômen das ratas foi previamente desinfetado com etanol 70% e a abertura seguiu-se com a utilização de pinça e tesoura cirúrgica.

O útero foi exposto e os fetos imediatamente retirados das bolsas placentárias. À medida que os mesmos foram retirados, estes foram decapitados com tesoura cirúrgica e procedeu-se à abertura da caixa craniana, com a retirada do encéfalo (**Figura 14**). A estrutura, por sua vez, foi disposta sobre papel filtro umedecido com *HBSS*, sobre uma placa de gelo, para a dissecação do hipocampo. Os hemisférios cerebrais foram separados e após a delimitação visual da estrutura, os hipocâmpos foram dissecados com tesouras cirúrgicas

oftalmológicas. As estruturas coletadas foram depositadas em placa de Petri sobre gelo, contendo 5 mL de Solução de Hipocampo [5 mL de meio Neurobasal sem fenol (Gibco<sup>®</sup>, EUA) adicionado de 5  $\mu$ L de Penicilina 10.000 UI: Estreptomicina 10 mg mL<sup>-1</sup> NaCl 0,9% (Sigma-Aldrich Co., EUA), sendo ao final esta solução filtrada em seringa com filtro esterilizante de 0,22  $\mu$ m].

Assim que concluída a coleta dos hipocampos, a placa com os mesmos passou a ser manipulada em cabina de segurança biológica BioSeg 09 (VECO<sup>®</sup>, Brasil) classe II, tipo A1. Sob fluxo laminar, os hipocampos foram lavados 2 vezes com solução salina balanceada de Hank (HBSS 1x, Gibco<sup>®</sup>, EUA), HBSS e fragmentados com tesoura cirúrgica oftálmica seguido de digestão proteolítica do tecido com solução de tripsina 1  $\times$  0,25% suplementada com vermelho fenol (Gibco<sup>®</sup>, EUA) (BANKER & COWAN, 1977; HUETTNER & BAUGHMAN, 1986; JAHR & STEVENS, 1987; SILVA *et al.*, 2006).



**Figura 14.** A: Rato Wistar fêmea com útero de 19 dias de gestação exposto (setas). B: Feto com 19 dias de vida embrionária.

Primeiramente, o material fragmentado na placa de Petri foi transferido para um erlenmeyer de 25 mL contendo 2,5 mL de solução de tripsina 1  $\times$  0,25% suplementada com

vermelho fenol, cujo pH foi previamente ajustado para 7,4 com carbogênio (95% O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>). Em seguida, o erlenmeyer foi vedado com Parafilm® e colocado em banho de água a 37°C, com agitação plana (Polyscience, EUA), durante 10 min, para digestão proteolítica do tecido.

A solução resultante foi transferida para um tubo de centrifugação de fundo cônico, de 15 mL, contendo 2 mL do total de Solução de Descanso [4 mL de *HBSS*; 222 µL de solução de *DNAse* (Deoxiribonuclease I 5000 UI mL<sup>-1</sup> em NaCl 0,15 mol L<sup>-1</sup>, Sigma-Aldrich Co., EUA); 444 µL de soro fetal bovino 10% (Gibco®, EUA); 40 µL de solução de vermelho fenol 0,5% em tampão fosfato salino de Dubelco (*DPBS - Dubelco's Phosphate Buffered Saline*) (Sigma-Aldrich Co., EUA), e pH da solução ajustado para 7,2-7,4 com carbogênio]. Na sequência, o tubo foi centrifugado a 300 g, por 2 min, a 20°C em centrífuga Eppendorf 5810R (Eppendorf, Alemanha).

Ao término da centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em 2 mL de solução de descanso residuais. A solução então foi dispersa mecanicamente com pipetas Pasteur de vidro de 3 diâmetros distintos e decrescentes, por aproximadamente 40 × para cada diâmetro, suave e lentamente. Este processo está associado à dispersão mecânica do tecido, para promover a dissociação e isolamento das células hipocâmpais (BANKER & COWAN, 1977; HUETTNER *et al.*, 1986; JAHR *et al.*, 1987; SILVA *et al.*, 2006).

Em seguida, o tubo foi centrifugado a 300 g, por 5 min, a 20°C. Posteriormente, o sobrenadante foi desprezado e as células precipitadas foram ressuspendidas em 1 mL de meio de cultura Neurobasal sem fenol suplementado [100 µL de solução de *L*-glutamina 200 mmol L<sup>-1</sup> (Gibco®, EUA), 100 µL de solução de ácido *L*-glutâmico 10 mmol L<sup>-1</sup> (Sigma-Aldrich



Co., EUA), 400  $\mu\text{L}$  de Penicilina 10.000 U: Estreptomicina 10  $\text{mg mL}^{-1}$  em NaCl 0,9% e 800  $\mu\text{L}$  de Suplemento B-27 50 $\times$  (Gibco<sup>®</sup>, EUA) .

Ao final deste processo, a suspensão resultante foi submetida a uma “peneira de células” BD Falcon *Cell Strainer* 70  $\mu\text{m}$  (BD, EUA), e transferida para um tubo cônico de centrifugação de 50 mL, para eliminar possíveis grumos celulares residuais. Após, foi preparada uma suspensão a partir de 10  $\mu\text{L}$  desta suspensão de células e 10  $\mu\text{L}$  de Azul de Tripán (Sigma-Aldrich Co., EUA) [1% em tampão fosfato salino (*Phosphate Buffered Saline* 1 $\times$  – *PBS*)]. O produto foi então observado em hematocitômetro tipo câmara de Neubauer (0,100  $\text{mm} \times 0,0025 \text{ mm}^2$  – Optik Labor, Reino Unido), onde foi realizada a contagem de células viáveis no quadrante central, utilizando um microscópio invertido automatizado Leica DMI4000 B (Leica Microsystems, Alemanha).

A avaliação da viabilidade celular pelo ensaio de exclusão do Azul de Tripán parte do princípio de que células viáveis apresentam membranas intactas, que não permitem a incorporação deste corante, fazendo com que estas se mantenham sem coloração. Células que possuem membranas celulares danificadas (inviáveis) permitem o fluxo do corante para o seu interior, adquirindo coloração azul do citoplasma. Desta forma, esta técnica permite que apenas as células viáveis (íntegras) sejam contabilizadas (STROBER, 2001).

Foram realizadas 3 contagens distintas subsequentes e admitido como o número de células a média destas contagens, corrigida a diluição e considerado o volume da câmara de Neubauer.

Sendo assim, temos que o n<sup>o</sup> de células por mL corresponde ao n<sup>o</sup> de células contadas na câmara de Neubauer multiplicado pelo fator de diluição (2) e multiplicado pelo volume correspondente à câmara de Neubauer ( $10^4$ ).

Para o cultivo do número de células indicado para os testes subsequentes, foram realizadas as diluições pertinentes das células em meio de cultura suplementado, de forma a obter as concentrações celulares desejadas. O cálculo para estas diluições foi efetuado como segue:

$$V_a = \frac{cp}{dn}$$

onde:

$V_a$ : Volume de suspensão de células (em mL)

$c$ : n° de células a cultivar por poço da microplaca

$p$ : n° de poços a serem cultivados

$d$ : Volume final da diluição

$n$ : n° da média de células contadas na câmara de Neubauer

O “ $c$ ” é calculado a partir da área cultivável dos poços das microplacas individualmente, considerando o n° de células cultiváveis por  $\text{cm}^2$ . Nos experimentos foram utilizadas microplacas de 96 poços, que possuem uma superfície para cultivo de  $0,335 \text{ cm}^2$ .

O volume de meio de cultura suplementado utilizado para a diluição da suspensão de células por sua vez, foi obtido pela subtração do volume de suspensão de células do volume total de suspensão adicionado em todos os poços das placas cultivados (considerando o volume de preenchimento da superfície do fundo do poço como  $50 \mu\text{L}$  em microplacas de 96 poços).

$$V_m = V_t - V_s$$

Onde,

$V_m$ : Volume de meio de cultura suplementado

$V_t$ : Volume total

$V_s$ : Volume de suspensão de células

Para os cultivos celulares foram utilizadas microplacas de poliestireno de fundo chato, estéreis, com 96 poços cultiváveis (Sarsted AG & Co, Alemanha). Estas foram previamente tratadas com solução aquosa de Poli-L-lisina 0,01% (PLL - Sigma-Aldrich Co., EUA), para melhorar a aderência das células neuronais à microplaca, adicionando-se aos poços, em cabina de segurança biológica, 50 µL de PLL (o suficiente para a cobertura da superfície do fundo do poço). Após um período de 30 min, toda a PLL foi retirada e as placas foram deixadas abertas por mais 30 min para secagem.

A suspensão de células foi então adicionada às microplacas com pipeta multicanal eletrônica automática *Xplorer* (Eppendorf, Alemanha), a uma densidade de  $5.10^4$  células por poço, sendo que inicialmente foram adicionados 50 µL de suspensão em cada um, em movimentos circulares. Em seguida, as microplacas foram mantidas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, por 30 min em incubadora *Thermo Scientific Forma Series II, Water Jacket CO<sub>2</sub>* (Thermo Fisher Scientific Inc., EUA) para a aderência celular e após foi completado o volume dos poços (200 µL) com meio de cultura suplementado e reincubadas as placas nas mesmas condições anteriores.

O período de incubação das culturas para os testes foi de 7 dias, sendo que metade do volume do meio de cultura total de cada poço cultivado foi substituída por meio de cultura suplementado novo a cada período de 48 h.

A predominância de neurônios na cultura foi constatada previamente por meio de imuno-histoquímica segundo a técnica de Kivell *et al.* (2001), por GARCIA *et al.* (2012), que verificou cerca de 93% de neurônios na cultura, sendo  $7,1 \pm 0,2\%$  das células representadas por astrócitos.

### 3.8 Avaliação da Citotoxicidade da Hemolinfa

Inicialmente foram testadas as concentrações 0,05; 0,10; 0,25; 0,50; 1,00; 2,00 e 5,00% de HB (em meio neurobasal suplementado com *L*-glutamina e Penicilina 10.000 U: Estreptomicina 10 mg mL<sup>-1</sup> de NaCl 0,9%; v/v) previamente centrifugada e filtrada em filtro esterilizante de 0,22 µm, pelos tempos de incubação de 1 e 2 h, a 37°C a 5% de CO<sub>2</sub>. As mesmas concentrações e tempos de exposição utilizados para a avaliação de citotoxicidade da hemolinfa bruta foram aplicados à fração purificada obtida como descrito anteriormente.

Todos os tratamentos e controles utilizados tiveram como diluente meio neurobasal suplementado (meio neurobasal acrescido de *L*-glutamina e Penicilina 10.000 U: Estreptomicina 10 mg mL<sup>-1</sup> de NaCl 0,9%). Como controle positivo de redução da viabilidade celular, foi utilizado cloreto de potássio 250 mmol L<sup>-1</sup> (KCl - Synth<sup>®</sup>, Brasil). Ainda, foram avaliados como controle somente meio neurobasal suplementado e o adicionado de Suplemento B-27 50×.

Após o período de incubação com as concentrações de HB e frações, a viabilidade celular foi avaliada por meio do ensaio de redução do MTT.

### 3.9 Indução de apoptose por peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Estresse oxidativo pode ser produzido a partir de diferentes indutores, dentre os quais o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, frequentemente utilizado na avaliação dos mecanismos de neurotoxicidade e neuroproteção. Estudos sugerem que o mecanismo envolvido no dano oxidativo produzido por este composto esteja relacionado à alteração nos níveis de proteínas envolvidas na apoptose (aumento da Bax – pró-apoptótica e redução da Bcl-2 – anti-apoptótica) resultando

em liberação do citocromo c e ativação de caspase-3, eventos que levam a morte celular por apoptose (CAI *et al.*, 2008; PARK *et al.*, 2010).

O preparo das soluções de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi realizado imediatamente antes da exposição das células (dentro de 5 min) e ao abrigo da luz, devido à natureza altamente reativa do composto e sua curta meia-vida em soluções diluídas, o que poderia resultar em redução da toxicidade do mesmo (WHITTEMORE, 1995).

As soluções de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram preparadas a partir de uma solução estoque de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% (Merck, Alemanha) nas concentrações de 10 µmol L<sup>-1</sup> e 30 µmol L<sup>-1</sup> em meio neurobasal suplementado (*L*-glutamina e Penicilina 10.000 U: Estreptomicina 10 mg mL<sup>-1</sup> de NaCl 0,9%). Para isto, a concentração molar da solução de estoque de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi determinada por absorbância no momento imediatamente anterior ao preparo das diluições.

Após o tempo de incubação com as amostras de hemolinfa e frações, o sobrenadante foi removido dos poços de cultivo e foram acrescidos 200 µL das soluções de 10 µmol L<sup>-1</sup> e 30 µmol L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nos poços definidos no desenho experimental. As microplacas foram então incubadas por 30 min (37°C, 5% de CO<sub>2</sub>). Em seguida, o sobrenadante dos poços tratados com as soluções de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi removido e substituído pela solução de MTT, para o ensaio de viabilidade celular.

### **3.10 Determinação da viabilidade celular pelo método de redução do MTT**

Para a determinação da viabilidade por este método, foram plaqueadas 5.10<sup>4</sup> células/poço em microplacas de 96 poços. Foram utilizadas culturas primárias de células hipocampais, no 7º dias de cultivo.

Primeiramente, o sobrenadante foi substituído por 200  $\mu\text{L}$  de meio de cultura contendo os tratamentos estudados e controles, por 1 e 24 h. Após transcorridos os tempos de incubação, o sobrenadante foi completamente removido. Em seguida, foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de solução de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio 0,5  $\text{mg mL}^{-1}$  (MTT - *Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide*) [MTT (98% - Sigma-Aldrich Co., EUA) 5  $\text{mg mL}^{-1}$  dissolvido em *PBS* 1 $\times$  e posteriormente diluído na proporção 1:10 em meio neurobasal suplementado] e as placas foram incubadas por 3 h (37°C, 5% de  $\text{CO}_2$ ). Esta etapa e as subsequentes foram realizadas ao abrigo da luz.

Findo o período de incubação com a solução de MTT, o sobrenadante foi completamente removido e foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de dimetilsulfóxido P.A. (DMSO - Synth<sup>®</sup>, Brasil), inclusive nos poços referentes ao Branco. As placas foram então submetidas à agitação plana em misturador térmico *Thermomixer compact* (Eppendorf, Alemanha) durante 5 min (300 rpm, 37°C). Após a leitura espectrofotométrica foi efetuada em leitor de microplacas *Synergy H1 Hybrid Reader* (Biotek Instruments Inc., EUA) equipado com software *Gen5*, a 570 nm.

O ensaio do sal tetrazólio MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazólio) consiste de um método para a medida da proliferação celular e citotoxicidade utilizado há algumas décadas, que se baseia principalmente na atividade mitocondrial. Células metabolicamente ativas ou viáveis tem a capacidade de clivar o MTT. Enzimas redutases mitocondriais das células viáveis reduzem o composto amarelo (sal tetrazólio MTT) a cristais de formazan, um produto roxo, para os quais a absorvância pode ser medida a 570 nm. A quantificação de formazan por sua vez, pode ser diretamente correlacionada com o número de células viáveis (MOSMANN, 1983; LIU *et al.*, 1997).

### **3.11 Análise Estatística**

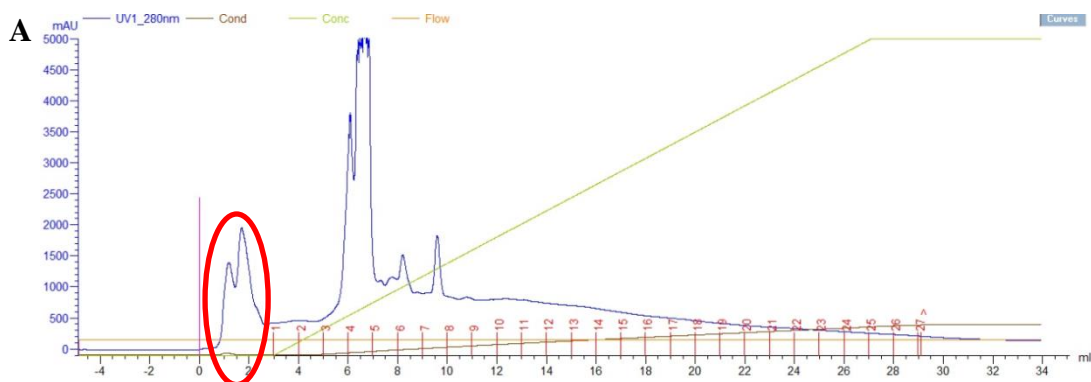
Os resultados foram analisados por Análise de Variância (ANOVA), seguida de pós-teste de múltiplas comparações de Newman-Keuls. Foram consideradas estatisticamente significativas as diferenças com  $p \leq 0,05$ . A análise estatística foi efetuada em software GraphPad Prism 5.0.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

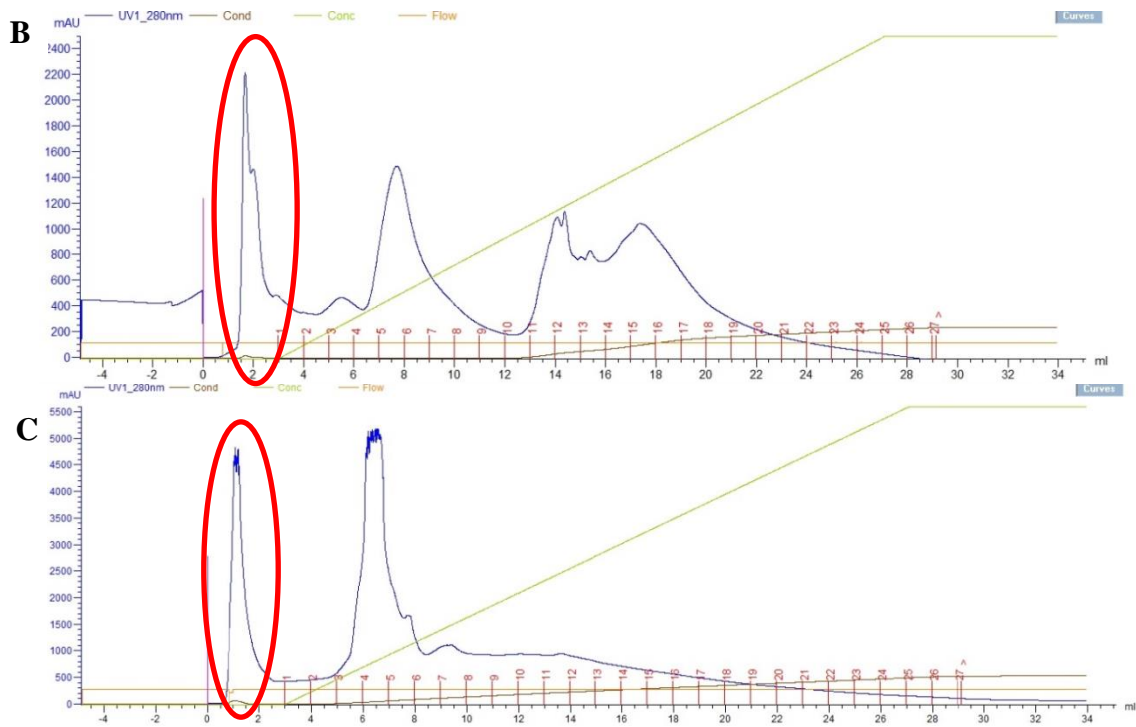
### 4.1 Fracionamento da Hemolinfa

Os cromatogramas de absorvância apresentados na **Figura 15** indicam os perfis do fracionamento de hemolinfa dos diferentes lotes. Dessa forma, experimentalmente obtiveram-se 11 frações para o Lote 1, 12 para o Lote 2 e 7 para o Lote 3, as quais foram armazenadas congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$ , individualmente e separadas por lote de amostra.

Teve-se como primeiro intuito obter a fração cromatográfica que apresentou atividade antiapoptótica conforme já descrito por SOUZA *et al.*, (2005). A atividade em questão foi previamente atribuída a uma proteína de aproximadamente 51 kDa, isolada a partir da primeira fração eluída antes do gradiente de NaCl, em corrida cromatográfica com coluna *Resource Q* (SOUZA *et al.*, 2005). Isto se deve ao fato de que as proteínas da referida fração apresentam um pI de 6,7 (MARTINS, 2011) e, possuindo carga quase neutra, não apresentam afinidade de ligação pela coluna cromatográfica, fazendo com que eluam antecipadamente em relação a outras proteínas eletricamente carregadas da amostra.







**Figura 15.** Cromatogramas de troca aniônica de hemolinfa (0,5 mL) de lagartas de *L. obliqua*. A: Lote 1; B: Lote 2; C: Lote 3. Sistema de cromatografia líquida de alta resolução Äkta Purifier; coluna Resource Q; software Unicorn 4.0. Eluição com Tris-HCl 20 mmol L<sup>-1</sup>, NaCl 1 mol L<sup>-1</sup> (gradiente linear 0-100%) e fluxo de 0,5 mL min<sup>-1</sup>. As regiões indicadas pelas elipses em vermelho indicam os picos correspondentes a eluição das frações que teoricamente contêm a proteína de interesse.

A proteína antiapoptótica identificada por Souza *et al.* (2005) difere em massa molecular daquelas relacionadas ao efeito inibitório sobre a apoptose encontradas no bicho da seda (*Bombyx mori* Linnaeus, 1758), que apresentam 30 K (CHOI *et al.*, 2002; KIM *et al.*, 2001; RHEE *et al.*, 2013).

Após a separação cromatográfica optou-se por pesquisar a atividade antiapoptótica a partir da utilização da fração ativa descrita no método de separação empregado por SOUZA *et al.* (2005). Ainda, a fração oriunda do lote 3 de hemolinfa foi a eleita para os testes nas culturas celulares, devido à mesma apresentar a maior intensidade dos picos do cromatograma na região da fração descrita como ativa, conforme demonstrado na **Figura 15**.

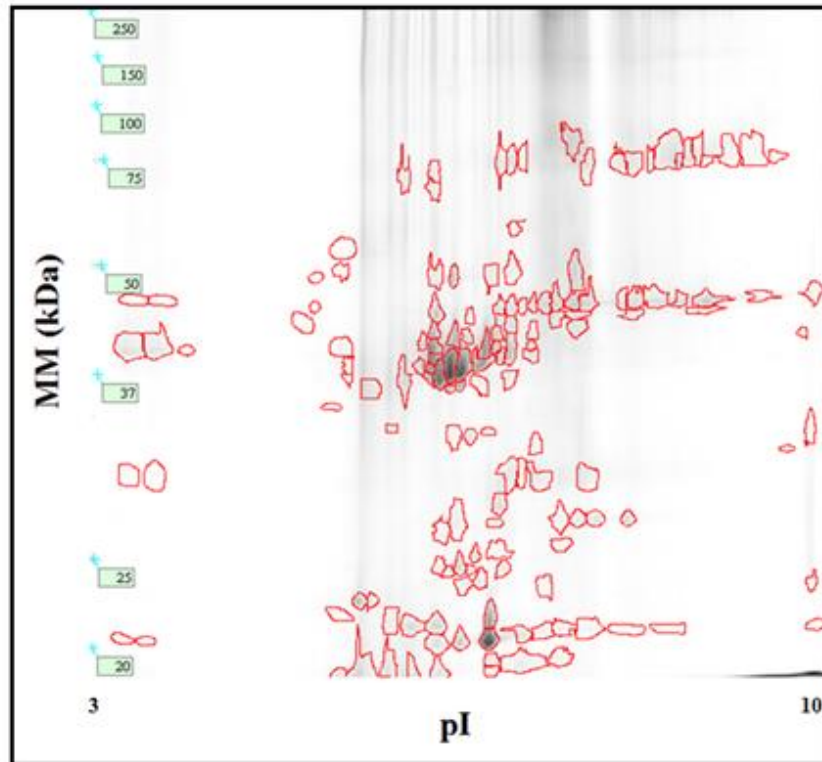
A hemolinfa extraída de insetos do gênero *Lonomia* é caracterizada por uma mistura complexa de proteínas (VEIGA *et al.*, 2005; RICCI-SILVA *et al.*, 2008; TERRA, 2010). Desta forma, o fracionamento das amostras permite que grupos menores de compostos sejam avaliados em relação à atividade biológica e composição química. Sendo assim, estratégias de purificação permitem uma aproximação maior do composto ativo, favorecendo sua identificação e minimizando interferências.

Estratégias distintas baseadas nas propriedades das proteínas podem ser empregadas para esta finalidade, mas as principais são direcionadas a promover a separação pelas diferenças de massa molecular e carga elétrica das proteínas. As abordagens utilizadas para a identificação proteica isoladamente diferem daquelas usadas na investigação de atividades biológicas em que se deseja atribuir propriedades a um composto. Isto é devido ao fato de que esta última tem que garantir a recuperação e integridade da amostra, sem prejuízo de atividade, enquanto pode valer-se de técnicas destrutivas da amostra quando o objetivo é apenas a identificação de compostos. Neste sentido, as cromatografias de gel filtração (separação por massa molecular) e de troca iônica (separação por força iônica) vêm sendo empregadas no fracionamento de amostras provenientes de lagartas de *Lonomia* (VIEIRA *et al.*, 2010; GRECO *et al.*, 2009; MENDONÇA *et al.*, 2008; ALVAREZ-FLORES *et al.*, 2006; SOUZA *et al.*, 2005; PINTO *et al.*, 2004; REIS *et al.*, 2001b).

#### **4.2 Perfil proteico da hemolinfa bruta em Eletroforese Bidimensional**

A hemolinfa bruta foi submetida à eletroforese bidimensional em gel de acrilamida, em condições redutoras, para verificação do perfil proteico apresentado. Desta forma, foram obtidas proteínas entre a faixa de pH de 3 a 10, concentradas com uma maior intensidade nas

faixas de 37 a 50 e 20 a 25 kDa. A **Figura 16** apresenta o gel 2D obtido para a hemolinfa sob condições redutoras.



**Figura 16.** Gel de eletroforese bidimensional de hemolinfa de lagartas de *L. obliqua*. Coloração por Coomassie coloidal; 100 µg de proteínas aplicados; Condições redutoras.

O emprego desta técnica foi realizado na intenção de fornecer uma visão geral do perfil das proteínas encontradas na hemolinfa utilizada, de modo a auxiliar na escolha dos parâmetros a serem utilizados nas técnicas de fracionamento cromatográfico.

Ricci-Silva *et al.* (2008) verificaram em extrato de cerdas, por meio de eletroforese bidimensional e revelação imunológica (*immunoblotting*), 153 *spots* em condições não redutoras em uma faixa de pH de 3 a 10. A partir do sequenciamento por espectrometria de massas de 24 destes *spots*, identificaram proteínas da cutícula, lipocalinas e serpinas, sendo que a família das lipocalinas, e em especial diferentes isoformas de *Lopap* foram as mais abundantes. Os autores verificaram proteínas com massas menores que 10 até 105 kDa e um

perfil complexo de distribuição de pI, onde a maior parte apresentou características ácido-neutras, com  $4 < pI < 7$  e apenas 9 *spots* com características alcalinas. Os resultados obtidos para o perfil eletroforético da hemolinfa no presente estudo se assemelham àqueles encontrados por Ricci-Silva *et al.* (2008) com o extrato de cerdas, já que a maior parte das proteínas também apresentou características ácido-neutras, que tendem à aproximação do pH fisiológico de humanos. Esta característica pode estar relacionada com a atividade enzimática observada nos envenenamentos.

Condições redutoras obtidas com o emprego de DTT podem produzir o deslocamento das proteínas em relação a sua massa molecular, já que este agente rompe a estrutura terciária das cadeias polipeptídicas levando a uma alteração das propriedades hidrodinâmicas das moléculas, podendo levar a uma migração eletroforética mais lenta (RICCI-SILVA *et al.*, 2008).

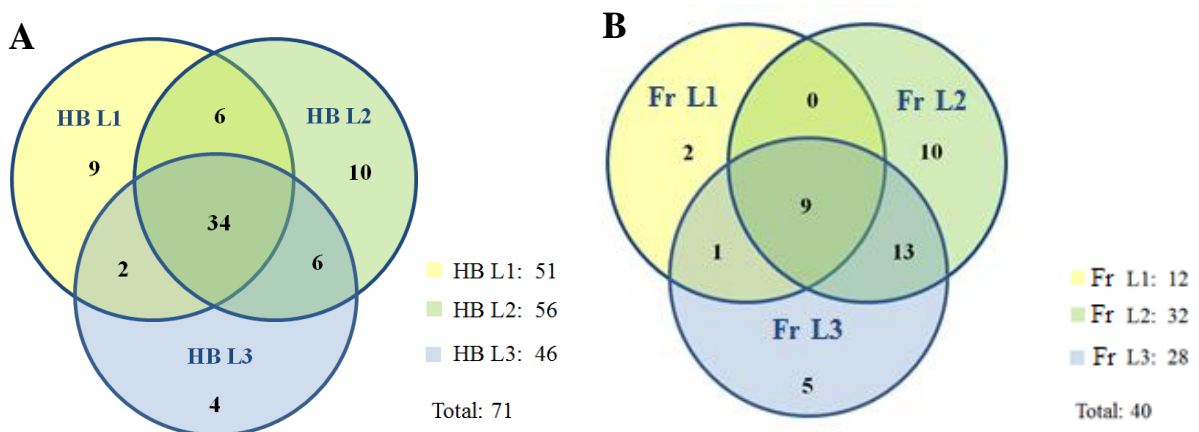
Se o propósito for a identificação das proteínas no gel, abordagens futuras poderiam empregar intervalos de pH mais estreitos, entre 4 e 7, de forma a obter uma melhor separação das proteínas.

### **4.3 Proteínas identificadas a partir da abordagem *Shotgun***

Um total de 71 proteínas pôde ser identificado nas amostras de hemolinfa, sendo que os três lotes compartilhavam 34 delas. O Lote 1 apresentou 51 proteínas totais, sendo 9 exclusivas em relação aos outros lotes e 2 compartilhadas com o Lote 3 e 6 com o Lote 1. No Lote 2 foram encontradas 56 proteínas, das quais 10 foram exclusivas e 6 foram comuns ao Lote 1 e 6 ao lote 3. O Lote 3 apresentou um total de 46 proteínas, onde 4 delas foram exclusivas, 2 foram encontradas também no Lote 1 e 6 no Lote 2.

Em relação às frações, foram encontradas 40 proteínas no total, sendo 9 comuns aos 3 lotes. O Lote 1 apresentou 12 proteínas, sendo 2 exclusivamente e 1 compartilhada com o Lote 3, mas nenhuma com o Lote 2. Já o Lote 2 teve 32 proteínas identificadas, das quais 10 foram exclusivas e 13 compartilhadas com o Lote 3 e nenhuma com o Lote 2. No Lote 3 foram encontradas 28 proteínas, entre as quais 5 foram exclusivas, 13 em comum com o Lote 2 e 1 com o Lote 1.

Considerando as amostras de hemolinfa e fração, um total de 76 proteínas diferentes foi identificado: 71 na hemolinfa e 40 nas frações, sendo 34 em comum entre as duas amostras, 5 identificadas apenas nas frações e 36 apenas na hemolinfa. Devido à complexidade da amostra de hemolinfa, as proteínas que não foram identificadas na mesma, mas foram encontradas nas frações, podem ser explicadas pelo fato de que devido ao maior número de proteínas presentes na hemolinfa bruta, um número proporcionalmente maior de peptídeos foi gerado. Na **Figura 17** é apresentado o número de proteínas identificadas na hemolinfa e frações.



**Figura 17.** Diagrama de Venn demonstrando o número de proteínas identificadas. A: na hemolinfa bruta (HB) e B: na fração (Fr) de *L. obliqua* dos diferentes lotes e as proteínas comuns e não comuns entre eles. (Pattern Lab for Proteomics - NCBI; entradas para *Lonomia*; FDR = 1%). L: Lotes 1-3

Na **Tabela 6** são apresentadas as proteínas identificadas nas frações e hemolinfa de cada lote de amostra. Informações adicionais são encontradas nas tabelas do Apêndice A.

**Tabela 6.** Proteínas identificadas nas amostras de hemolinfa bruta e frações por meio de abordagem *shotgun*.

	<b>Proteína</b>	<b>FL1</b>	<b>FL2</b>	<b>FL3</b>	<b>HB L1</b>	<b>HB L2</b>	<b>HB L3</b>
1	Proteína antiviral putativa [LO]	X	X	X	X	X	X
2	Hemolina [LO] (ABF21073.1)	X	X	X	X	X	X
3	Hemolina [LO] (ABF21071.1)	X	X	X	X	X	X
4	Hemolina [LO] (ABF21070.1)	X	X	X	X	X	X
5	Achelase I (proteínase fibrinolítica) [LA]	X	X	X	X	X	X
6	Inibidor de protease 7 [LO]	X	X	X	X	X	X
7	Inibidor de serino protease 3/4 (Serpina - 3/4) [LO]	X	X	X	X	X	X
8	Precursor de cistatina putativo 1 [LO]	X	X	X	X	X	X
9	Lipocalina 1 [LO]	X	X	X	X	X	X
10	Proteína de defesa putativa 1 (DFP-1) [LO]		X	X	X	X	X
11	Proteína sensorial 1 [LO]		X	X	X	X	X
12	Fator ativador de profenoloxidase 1 (parcial) [LO]		X	X	X	X	X
13	Inibidor de serino protease 4 (parcial) [LO]		X	X	X	X	X
14	Proteína do tipo esterase 1 [LO]		X	X	X	X	X
15	Proteína hipotética 12 (parcial) [LO]		X	X	X	X	X
16	Hemolina [LO] (ABF21072.1)		X	X	X	X	
17	Proteína hipotética 13 [LO]		X		X	X	X
18	Proteína sensorial 2 [LO]		X	X		X	X
19	Proteína de choque térmico 4 [LO]			X	X	X	X
20	Achelase II (proteínase fibrinolítica) [LA]	X		X	X		X
21	Fator de alongamento 1 [LO]	X			X	X	X
22	Proteína hipotética 22 (parcial) [LO]	X			X	X	X
23	Proteína hipotética 31 [LO]		X		X	X	X
24	Proteína desconhecida 3		X	X	X	X	X
25	Cisteíno peptidase 2 do tipo catepsina-B [LO]		X	X		X	X
26	Lectina 5 [LO]		X		X	X	X
27	Proteína do tipo serino protease putativa 2 [LO]		X		X	X	X
28	Tropomiosina 1 [LO]			X		X	X
29	Lopap (Lipocalina-1/4; Ativador de Protrombina)			X			X
30	Ferritina 1 [LO]		X			X	X
31	Lipocalina 4 [LO]		X	X		X	
32	Proteína hipotética 38 [LO]		X	X		X	
33	Proteína desconhecida 4		X		X	X	
34	Inibidor de protease putativo 4 [LO]		X			X	
35	Serino protease 7 [LO]		X			X	
36	Proteína hipotética 4 [LO]		X				

37	Proteína hipotética 21 (parcial) [LO]	X			
38	Proteína desconhecida 6	X			
39	Inibidor de protease 6 [LO]		X		
40	Ativador de protrombina [LO]		X		
41	Actina 1 [LO]		X	X	X
42	Proteína ribossomal 7 [LO]		X	X	X
43	Serpina 1 [LO]		X	X	X
44	Serpina 2 [LO]		X	X	X
45	Lectina 3 [LO]		X	X	X
46	Proteína hipotética 2 [LO]		X	X	X
47	Proteína hipotética 3 [LO]		X	X	X
48	Proteína hipotética 10 (parcial) [LO]		X	X	X
49	Proteína hipotética 11 (parcial) [LO]		X	X	X
50	Homólogo da proteína tumoral traducionalmente controlada (TCTP) [LO]		X	X	X
51	Cisteíno peptidase 1 do tipo catepsina-L (parcial) [LO]		X	X	X
52	Cadeia leve da miosina 1 [LO]		X	X	
53	Lectina 1 imunolectina putative [LO]		X	X	
54	Proteína hipotética 9 (parcial) [LO]		X	X	
55	Proteína hipotética 23 (parcial) [LO]		X	X	
56	Proteína LIM 1 [LO]		X		X
57	Serino protease 4 (parcial) [LO]			X	X
58	Inibidor de protease 1 [LO]			X	X
59	Proteína de choque térmico 1 [LO]		X		
60	Proteína de choque térmico 3 [LO]		X		
61	Proteína ribossomal 4 [LO]		X		
62	Proteína ribossomal 5 [LO]		X		
63	Proteína ribossomal 11 (subunidade maior) [LO]		X		
64	Proteína ribossomal subunidade S19 [LO]		X		
65	Serino protease 1 [LO]		X		
66	Lectina 4 tipo C [LO]		X		
67	Proteína hipotética 7 (parcial) [LO]		X		
68	Proteína da cutícula 1 [LO]			X	
69	Proteína da cutícula 4 [LO]			X	
70	Serino protease 6 [LO]			X	
71	Inibidor de protease 5 (parcial) [LO]			X	
72	Proteína hipotética [LO]			X	
73	Peptídeo putativo secretado 30 [LO]			X	
74	Serino protease 3 [LA]				X
75	Proteína dopa-decarboxilase putativa (parcial) [LA] (ABW39097.1)				X
76	Proteína dopa-decarboxilase putativa (parcial) [LA] (ABW39098.1)				X

F L1-3: Frações dos lotes 1, 2 ou 3. HB L1-3: Hemolinfa bruta dos lotes 1, 2 ou 3. LA: *Lonomia achelous*; LO: *Lonomia obliqua*.

O *scan* dos peptídeos ocorre em ciclos de 30 s e apenas os 8 mais intensos são selecionados para a fragmentação (aquisição dependente de dados). Sem uma separação prévia mais efetiva, na amostra bruta mais peptídeos podem concorrer para a seleção da fragmentação dentro de um mesmo ciclo de aquisição, e assim, o sinal de peptídeos com menor intensidade pode ser suprimido em detrimento de outros, prejudicando desta forma sua identificação. Corridas cromatográficas *online* com gradientes mais longos podem auxiliar a minimizar essa limitação, porém a extensão do gradiente de separação resulta em alargamento dos picos, com diminuição da intensidade, em razão da diminuição da concentração da amostra. Grande parte de estudos de proteomas são realizados em gradientes de 60 a 90 min, todavia, a extensão dos gradientes permite um aumento do número de eventos *MS2* (fragmentações) e conseqüentemente uma ampliação do número de identificações, possibilitando o sequenciamento de novos peptídeos. Um maior tempo de separação possibilita uma menor chance de co-eluição de peptídeos (efeito de supressão de íons), com aumento da intensidade dos picos e maior sensibilidade de detecção, favorecendo que peptídeos menos abundantes e presentes em menores concentrações sejam identificados (RESENDE, 2013). Partindo deste princípio, as amostras das frações, caracterizadas por já apresentarem separação prévia pelo fracionamento cromatográfico anterior, foram submetidas a uma análise com um gradiente de 120 min, enquanto a hemolinfa bruta, com uma complexidade esperada da mistura maior, foi analisada em um gradiente de 360 min.

Etapas de purificação das amostras como o fracionamento cromatográfico prévio também consistem uma estratégia neste mesmo sentido. Deste modo, a cromatografia de troca iônica a que foi submetida a hemolinfa bruta para a obtenção das frações permitiu que 5 proteínas fossem identificadas apenas nas frações, evidenciando esta vantagem. Na hemolinfa foram identificadas 36 proteínas que não foram encontradas nas frações, porém, para este



estudo, foi utilizada apenas uma fração cromatográfica de cada lote, portanto, se analisadas as demais frações, contemplando a totalidade do fracionamento da amostra, haveria a possibilidade de serem identificadas proteínas adicionais, além destas.

A **Tabela 7** demonstra as quantidades das proteínas identificadas de cada amostra neste estudo, com base nas contagens espectrais, onde a abundância das mesmas é apresentada em escala de cor que vai do verde ao vermelho.

**Tabela 7.** Heat map demonstrando a abundância das proteínas com base na contagem espectral.

Proteína	FL1	FL2	FL3	HB L1	HB L2	HB L3
Proteína antiviral putativa [LO]	10	487	154	575	2.694	913
Proteína de defesa putativa 1(DFP-1) [LO]	0	141	28	11	81	15
Proteína de choque térmico 1 [LO]	0	0	0	16	0	0
Proteína de choque térmico 3 [LO]	0	0	0	28	0	0
Proteína de choque térmico 4 [LO]	0	0	74	368	97	54
Proteína sensorial 1 [LO]	0	131	187	67	96	36
Proteína sensorial 2 [LO]	0	7	18	0	8	5
Hemolina [LO] (ABF21073.1)	204	569	601	61	423	154
Hemolina [LO] (ABF21071.1)	176	733	482	78	589	204
Hemolina [LO] (ABF21070.1)	196	604	571	98	402	153
Hemolina [LO] (ABF21072.1)	0	561	595	97	409	0
Actina 1 [LO]	0	0	0	84	85	32
Cadeia leve da miosina 1 [LO]	0	0	0	4	4	0
Tropomiosina 1 [LO]	0	0	6	0	10	3
Fator de alongamento 1 [LO]	5	0	0	59	34	5
Ferritina 1 [LO]	0	5	0	0	6	20
Proteína ribossomal 4 [LO]	0	0	0	3	0	0
Proteína ribossomal 5 [LO]	0	0	0	3	0	0
Proteína ribossomal 7 [LO]	0	0	0	13	4	5
Proteína ribossomal 11 (subunidade maior) [LO]	0	0	0	2	0	0
Proteína ribossomal subunidade S19 [LO]	0	0	0	5	0	0
Proteína da cutícula 1 [LO]	0	0	0	0	4	0
Proteína da cutícula 4 [LO]	0	0	0	0	7	0
Proteína LIM 1 [LO]	0	0	0	3	0	3
Serino protease 1 [LO]	0	0	0	5	0	0
Proteína do tipo serino protease putativa 2 [LO]	0	27	0	22	34	50
Serino protease 3 [LA]	0	0	0	0	0	6
Serino protease 4 (parcial) [LO]	0	0	0	0	9	20

Serino protease 6 [LO]	0	0	0	0	3	0
Serino protease 7 [LO]	0	4	0	0	8	0
Achelase I (proteínase fibrinolítica) [LA]	15	7	137	20	29	156
Achelase II (proteínase fibrinolítica) [LA]	3	0	97	7	0	61
Fator ativador de profenoloxidase 1 (parcial) [LO]	0	12	172	100	123	189
Inibidor de protease 1 [LO]	0	0	0	0	2	8
Inibidor de serino protease 3/4 (Serpina - 3/4) [LO]	13	246	106	140	359	154
Inibidor de serino protease 4 (parcial) [LO]	0	241	156	136	363	160
Inibidor de protease putativo 4 [LO]	0	18	0	0	11	0
Inibidor de protease 5 (parcial) [LO]	0	0	0	0	1	0
Inibidor de protease 6 [LO]	0	0	1	0	0	0
Inibidor de protease 7 [LO]	13	13	42	6	33	9
Serpina 1 [LO]	0	0	0	33	54	34
Serpina 2 [LO]	0	0	0	32	47	33
Precursor de cistatina putativo 1 [LO]	2	58	40	36	124	106
Lipocalina 1 [LO]	6	1.148	1.026	574	914	424
Lipocalina 4 [LO]	0	909	808	0	757	0
Lopap (Lipocalina-1/4; Ativador de Protrombina)	0	0	1.025	0	0	415
Lectina 1 imunolectina putative [LO]	0	0	0	3	3	0
Lectina 3 [LO]	0	0	0	2	3	12
Lectina 4 tipo C [LO]	0	0	0	6	0	0
Lectina 5 [LO]	0	10	0	9	7	6
Proteína hipotética [LO]	0	0	0	0	4	0
Proteína hipotética 2 [LO]	0	0	0	38	10	3
Proteína hipotética 3 [LO]	0	0	0	32	33	46
Proteína hipotética 4 [LO]	0	4	0	0	0	0
Proteína hipotética 7 (parcial) [LO]	0	0	0	3	0	0
Proteína hipotética 9 (parcial) [LO]	0	0	0	15	6	0
Proteína hipotética 10 (parcial) [LO]	0	0	0	33	65	1
Proteína hipotética 11 (parcial) [LO]	0	0	0	44	12	2
Proteína hipotética 12 (parcial) [LO]	0	3	7	9	18	10
Proteína hipotética 13 [LO]	0	2	0	333	103	46
Proteína hipotética 21 (parcial) [LO]	0	3	0	0	0	0
Proteína hipotética 22 (parcial) [LO]	2	0	0	39	745	51
Proteína hipotética 23 (parcial) [LO]	0	0	0	9	9	0
Proteína hipotética 31 [LO]	0	49	0	307	502	421
Proteína hipotética 38 [LO]	0	3	7	0	11	0
Proteína desconhecida 3	0	2	3	3	7	7
Proteína desconhecida 4	0	4	0	1	3	0
Proteína desconhecida 6	0	1	0	0	0	0
Ativador de protrombina [LO]	0	0	890	0	0	0
Peptídeo putativo secretado 30 [LO]	0	0	0	0	28	0
Homólogo da proteína tumoral traducionalmente controlada (TCTP) [LO]	0	0	0	72	19	38

Proteína do tipo esterase 1 [LO]	0	5	11	4	7	8
Cisteíno peptidase 1 do tipo catepsina-L (parcial) [LO]	0	0	0	6	6	4
Cisteíno peptidase 2 do tipo catepsina-B [LO]	0	7	25	0	15	12
Proteína dopa-decarboxilase putativa (parcial) [LA] (ABW39097.1)	0	0	0	0	0	11
Proteína dopa-decarboxilase putativa (parcial) [LA] (ABW39098.1)	0	0	0	0	0	5

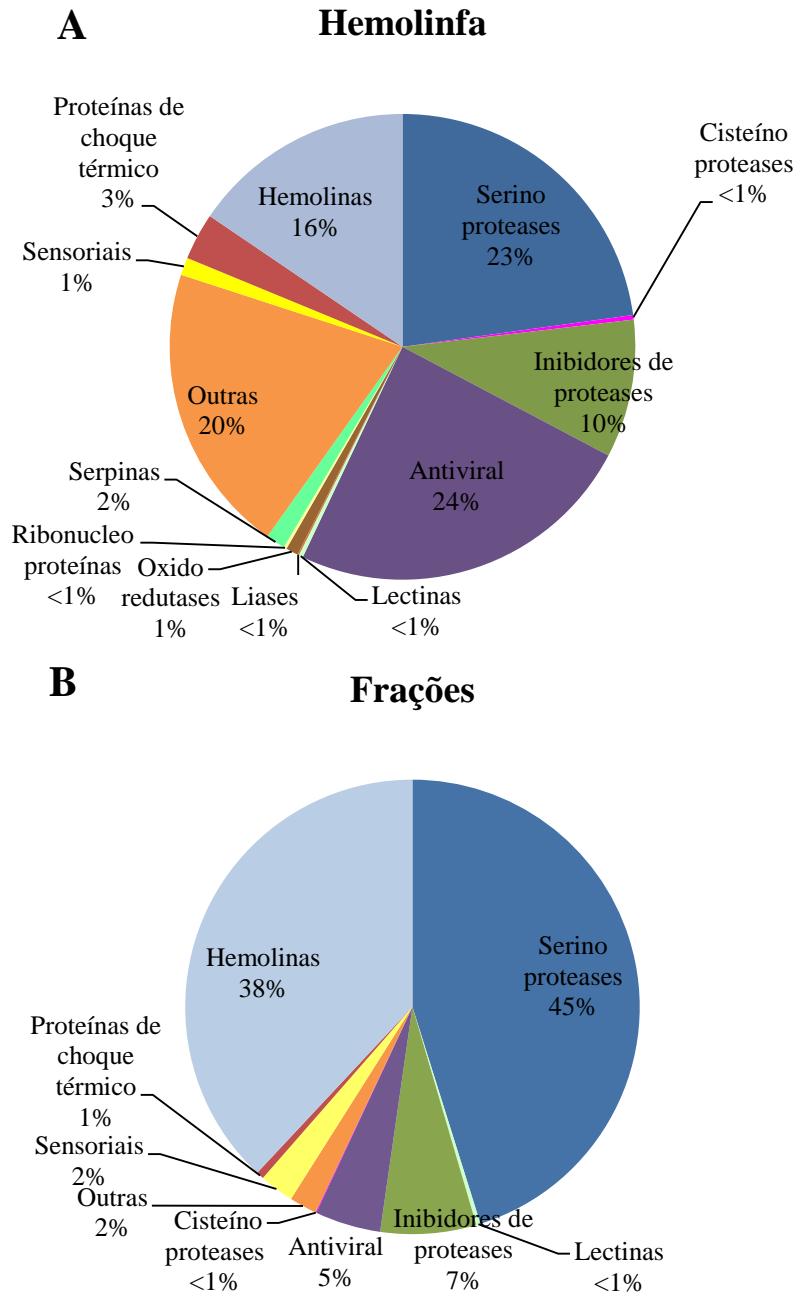
F L1-3: Frações dos lotes 1, 2 ou 3. HB L1-3: Hemolinfa bruta dos lotes 1, 2 ou 3. LA: *Lonomia achelous*; LO: *Lonomia obliqua*. Os valores marcados em verde representam as proteínas ausentes, em amarelo as menos abundantes, em vermelho as mais abundantes, e em tons de intensidade crescente entre o amarelo, laranja e vermelho as de abundância intermediária, das com menor para as de maior abundância, respectivamente.

Quanto maior a abundância de uma proteína em uma amostra, maior o número de peptídeos da mesma que serão produzidos a partir da digestão proteolítica. Sendo assim, peptídeos em maior quantidade na amostra foram selecionados para MS2 com maior frequência, gerando um maior número de contagens espectrais. Desta forma, as contagens espectrais permitem uma quantificação sem marcadores (*label free*) e o número de contagens espectrais para cada proteína é proporcional à abundância da mesma na amostra (LIU *et al.*, 2004). Na abordagem *label free*, cada amostra é analisada em aquisições LC-MS/MS individuais e a abundância dos peptídeos é então alinhada entre as diferentes corridas cromatográficas, já que um mesmo peptídeo poderá não estar presente em um mesmo *scan MS1* em corridas distintas, produzindo discrepâncias nos tempos de retenção.

No presente estudo, foram identificadas predominantemente na fração cromatográfica serino proteases (45%) e hemolinas (38%), seguidas por inibidores de proteases (7%) e proteína antiviral (5%). Proteínas sensoriais, proteínas do choque térmico, cisteíno proteases e lectinas, entre outras também foram identificadas, de forma menos expressiva.

Em relação à hemolinfa, foi identificada a predominância da proteína antiviral (24%) e de serino proteases (23%), seguidas por hemolinas (16%) e inibidores de proteases (10%). Com menor representatividade, também foram identificadas proteínas do choque térmico,

serpinas, proteínas sensoriais, oxidoredutases, lectinas, liases e ribonucleases. Ainda, outras proteínas representaram em conjunto 20% do total, e referem-se de forma geral a proteínas estruturais ou envolvidas em funções metabólicas. Na **Figura 18** a distribuição dos grupos de proteínas identificados na hemolinfa e frações é apresentada.



**Figura 18.** Distribuição das proteínas identificadas nas amostras de A: Hemolinfa e B: Frações, por *shotgun*. Semi-quantificação baseada no número de contagens espectrais.

Neste estudo, destaca-se a representatividade da presença das hemolinas, que são relacionadas ao sistema imune e ao desenvolvimento dos lepidópteros. Estas proteínas são capazes de ligar lipopolissacarídeos, sendo reguladas para cima na hemolinfa durante infecções do inseto, bem como durante a metamorfose (ALVAREZ-FLORES *et al.*, 2011). Serino proteases e inibidores de proteases estão entre as proteínas de caráter majoritário, concordando com os achados de Terra (2010).

A criação do banco de dados foi uma estratégia usada para reduzir o espaço de busca e otimizar o processo de identificação de proteínas, assim, este foi construído a partir das entradas para o gênero “*Lonomia*” no *NCBI* (RESENDE, 2013).

Na quantificação por abordagem *label free*, a normalização dos dados é importante para que interferências oriundas de variabilidades técnicas como instabilidade do *electrospray*, supressão iônica de amostras, alterações do enchimento de íons do *orbitrap*, entre outras, sejam minimizadas e não afetem significativamente o resultado.

Os organismos de *L. obliqua* não possuem genoma sequenciado e os dados de sequências de aminoácidos das proteínas encontrados nos bancos de dados são provenientes principalmente de estudos transcriptômicos (VEIGA *et al.*, 2005). Sendo assim, a identificação de proteínas em amostras do inseto por abordagem *shotgun* é prejudicada pela limitada abrangência dos dados contidos nos bancos de dados para esta espécie.

Não há uma definição formal ou consenso que esclareça as diferenças entre proteínas hipotéticas, putativas e desconhecidas, mas assume-se que as primeiras retratam sequências de aminoácidos para as quais não há prova experimental de que realmente constituam proteínas, enquanto que as putativas sejam reconhecidamente proteínas, mas para as quais carece a comprovação experimental de função. Por último, as proteínas desconhecidas compreendem proteínas para as quais não se conhece função (LIBERMAN, 2004).

Na **Tabela 8** são apresentados os perfis de peptídeos e proteínas identificados nas frações e hemolinfa dos diferentes lotes.

**Tabela 8.** Perfil de peptídeos e proteínas identificados por *NanoLC-LQT-Orbitrap* para as frações purificadas e hemolinfa bruta de *L. obliqua*.

	Peptídeos Totais	Peptídeos Únicos	Proteínas Totais
Fração L1	84	50	12
Fração L2	530	309	32
Fração L3	522	305	28
Hemolinfa L1	526	462	51
Hemolinfa L2	830	680	56
Hemolinfa L3	612	504	46

Peptídeos identificados por *Pattern Lab for Proteomics* (NCBI; entradas para *Lonomia*; FDR=1%).

A quantidade de peptídeos únicos inferior à de peptídeos totais refere-se à redundância que ocorre no sequenciamento de peptídeos em muitos *scans* (RESENDE, 2013).

Programas de predição de genes permitem localizar regiões codantes do genoma, cujas sequências proteicas teóricas são depositadas nos bancos de dados públicos como proteínas hipotéticas. Desta forma, numerosas proteínas classificadas como hipotéticas podem ser encontradas, já que a quantidade de sequências identificadas ocorre desproporcionalmente à capacidade de verificação experimental dos dados (LIBERMAN, 2004).

Estudos mais abundantes foram dirigidos ao extrato de cerdas, que contém o veneno produzido pela lagarta e que é injetado nas vítimas. Porém, Terra *et al.* (2010) identificaram que várias proteínas presentes nesta matriz eram comuns àquelas encontradas na hemolinfa desses insetos.

A hemolinfa consiste de um fluido extracelular aquoso, levemente ácido, responsável pelo transporte de hormônios, substratos e produtos finais de catabolismo em insetos. Outras funções, tais como auxiliar na locomoção e fornecer força hidrostática para a manutenção da forma corporal são também conhecidas. Íons inorgânicos, aminoácidos livres, peptídeos bioativos, proteínas e açúcares (principalmente o dissacarídeo trealose) fazem parte das principais substâncias descritas como componentes desta matriz (NATION, 2001).

Dentre as proteínas, estão incluídos diferentes tipos de enzimas, proteínas antifúngicas e antibacterianas, proteínas transportadoras de substâncias hidrofóbicas e outras. Células livres também fazem parte da hemolinfa de insetos e o maior representante destas estruturas são os hemócitos, implicados principalmente em funções imunes (NATION, 2001).

O metabolismo dos órgãos e tecidos destes animais é refletido na hemolinfa que circula entre os mesmos. Sendo assim, alterações metabólicas discretas podem subsidiar adaptações e especializações e podem proporcionar mudanças no conteúdo de proteínas da hemolinfa. O padrão de aminoácidos livres é altamente variável dentro de uma família ou gênero e reflete o balanço entre síntese e degradação destes e também a necessidade de manter o equilíbrio osmótico ou ainda serve como base para a síntese de proteínas (WHITMORE & GILBERT, 1974). Desta forma, sexo, idade, estágio de desenvolvimento, dieta, atividade, entre outros, são fatores que podem determinar celularidade e composição química distintas da hemolinfa.

Em estudo conduzido com *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae), o perfil da composição da hemolinfa mostrou-se alterado significativamente em relação à idade da lagarta, onde a concentração de alguns aminoácidos decresce ao passo que de outros se eleva, demonstrando também alterações quantitativas (ROMAN & JEGOROV, 1991). Whitmore e Gilbert (1974) verificaram que em *Philosamia cynthia* (Lepidoptera: Saturniidae) a

concentração proteica da hemolinfa aumenta com o desenvolvimento larval, mas por outro lado, o conteúdo de proteínas verificado nos adultos é muito inferior àquele relativo à pupa.

Ainda, em termos quantitativos, de uma maneira geral, a concentração de proteínas e aminoácidos livres totais presente na hemolinfa dos lepidópteros foi relacionada como dependente da dieta dos mesmos (ORTELL, 1995).

Variações qualitativas podem ocorrer também no padrão proteico observado durante as etapas de desenvolvimento dos saturnídeos. Proteínas presentes na hemolinfa do estágio larval podem não estar presentes na fase de pupa, bem como algumas da pupa podem não ser encontradas nos insetos adultos. Contudo, podem ser encontradas proteínas comuns entre estes estágios distintos do ciclo biológico (WHITMORE & GILBERT, 1974).

Roman e Jegorov (1991) identificaram ainda a influência da temperatura na composição de aminoácidos da hemolinfa. Os autores verificaram que a exposição a baixas temperaturas de *Galleria mellonella* L., mesmo por curtos períodos, provocou uma rápida alteração, provavelmente devida à capacidade de um ajustamento fisiológico ágil, que permite ao inseto a sobrevivência em situações como um choque frio, onde os aminoácidos poderiam estar relacionados à crioproteção.

Estresse térmico pode gerar também produtos de estresse oxidativo pela alteração do balanço redox em larvas de *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidae). Em resposta, os insetos podem responder com a produção de enzimas antioxidantes e síntese de Hsp70 (*Heat Shock Protein 70*), no intuito de prevenir a apoptose excessiva produzida sob condições de estresse (CUI *et al.*, 2011).

Imediatamente após a coleta, a hemolinfa se apresentou como um fluido amarelo cristalino, que rapidamente escurece, adquirindo coloração verde-escura a marrom-esverdeado. Fato este, provavelmente devido à presença de fenoloxidasas na mesma, como é



comum na maioria dos insetos. Estes compostos atuam principalmente na esclerotinização da cutícula e proteção contra organismos invasores, sendo responsáveis pela conversão de uma variedade de fenóis a quinonas (NATION, 2001).

Os insetos foram coletados em diferentes posições geográficas, da natureza, alimentando-se de espécies vegetais distintas e pertencentes ao mesmo estágio larval. Ainda, os mesmos foram coletados em datas diferentes, fato este que distingue as condições climáticas enfrentadas ao longo do desenvolvimento entre os diferentes lotes. As localizações geográficas diversas podem fornecer exposição a fatores ambientais também diversos e variáveis, como predadores, parasitas, poluentes ambientais, umidade, luminosidade, pressão atmosférica, composição química dos vegetais que lhes servem de alimento, entre outros. Desta forma, a divisão dos animais na obtenção das amostras para análise teve por princípio verificar a hipótese de que estas características podem exercer influência na composição proteica da hemolinfa. Assim, a avaliação dos lotes individualmente mostrou diferenças na composição proteica, que podem indicar relação com os fatores descritos.

O congelamento das lagartas para a coleta da hemolinfa pode ter conferido alguma alteração na composição da hemolinfa, em função da resposta rápida do inseto a este tipo de estímulo. No entanto, considerando que o mesmo tratamento foi dado aos três lotes de amostra, não se espera prejuízo do comparativo. Por outro lado, o congelamento poderia reduzir o estresse da coleta em relação ao procedimento no animal vivo, pela atividade enzimática ser reduzida a baixas temperaturas.

Em estudo desenvolvido por Terra *et al.* (2010), os inibidores de proteases foram as proteínas predominantes encontradas na hemolinfa de lagartas de 6º instar de *L. obliqua*, representando 62% das proteínas totais, seguido pelas serino proteases com 36%, lipocalinas e lecitinas com 1% cada e melaloproteases, presentes em quantidade inferior a 1%. Os autores

compararam as amostras de hemolinfa e extrato de cerdas, encontrando um perfil similar entre ambas, com o grupo majoritário representado também pelos inibidores de proteases (51%), seguido agora pelas lipocalinas (34%). As serino proteases foram encontradas em quantidade inferior àquela da hemolinfa no extrato de cerdas, representadas por 14% do total. Foram ainda identificadas em menor quantidade metaloproteases (1%), lecitinas, fosfolipases, bloqueadores de canais de cálcio e do tipo fator de coagulação (em quantidade inferior a 1% cada).

Dentre as diversas atividades biológicas encontradas para compostos oriundos de *L. obliqua*, uma delas foi de particular interesse neste trabalho. Entre os estudos que tem evidenciado as propriedades de substâncias provenientes da hemolinfa de insetos está a capacidade de inibirem a apoptose induzida por diferentes indutores, em cultivos celulares de insetos e de mamíferos (RHEE *et al.*, 2013; VIEIRA *et al.*, 2010; MENDONÇA *et al.*, 2008; SOUZA *et al.*, 2005; MARANGA *et al.*, 2003; CHOI *et al.*, 2002; KIM *et al.*, 2001; RHEE & PARK, 2000).

Com base na propriedade antiapoptótica demonstrada anteriormente, relacionada ao fato do aumento da apoptose em células neuronais no envelhecimento e patologias neurodegenerativas, este trabalho buscou verificar a reprodução da referida propriedade em neurônios hipocampais de ratos *in vitro*. Para este propósito, a hemolinfa, caracterizada como uma mistura complexa foi submetida a uma etapa de fracionamento. Deste modo, o objetivo deste procedimento foi obter compostos mais separados a fim de permitir a maior aproximação possível do(s) composto(s) responsável(is) pelo efeito observado.

#### **4.4 Citotoxicidade da Hemolinfa e Fração em Cultivo Primário Hipocampal Embrionário**

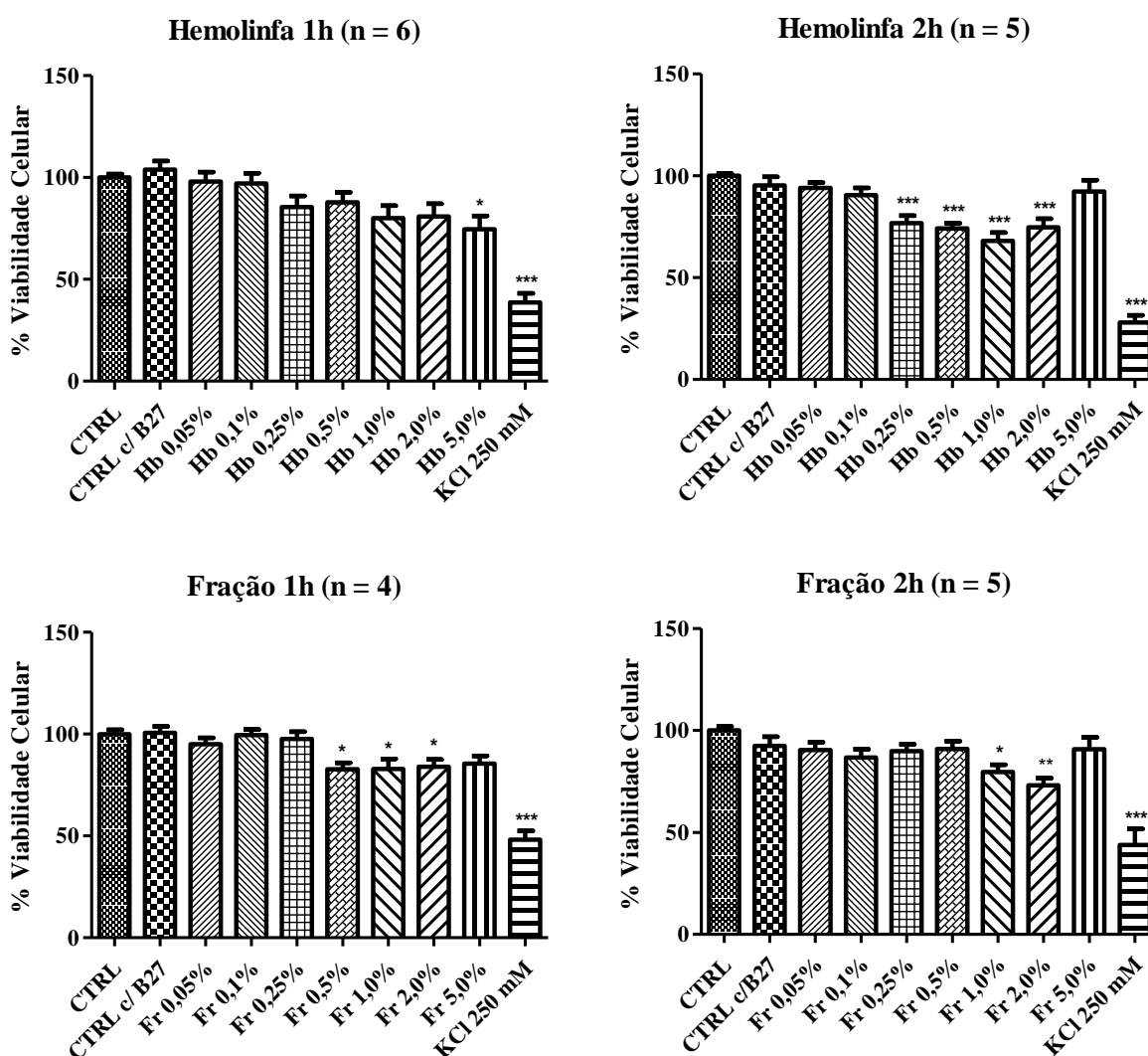
Neste estudo, cultivos primários de células hipocampais foram expostos a diferentes concentrações de Hemolinfa Bruta e de Fração, por diferentes períodos, com o objetivo de determinar se, nas condições testadas, as amostras apresentavam redução da viabilidade celular. O resultado obtido permitiu estabelecer as concentrações e tempos de exposição que não reduziram a viabilidade no tipo celular em estudo quanto ao efeito antiapoptótico.

A hemolinfa bruta produziu redução significativa ( $p < 0,05$ ) do metabolismo mitocondrial em relação ao controle após exposição por 1 h na concentração de 5%, ao passo que esta redução foi maior ( $p < 0,001$ ) para as concentrações de 0,25, 0,5, 1,0 e 2,0% quando o tempo de exposição foi de 2 h.

Já a fração purificada ocasionou redução significativa ( $p < 0,05$ ) da viabilidade celular em relação ao controle nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0% na exposição por 1 h. Após a exposição por 2 h, as concentrações de 1,0 e 2,0% causaram redução significativa de viabilidade ( $p < 0,05$  e  $p < 0,01$  respectivamente).

Diante dos resultados obtidos, as concentrações escolhidas para o tratamento dos cultivos celulares primários hipocampais embrionários neste trabalho foram as de 0,05 e 0,1% (v/v) tanto para hemolinfa bruta, como para fração purificada, já que estas não produziram diferença significativa de viabilidade celular em relação ao controle. A concentração de 1% descrita em estudos anteriores com outros tipos celulares mostrou-se tóxica para células primárias hipocampais com redução significativa da viabilidade celular em relação ao controle.

A **Figura 19** representa o resultado dos ensaios de viabilidade celular pelo método da redução do MTT.

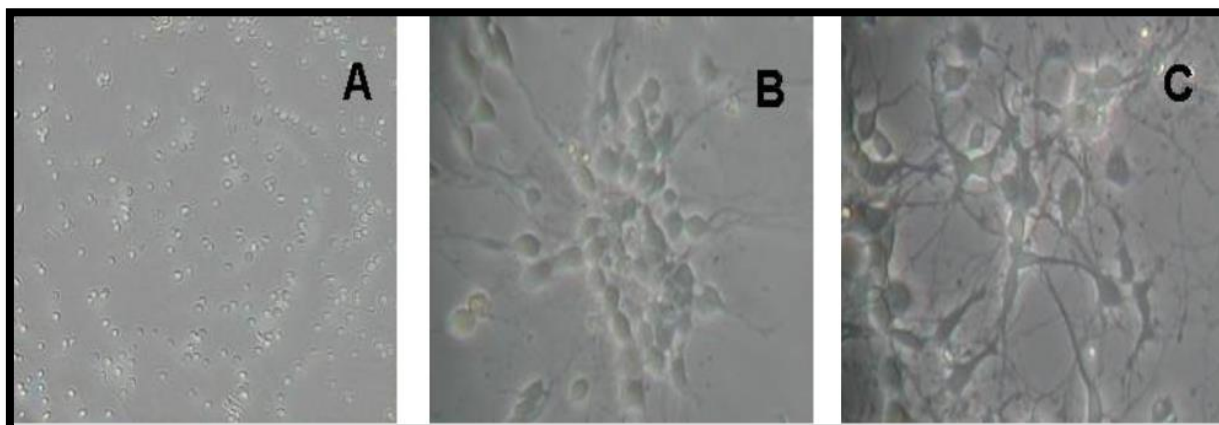


**Figura 19.** Viabilidade celular em diferentes concentrações de hemolinfia bruta e fração purificada pelo método de redução do MTT em cultura primária hipocampal embrionária. CTRL: Controle; Hb: Hemolinfia Bruta; Fr: Fração (ANOVA e comparação múltipla de Newman-Keuls, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  em relação ao controle).

Neurônios isolados em cultura têm sido usados como modelo para a investigação dos mecanismos farmacológicos das ações de toxinas *in vivo* (SILVA *et al.*, 2006). Carvalho *et al.* (2014) utilizaram culturas primárias hipocampais de ratos na avaliação da neurotoxicidade

produzida por fosfolipases do veneno de uma serpente e constataram que a mesma produz morte celular com características mistas de apoptose, necrose e autofagia. Neurotoxicidade em neurônios hipocampais em cultura também foi investigada em estudo por Garcia *et al.* (2012). Os autores verificaram neurotoxicidade em células tratadas com cocaína e um produto de sua pirólise, sendo que o potencial neurotóxico foi maior para este último. A ação neuroprotetora de moléculas também pode ser avaliada em cultivos neuronais hipocampais, como no estudo desenvolvido por He *et al.* (2014) que verificou este efeito com ginsenoside Rg1.

A **Figura 20** apresenta imagens em microscópio de culturas primárias hipocampais embrionárias em diferentes estágios de diferenciação. Os ensaios de viabilidade celular foram desenvolvidos no 7º dia de cultivo, onde pode ser observada a presença de ramificações neuríticas.



**Figura 20.** Células hipocampais embrionárias de ratos em cultura, com diferentes estágios de diferenciação. A: dia 0 de cultivo; B: 3º dia de cultivo; C: 7º dia de cultivo (GARCIA *et al.*, 2012).

Maranga *et al.* (2003) obtiveram concentrações máximas de células viáveis 2 a 3 vezes maiores que o controle quando culturas de células de inseto *Sf-9* foram suplementadas com 1% de hemolinfa (v/v). Os autores testaram concentrações de 1, 2 e 5% (v/v) sendo que a concentração de 5% apresentou efeito tóxico. O efeito antiapoptótico em culturas de células

*Sf-9* obtido por Souza *et al.* (2005) também utilizou a concentração de 1% de hemolinfa. Concentração de 1% ainda foi usada em estudo de suplementação de células CHO-K1, onde da mesma forma a hemolinfa proporcionou efeitos positivos ao cultivo, como aumento da concentração máxima de células e produtividade máxima.

Considerando que neste estudo foram utilizadas culturas celulares primárias, cujas células foram retiradas do ambiente fisiológico e adaptadas para a sobrevivência em cultura por curtos períodos e desta forma mais sensíveis que as linhagens celulares imortalizadas, os cultivos foram testados para concentrações diferentes além das anteriormente descritas quanto à toxicidade da hemolinfa. Ainda, a utilização de células de outra espécie animal e de tecido distinto foi ponderada. O mecanismo pelo qual a hemolinfa exerce seu efeito no aumento e prolongamento da viabilidade celular em cultura ainda não foi completamente esclarecido, de forma que ainda é desconhecida a interação desta com receptores celulares, que podem variar qualitativamente e quantitativamente em inúmeras condições, incluindo tecido de origem, espécie e estímulos do ambiente celular.

#### **4.5 Efeito da Hemolinfa e Fração em células tratadas com peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)**

O metabolismo mitocondrial das células tratadas com hemolinfa bruta 0,05% e 0,1% por 1 h e posteriormente submetidas à indução de apoptose com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 µmol L<sup>-1</sup> foi significativamente reduzido (p<0,01) quando comparado com o controle sem indução de apoptose. Porém, quando comparado ao controle com indução de apoptose na mesma concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, não houve diferença significativa. A viabilidade de células tratadas com hemolinfa bruta 0,05% e 0,1% por 1 h com apoptose induzida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 µmol L<sup>-1</sup>

também apresentou redução significativa ( $p < 0,001$ ) em relação ao controle sem tratamento com  $H_2O_2$  e hemolinfa, mas também não houve diferença significativa quando a comparação foi feita com o controle com indução de apoptose com a mesma concentração de  $H_2O_2$ .

O tratamento dos cultivos com frações 0,05% e 0,1% por 1 h e  $H_2O_2$   $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  produziram redução significativa ( $p < 0,001$  e  $p < 0,01$  respectivamente) do número de células viáveis no comparativo com o controle não tratado, bem como para o tratamento com frações 0,05% e 0,1% por 1 h e  $H_2O_2$   $30 \mu\text{mol L}^{-1}$  ( $p < 0,001$ ). Não houve diferenças significativas na comparação entre as frações e o controle tratado com  $H_2O_2$   $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ , tampouco entre as frações e o controle tratado com  $H_2O_2$   $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ .

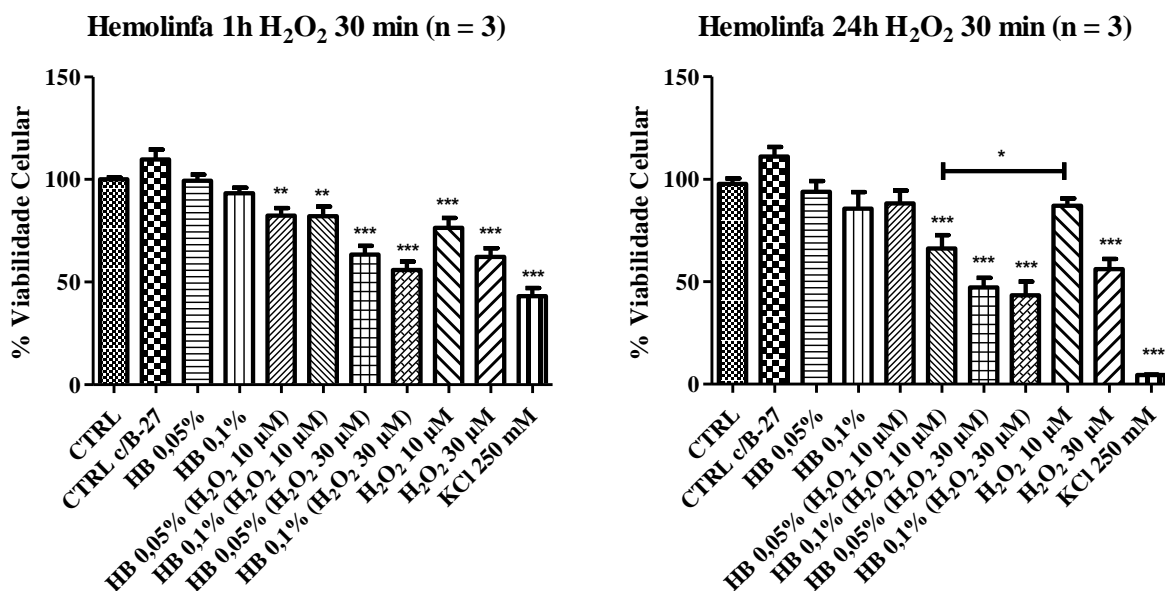
Não se espera multiplicação de células neuronais em cultura nas condições descritas neste estudo. Desta forma, foi explorado o efeito do tratamento prolongado por 24 h tanto para a hemolinfa como para a fração, considerando o mesmo número celular. O tratamento com 0,05% de hemolinfa e  $H_2O_2$   $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  não apresentou diferença estatística em relação ao controle não tratado e tratado com  $H_2O_2$   $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Quanto ao tratamento com 0,1% de hemolinfa e  $H_2O_2$   $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ , este apresentou redução significativa ( $p < 0,001$ ) da viabilidade celular em relação ao controle não tratado e ao controle tratado com  $H_2O_2$   $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  ( $p < 0,05$ ). Este fato pode estar associado à indução de um aumento da atividade mitocondrial após dano celular e não necessariamente a um aumento de viabilidade celular, já que o  $H_2O_2$  é um indutor de estresse oxidativo bem estudado em células. Neste caso, a investigação da viabilidade celular após um período maior da exposição ao agente oxidante poderia fornecer resultados compatíveis com o dano.

Células tratadas com 0,05% e 0,1% de hemolinfa por 24 h e  $H_2O_2$   $30 \mu\text{mol L}^{-1}$  tiveram viabilidade celular significativamente reduzida ( $p < 0,001$ ) em relação ao controle não tratado e

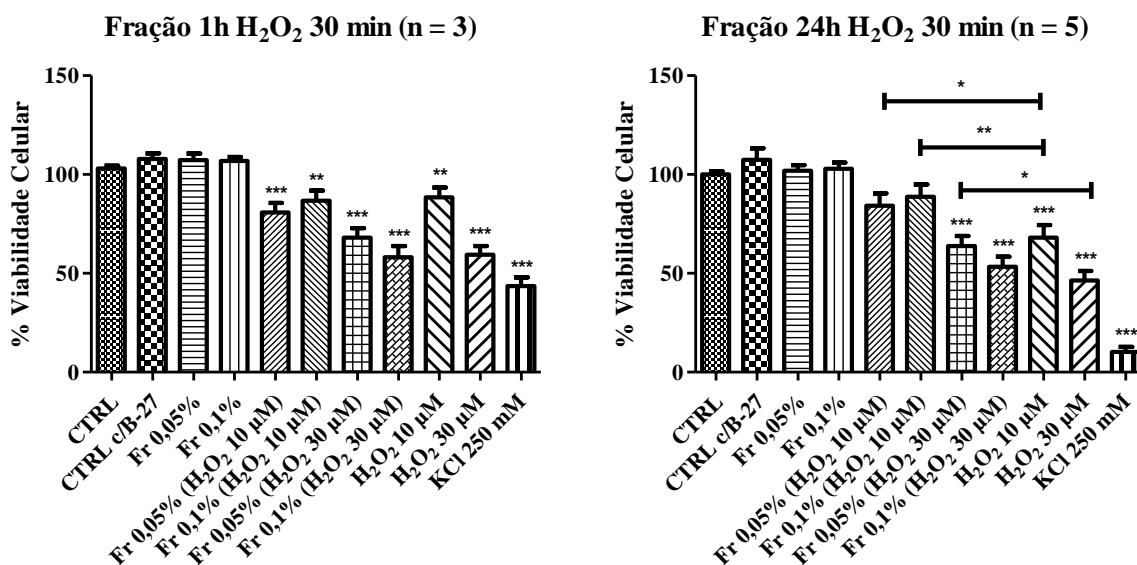
não foi estatisticamente diferente quando a comparação foi feita em relação ao controle tratado com  $\text{H}_2\text{O}_2$   $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ .

Frações 0,05% e 0,1% (24 h) e  $\text{H}_2\text{O}_2$   $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  adicionados aos cultivos não geraram diferença estatística em relação ao controle não tratado, porém, houve aumento da viabilidade celular em relação ao controle tratado com  $\text{H}_2\text{O}_2$   $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  ( $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ , respectivamente). Os tratamentos com frações 0,05% e 0,1% por 24 h e  $\text{H}_2\text{O}_2$   $30 \mu\text{mol L}^{-1}$  resultaram em redução significativa de células viáveis ( $p < 0,001$ ) em relação ao controle não tratado.

A fração 0,05% e  $\text{H}_2\text{O}_2$   $30 \mu\text{mol L}^{-1}$  produziu células viáveis em número proporcionalmente maior ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle tratado com  $\text{H}_2\text{O}_2$   $30 \mu\text{mol L}^{-1}$  quando adicionada à cultura, ao passo que o tratamento fração 0,1% e  $\text{H}_2\text{O}_2$   $30 \mu\text{mol L}^{-1}$  não apresentou diferença significativa neste mesmo comparativo. Os resultados são apresentados nos gráficos da **Figura 21**.







**Figura 21.** Viabilidade celular após exposição das culturas primárias hipocâmpais a diferentes concentrações de HB e Fr pelos períodos de 1 e 2 h e subsequente exposição ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 30 min. Avaliação pelo método de redução do MTT. CTRL: Controle; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrogênio; HB: Hemolinfa Bruta; Fr: Fração (ANOVA e comparação múltipla de Newman-Keuls; \*p< 0,05; \*\*p<0,01 e \*\*\*p<0,001 em relação ao controle).

Em estudos *in vitro*, o tratamento de culturas de células neuronais com baixas concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produz morte celular por apoptose, o que possibilita sua utilização como modelo experimental para estudo de mecanismos de toxicidade neuronal e de estratégias de proteção frente ao dano oxidativo envolvido em condições neurodegenerativas (WHITTEMORE *et al.*, 1995; CHEN *et al.*, 2009).

O presente estudo descreve pela primeira vez a avaliação do efeito da hemolinfa e fração de *L. obliqua* sobre a viabilidade celular de células neuronais de cultivo primário. Os resultados preliminares revelam que o tratamento de cultivos embrionários primários de neurônios hipocâmpais de ratos Wistar com fração cromatográfica por 24 h, posteriormente expostos ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 30 min, apresentaram maior viabilidade celular em relação ao controle positivo, tratado apenas com o agente indutor H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, porém tiveram redução significativa do

metabolismo mitocondrial quando comparados ao controle sem indução oxidativa. As demais condições e concentrações de tratamento testadas não produziram evidências de que a hemolinfa e frações tenham produzido efeito neuroprotetor.

A morte de células neuronais observada em condições neurodegenerativas tem sido associada a dano por estresse oxidativo, resultado da observação de elevadas concentrações de  $H_2O_2$  em regiões do cérebro envolvidas nestas condições, como nas doenças Alzheimer e Parkinson, em que neurônios do hipocampo, córtex cerebral e frontal e dopaminérgicos da substância nigra são afetados, respectivamente (WHITTEMORE *et al.*, 1995; MATTSON, 2000; GIASSON *et al.*, 2002).

Na hemolinfa de *L. obliqua* foi descrita a presença de uma proteína antiapoptótica, que promoveu o aumento da viabilidade celular em culturas *Sf-9* tratadas com 1% (v/v) de hemolinfa ou fração cromatográfica, posteriormente submetidas à privação de nutrientes e tratamento com o agente indutor de apoptose actinomicina D (SOUZA *et al.*, 2005). O mesmo comportamento foi observado quando Maranga *et al.* (2003) utilizaram hemolinfa e frações cromatográficas (1% v/v) como suplementação de meios de cultura em cultivos de células *Sf-9*. A suplementação do meio de cultura com hemolinfa ou frações semi-purificadas (1% v/v) por 1 h também promoveu proteção contra morte celular induzida por estresse oxidativo com *tert*-butil hidroperóxido (*t*-BHP),  $H_2O_2$  e infecção por baculovírus em cultura de células *Sf-9* (VIEIRA *et al.*, 2010).

Mendonça *et al.* (2007) verificaram o efeito antiapoptótico da hemolinfa e frações (1% v/v) em culturas celulares de inseto e humanas (*Sf-9* e HEK-293, respectivamente) após o tratamento com os indutores de apoptose *t*-BHP,  $H_2O_2$  e baculovírus. No mesmo estudo, os autores evidenciaram que o tratamento com hemolinfa e frações produziu a manutenção de um alto potencial eletroquímico na membrana mitocondrial das células, evitando assim o

aumento de permeabilidade da mesma e a consequente liberação de citocromo c para o citosol, inibindo a sinalização para esta via de apoptose e resultando no prolongamento da vida celular. Desta forma, este estudo sugere que a ação antiapoptótica da hemolinfa e fração possa estar associada a uma ação direta sobre as membranas mitocondriais.

Heinen *et al.* (2014) observaram que o extrato aquoso de cerdas de *L. obliqua* promoveu um aumento na viabilidade e proliferação celulares de linhagens U-138MG (glioma humano) e HT-29 (câncer colo-retal humano) em cultivo. Por outro lado, verificaram um decréscimo drástico da viabilidade de linhagem de células V-79 (fibroblastos de hamster chinês). Ainda, os mesmos autores encontraram que a proteína antiapoptótica purificada conforme Souza *et al.* (2005) produziu um forte efeito protetor em células V-79, o que não foi notado nas células U-138MG e HT-29 expostas ao mesmo tratamento. O referido estudo evidencia que o comportamento celular difere em relação ao tipo de célula exposto ao mesmo tratamento com hemolinfa e proteína antiapoptótica, o que é sugerido estar atribuído a distintos receptores e/ou vias de sinalização celulares envolvidos. Com base nos dados observados, os pesquisadores sugerem que no veneno estão presentes agentes pro e anti-proliferativos, os quais agem distintamente em tipos celulares diversos.

O efeito que a proteína antiapoptótica produz em uma variedade de células que vão de insetos a mamíferos, incluindo humanas, frente à indução de apoptose por vários mecanismos (físicos, químicos e biológicos) sugere que esta possa atuar em alguma via conservada da apoptose. Em células tumorais, a resposta foi diferente àquela observada nas células normais, o que pode sugerir a alteração das vias de apoptose das células anômalas, em que a proteína poderia estar atuando (HEINEN *et al.*, 2014).

Chudzinski-Tavassi *et al.* (2010) inferem que lipocalinas de *L. obliqua* podem estar implicadas em sobrevivência celular durante o fenômeno de metamorfose do inseto e

demonstraram que um peptídeo sintético baseado em lipocalinas de um inseto promoveu atividade citoprotetora em leucócitos e células endoteliais submetidas à privação de nutrientes.

*Lopap* também foi descrita por Fritzen *et al.* (2005) como molécula capaz de produzir aumento da viabilidade celular de forma dependente de concentração em *HUVECs* privados de soro. O efeito antiapoptótico poderia estar relacionado neste caso, à regulação da expressão de moléculas de *NO*, que é um fator protetor do endotélio, inibindo a apoptose.

A forma recombinante da proteína *Losac* (*rLosac*) apresentou as mesmas propriedades que a forma nativa, quando testada em *HUVECs*, em relação à indução de proliferação e sobrevivência celulares e liberação de mediadores hemostáticos em células endoteliais como *NO* e *t-PA* (ativador de plasminogênio tecidual). Em células neuronais de gânglio da raiz dorsal, porém, o tratamento com *rLosac* não produziu efeitos proliferativos, tampouco morfológicos. Já em fibroblastos (FN-1), a *rLosac* apresentou atividade citoprotetora quanto à indução de apoptose por privação de soro (ALVAREZ-FLORES *et al.*, 2012).

Estudos adicionais no intuito de verificar proteínas expressas pelos cultivos tratados com as amostras poderiam indicar se fatores como diferenças na adaptação das células provenientes de tecidos de animais isogênicos para a condição *in vitro* poderiam estar relacionados aos resultados obtidos. Além disso, ainda é desconhecida a interação da proteína antiapoptótica com receptores celulares específicos, que podem não estar presentes ou não estarem disponíveis em quantidades suficientes para a manifestação dos efeitos nas células estudadas. A própria estrutura da proteína responsável pelo efeito antiapoptótico permanece sem ter sido elucidada e desta forma a previsão de sua susceptibilidade à degradação ou inativação também fica comprometida.

Como demonstrado neste estudo, a composição proteica de venenos animais como o de *L. obliqua* pode apresentar variações qualitativas e quantitativas intraespécie, quando comparados animais de origens distintas e por consequência expostos a fatores ambientais diversos. A concentração de íons livres presentes naturalmente na hemolinfa pode da mesma forma diferir entre os animais e produzir deslocamento na eluição de proteínas específicas durante a cromatografia de troca iônica, fazendo com que o padrão de eluição nas frações não seja reprodutível. Desta forma, as proteínas presentes na fração utilizada neste estudo podem divergir em relação àquelas descritas na literatura utilizando a mesma estratégia de fracionamento. Ainda, pode haver ação sinérgica entre substâncias presentes na hemolinfa, que podem contribuir para um maior ou menor efeito.

Os insetos apresentam um processo de metamorfose onde a combinação da sinalização de crescimento, ativação, diferenciação e apoptose fisiológica em tecidos específicos é altamente regulada. Provavelmente substâncias responsáveis por esta sinalização circulam pela hemolinfa dos mesmos, o que torna interessante o seu estudo sob a perspectiva de identificação de compostos bioativos com potencial biotecnológico. Neste contexto, diferentes estágios de desenvolvimento do animal podem apresentar fluidos biológicos com propriedades diferentes (MARANGA *et al.*, 2003).

Em relação ao veneno bruto, não de serem consideradas as presenças de outras substâncias ativas que podem desempenhar um efeito inibitório sobre a viabilidade e proliferação celular, como as fosfolipases A2 envolvidas na atividade hemolítica apresentada pelo veneno e a atividade de hialuronidase (HEINEN *et al.*, 2014).

Além disso, culturas neuronais primárias mostraram-se também mais sensíveis à adição de hemolinfa e fração, de forma que concentrações muito menores que as descritas na literatura com efeito antiapoptótico necessitaram ser adotadas para evitar o efeito citotóxico

da própria amostra. Sendo assim, há a possibilidade de que a proteína à qual é atribuído o efeito antiapoptótico não estivesse presente em quantidade suficiente para tal. Estudos futuros com a utilização da proteína isolada podem representar uma estratégia no intuito de contornar esta limitação.

## 5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

### 5.1 Conclusões

- O fracionamento cromatográfico prévio permitiu que fossem encontradas 5 proteínas exclusivamente nas frações, que não foram identificadas nas amostras de hemolinfa de origem;
- Foram identificadas 76 proteínas totais entre a hemolinfa e frações cromatográficas dos 3 lotes, sendo 71 na hemolinfa e 40 nas frações, com 34 compartilhadas entre elas;
- Na hemolinfa foram encontradas 34 proteínas comuns aos 3 lotes e 36 exclusivamente em relação às frações;
- Foi identificada a predominância de proteínas com atividade antiviral, serino proteases, hemolinas e inibidores de proteases na hemolinfa, enquanto nas frações foram predominantes as hemolinas, serino proteases e inibidores de proteases;
- O tratamento de culturas primárias hipocampais embrionárias com a primeira fração cromatográfica nas concentrações de 0,05 e 0,1% (v/v), por 24 h, seguido de indução com peróxido de hidrogênio 10 e 30  $\mu\text{mol L}^{-1}$  por 30 min apresentou aumento da viabilidade celular estatisticamente significativo em relação ao controle positivo ( $\text{H}_2\text{O}_2$ );
- O tratamento de culturas primárias hipocampais embrionárias com hemolinfa bruta nas concentrações de 0,05 e 0,1% (v/v), por 1 e 24 h, seguido de indução com peróxido de hidrogênio 10 e 30  $\mu\text{mol L}^{-1}$  por 30 min não produziu diferença estatística significativa em relação ao controle e ao controle positivo;

- Culturas primárias hipocampais embrionárias tratadas com a primeira fração cromatográfica nas concentrações de 0,05 e 0,1% (v/v), por 1 h, seguido de indução com peróxido de hidrogênio 10 e 30  $\mu\text{mol L}^{-1}$  por 30 min não apresentaram diferença estatística significativa em relação ao controle e ao controle positivo.

## 5.2 Perspectivas

- Isolar e realizar ensaios de cristalografia e bioinformática para elucidar a estrutura tridimensional da proteína antiapoptótica;
- Promover a análise dos componentes intra e extracelulares presentes na hemolinfa separadamente;
- Submeter outras frações cromatográficas à identificação de proteínas por abordagem *shotgun*;
- Realizar eletroforese 2D das proteínas expressas pelas culturas celulares tratadas para avaliar e identificar proteínas diferencialmente expressas;
- Realizar ensaios de citometria de fluxo utilizando marcação com iodeto de propídio e Anexina V para verificar a indução de apoptose ou necrose;
- Realizar ensaios de viabilidade celular em culturas primárias hipocampais com a proteína antiapoptótica isolada;
- Testar outros agentes indutores de apoptose, por outras vias de indução, como a estaurosporina.



## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVAREZ-FLORES, M.P.; FRITZEN, M.; REIS, C.V.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M. (2006). Losac, a factor X activator from *Lonomia obliqua* bristle extract: Its role in the pathophysiological mechanisms and cell survival. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 343(4):1216-1223.

ALVAREZ-FLORES, M.P.; FURLIN, D.; RAMOS, O.H.P.; BALAN, A.; KONNO, K.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M. (2011). Losac, the First Hemolin that Exhibits Procoagulant Activity through Selective Factor X Proteolytic Activation. **J. Biol. Chem.** 286(9) 6918–6928.

ALVAREZ-FLORES, M.P.; REMUZGO, C.M.; CURY, Y.; BOSCH, R.V.; VAZ-DE-LIMA, B.B.; MARIA, D.A.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M. (2012). Mechanisms implicated in cell proliferation and cell survival induced by recombinant Losac, a cell adhesion molecule from *Lonomia obliqua*. Abstracts Toxins. **Toxicon.** 60:142-143.

AMARANT, T.; BURKHART, W.; LE VINE, H.; AROCHA-PIÑANGO, C.L.; PARIKH, I. (1991). Isolation and complete amino acid sequence of two fibrinolytic proteinases from the toxic Saturnid caterpillar *Lonomia achelous*. **Biochim. Biophys. Acta.** 1079:214-221.

ANDERSEN, M.L.; D'ALMEIDA, V.; KO, G.M.; KAWAKAMI, R.; MARTINS, P.J.F.; MAGALHÃES, L.E.; TUFIK, S. (2004). **Princípios Éticos e Práticos do Uso de Animais de Experimentação.** Universidade Federal de São Paulo. São Paulo: Cromosete.

ARACAVA, Y.; DESHPANDE, S.S.; SWANSON, K.L.; RAPOPORT, H.; WONNACOTT, S.; LUNT, G.; ALBUQUERQUE, E.X. (1987). Nicotinic acetylcholine receptors in cultured neurons from the hippocampus and brain stem of the rat characterized by single channel recording. **FEBBS Lett.** 222(1):63-70.

AROCHA-PIÑANGO, C.L.; LAYRISSE, M. (1969). Fibrinolysis produced by contact with a caterpillar. **Lancet.** 810-812.

AROCHA-PIÑANGO, C.L.; DE BOSCH, N.B.; NOUEL, A.; TORRES, A.; PERALES, J.; ALONSO, M.E.; RODRIGUEZ, A.; CARVAJAL, Z.A.; OJEDA, A.; TASAYCO, M.L.; CHITTY, W. (1988). Fibrinolytic and Procoagulant Agents from a Saturnidae Moth Caterpillar. In: PIRKLE, H.; MARKLAND F.D.S. (Eds.). **Hemost. Anim. Ven.** New York: Marcel Decker Inc., p. 223-240.

AROCHA-PIÑANGO, C.L.; DE BOSCH, N.B.; TORRES, A.; GOLDSTEIN, C.; NOUEL, A.; ARGÜELLO, A.; CARVAJAL, Z.; GUERRERO, B.; OJEDA, A.; RODRIGUEZ, A.; RODRIGUEZ, S. (1992). Six New Cases of a Caterpillar-Induced Bleeding Syndrome. **Thromb. Haemost.** 67:402-407.

AROCHA-PIÑANGO, C.L.; MARVAL, E. (1992). The action of the venom of the *Lonomia achelous* caterpillars on rabbit blood coagulation. Abstracts of 12th INTNAT'L Congress. vol 65 suppl 1.

AROCHA-PIÑANGO, C.L.; GUERRERO, B. (2001). *Lonomia* genus Caterpillar Envenomation: Clinical and Biological Aspects. **Haemost.** 31:288-293.

BANKER, G.A.; COWAN, W.M. (1977). Rat hippocampal neurons in dispersed cell culture. **Brain. Res.** 126(3):397-42.

BARACCHI, D.; MAZZA, G.; MICHELUCCI, E.; PIERACCINI, G.; TURILLAZZI, S.; MONETI, G. (2013). Top-down sequencing of *Apis dorsata* apamin by MALDY-TOF MS and evidence of its inactivity against microorganisms. **Toxicon.** 70:105-112.

BASUALDO, A.; OLIVEIRA, K.C.; TREVISAN, T.; BARLETTA, F.B. (2008). Tratamento clínico e bucomaxilofacial de quadro hemorrágico-alérgico por *Lonomia* sp: Relato de caso. **Stomatos.** 24(14):46-54.

BERGER, M.; RECK JR., J.; TERRA, R.M.S.; PINTO, A.F.M.; TERMIGNONI, C.; GUIMARÃES, J.A. (2010a). *Lonomia obliqua* caterpillar envenomation causes platelet hypoaggregation and blood incoagulability in rats. **Toxicon.** 55:33-44.

BERGER, M.; RECK JR., J.; TERRA, RENATA, M.S.; SILVA, W.O.B.; SANTI, L.; PINTO, A.F.M.; VAINSTEIN, M.H.; TERMIGNONI, C.; GUIMARÃES, J.A. (2010b). *Lonomia obliqua* venomous secretion induces human platelet adhesion and aggregation. **J. Thromb. Thrombolysis.** 30:300–310.

BERGER, M.; BEYS-DA-SILVA, W.O.; SANTI, L.; OLIVEIRA, I.M.; JORGE, P.M.; HENRIQUES, J.A.P.; DRIEMEIER, D.; VIEIRA, M.A.R.; GUIMARÃES, J.A. (2013). Acute *Lonomia obliqua* caterpillar envenomation-induced physiopathological alterations in rats: Evidence of new toxic venom activities and the efficacy of serum therapy to counteract systemic tissue damage. **Toxicon**. 74:179-192.

BIEZANKO, C.M.; SETA, F.D. (1939). Catálogo dos insetos encontrados em Rio Grande e seus arredores – Fascículo I – Lepidópteros. Pelotas: A Universal, 15 p. In: LORINI, L.M. (1999). **A Taturana: Aspectos Biológicos e Morfológicos da *Lonomia obliqua***. Passo Fundo: EDIUPF, 67 p.

BRADFORD, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **An. Bioch.** 72:248-54.

BREDESEN, D.E.; RAO, R.V.; MEHLEN, P. (2006) Cell death in the nervous system. **Nature**. 443(19):796-802.

BURDMANN, E.A.; ANTUNES, I.; SALDANHA, L.B.; ABDULKADER, R.C.M.R. (1996). Severe acute renal failure induced by the venom of *Lonomia* caterpillars. **Clin. Nephrol.** 46(5): 337-339.

CAI, L.; WANG, H.; LI, Q.; QIAN, Y.; YAO, W. (2008). Salidroside inhibits H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis in PC12 cells by preventing cytochrome c release and inactivating of caspase cascade. **Acta. Biochim. Biophys. Sin.** 40:796-802.

CALVETE, J.J. (2009). Venomics: Digging into the evolution of venomous systems and learning to twist nature to fight pathology. **J. Proteomics**. 72:121-126.

CAMPOS, A.C.M.R.; DIAS-DA-SILVA, W. (1996). Detection of a phospholipase-like activity, in the venom from *Lonomia obliqua*. **Tox.** (Abstract).

CARLTON JR., D.D.; SCHUG, K.A. (2011). A review on the interrogation of peptide-metal interactions using electrospray ionization-mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*. 686(1-2):19-39.

CARMO, A.C.V.; GIOVANNI, D.N.S.; CORRÊA, T.P.; MARTINS, L.M.; STOCCO, R.C.; SUAZO, C.A.T.; MORAES, R.H.P.; VEIGA, A.B.G.; MENDONÇA, R.Z. (2012). Expression of a antiviral protein from *Lonomia obliqua* hemolymph in baculovirus/insect cell system. **Antiviral Res**. 94:126-130.

CARMO, A.C.V.; YAMASAKI, L.H.T.; FIGUEIREDO, C.A.; GIOVANNI, D.N.S.; OLIVEIRA, M.I.; SANTOS, F.C.P.; CURTI, S.P.; RAHAL, P.; MENDONÇA, R.Z. (2014). Discovery of a new antiviral protein isolated *Lonomia obliqua* analysed by bioinformatics and real-time approaches. **Cytotechnology**. Jun 2014.

CARRIJO-CARVALHO, L.C.; MARIA, D.A.; VENTURA, J.S.; MORAIS, K.L.P.; MELO, R.L.; RODRIGUES, C.J.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M.A. (2012). Lipocalin-Derived Peptide Modulating Fibroblasts and Extracellular Matrix Proteins. **J. Toxicology**. 2012:1-8.

CARVALHO, P.C.; FISCHER, J.S.G.; YATES JR., I.I.I.; BARBOSA, V.C. (2012). PatternLab: from mass spectra to label-free differential shotgun proteomics. **Cur. Protoc. Bioinf.** Chapter 13L, Unit 13.19.

CARVALHO, N.D.; GARCIA, R.C.T.; FERREIRA, A.K.; BATISTA, D.R.; CASSOLA, A.C.; MARIA, D.; LEBRUN, I.; CARNEIRO, S.M.; AFECHÉ, S.C.; MARCOURAKIS, T.;

CÉRON, J.A.; CONTRERAS-MORENO, J.; PUERTOLLANO, E.; CIENTIFUEGOS, G.A.; PUERTOLLANO, M.A.; PABLO, M.A. (2010). The antimicrobial peptide cecropin A induces caspase-independent cell death in human promyelocytic leukemia cells. **Peptides.** 31:1494-1503.

CHEN, X.; ZHANG, Q.; CHENG, Q.; DING, F. (2009). Protective effect of salidroside against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell apoptosis in primary culture of rat hippocampal neurons. **Mol. Cell Biochem.** 332:85-93.

CHOI, S.S.; RHEE, W.J.; PARK, T.H. (2002). Inhibition of human cell apoptosis by silkworm hemolymph. **Biotechnol. Prog.** 18:874-878.

CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M.; SCHATTNER, M.; FRITZEN, M.; POZNER, R.G.; REIS, C.V.; LOURENÇO, D.; LAZZARI, M.A. (2001). Effects of Lopap on Human Endothelial Cells and Platelets. **Haemost.** 31:257-265.

CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M.; FLORES, M.P.A. (2005). Exploring New Molecules and Activities from *Lonomia obliqua* Caterpillars. **Pathophysiol. Haemost. Thromb.** 34:228–233.

CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M.; CARRIJO-CARVALHO, L.C. (2006). Biochemical and Biological Properties of *Lonomia obliqua* Bristle Extract. **J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.** 12(2):156-171.

CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M.; CARRIJO-CARVALHO, L.C.; WAISMAM, K.; FARSKY, S.H.P.; RAMOS, O.H.P.; REIS, C.V. (2010). A lipocalin sequence signature modulates cell survival. **FEBS Lett.** 584:2896–2900.

CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M.; FLORES, M.P.A.; CARRIJO-CARVALHO, L.C.; RICCI-SILVA, M.E. (2013). Toxins from *Lonomia obliqua* – Recombinant production and molecular approach. **INTECH.** Chapter 7. 175-206.

CUI, Y.; DU, Y.; LU, M.; QIANG, C. (2011). Antioxidant responses of *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae exposed to thermal stress. **J. Therm. Biol.** 36:292–297.

DIAS-DA-SILVA, W.; GONÇALVES, L.C.R. ; CAMPOS, A.C.M.R.; SILVA, M.C.C.C.S.; DUARTE, A.C.; MORAES, R.H.P.; YAMAGUCHI, K.; CARICATI, C.P.; HIGASHI, H.G.; KELEN, E.M.A. (1996). Anti-*Lonomia* serum: an antivenom produced to neutralize the hemorrhagic disorder induced by a caterpillar toxin. 18 (Abstract).

DIAZ, J.H. (2005). The evolving global epidemiology, syndromic classification management, and prevention of caterpillar envenoming. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 72(3):347-357.

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

DUARTE, A.C.; CAOVILO, J.; LORINI, I.; LORINI, D.; MANTOVANI, G.; SUMIDA, J.; MANFRE, P.C.; SILVEIRA, R.C.; MOURA, S.P. (1990). Insuficiência Renal Aguda por Acidentes com Lagartas. **J. Bras. Nefrol.** 4(12):184-187.

DUARTE, A.; WALTER, G.; BARROS, E.; LORINI, I. (1994). Insuficiência renal aguda nos acidentes com *Lonomia obliqua*. **Nefrol. Latin.** 1:38-40.

DUARTE, A.C.; CRUSIUS, P.S.; PIRES, C.A. L.; SCHILLING, M.A.; FAN, H.W. (1996). Intracerebral haemorrhage after contact with *Lonomia* caterpillars. **Lancet.** 348(12):1033-1033.

EGGINK, M.; ROMERO, W.; VREULS, R.J.; LINGEMAN, H.; NIESSEN, W.M.A.; IRTH, H. (2008). Development and optimization of a system for comprehensive two-dimensional liquid chromatography with UV and mass spectrometric detection for the separation of complex samples by multi-step gradient elution. **J. Chromatogr. A.** 1188:216-226.



ENG, J.K.; JAHAN, T.A.; HOOPMANN, M.R. (2013). Comet: An open-source MS/MS sequence database search tool. **Proteomics**. 13(1):22-24.

FAN, H.W.; CARDOSO, J.L.C.; OLMOS, R.D.; ALMEIDA, F.J.; VIANA, R.P.; MARTINEZ, A.P.P. (1998). Hemorrhagic syndrome and acute renal failure in a pregnant woman after contact with *Lonomia* caterpillars: a case report. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**. 40(2): 119-120.

FLOWER, D.R.; NORTH, A.C.T.; SANSOM, C.E. (2000). The lipocalin protein family: structural and sequence overview. **Biochim. Biophys.** 1482: 9-24.

FRAIHA-NETO, H.; BALLARINI, A.J.; LEÃO, R.N.Q.; COSTA-JÚNIOR, D.; DIAS, L.B. (1986). **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. Belém: Fundação Serviços de Saúde Pública. 2:811-882.

FRAIHA-NETO, H.; COSTA-JÚNIOR, D.; DE LEÃO, R.N.Q.; BALLARINI, A.J. (1992). Acidentes Hemorrágicos por Larvas de *Lonomia*. In: SCHVARTSMAN, S. **Plantas Venenosas e Animais Peçonhentos**. São Paulo: Sarvier, p. 241-244.

FRITZEN, M.; ALVAREZ-FLORES, M.P.; REIS, C.V.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M. (2005). A prothrombin activator (Lopap) modulating inflammation, coagulation and cell survival mechanisms. **Biochem. Biophys. Res. Comm.** 333:517-523.

FUGIWARA, C.Y. (2006). Estudo de algumas atividades biológicas do extrato de cerdas da lagarta *Lonomia obliqua* Walker, 1855 (Saturniidae) preparado após diferentes períodos de armazenamento das cerdas. **Dissertação de Mestrado**. Instituto de Biociências. Universidade de São Paulo. São Paulo, Brasil.

GALLUZZI, L.; MAIURI, M.C.; VITALE, I.; ZISCHKA, H.; CASTEDO, M.; ZITVOGEL, L.; KROEMER, G. (2007). Cell death modalities: classifications and pathophysiological implications. **Cell Death Diff.** 14:1237-1266.

GAMBORGI, G.P.; METCALF, E.B.; BARROS, E.J.G. (2006). Acute renal failure provoked by toxin from caterpillars of the species *Lonomia obliqua*. **Toxicon.** 47:68-74.

GARCIA, C.M.; DANNI-OLIVEIRA, I.M. (2007). Ocorrência de acidentes provocados por *Lonomia obliqua* Walker, no Estado do Paraná, no período de 1989 a 2001. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 40(2): 242-246.

GARCIA, R.C.T.; DATI, L.M.M.; FUKUDA, S.; TORRES, L.H.L.; MOURA, S.; CARVALHO, N.D.; CARRETTIERO, D.C.; CAMARINI, R.; LEVADA-PIRES, A.C.; YONAMINE, M.; NEGRINI-NETO, O.; ABDALLA, F.M.F.; SANDOVAL, M.R.L.; AFECHÉ, S.C.; MARCOURAKIS, T. (2012). Neurotoxicity of Anhydroecgonine Methyl Ester, a Crack Cocaine Pyrolysis Product. **Toxicolog. Scienc.** 128(1):223-234.

GARDINER, B.O.C. (1967). Rearing the Larvae of *Lonomia cynira* (Saturniidae). **J. Lepidop. Soc.** 21(2):138-140.

GE HEALTHCARE. (2010). **2-D Electrophoresis**: Principles and methods. Piscataway: General Electric Company ,162 p.

GIASSON, B.I.; ISCHIROPOULOS, H.; LEE, V.M.; TROJANOWSKI, J.Q. (2002). The relationship between oxidative/nitrative stress and pathological inclusions in Alzheimer's and Parkinson's disease. **Free Radic. Biol. Med.** 32:1264-1275.

GOUVEIA, A.I.C.B. (2004). Bioprospecção de toxinas presentes na hemolinfa e extrato de cerdas da lagarta *Lonomia obliqua*. **Dissertação de Mestrado**. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação do Departamento de Biologia Celular. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, Brasil.

GOUVEIA, A.I.C.B.; SILVEIRA, R.B.; NADER, H.B.; DIETRICH, C.P.; GREMSKI, W.; VEIGA, S.S. (2005). Identification and partial characterization of hyaluronidases in *Lonomia obliqua* venom. **Toxicon**. 45:403-410.

GRECO, K.N. (2009). Estudo de proteínas obtidas de hemolinfa de *Lonomia obliqua* com ação antiviral. **Dissertação de Mestrado**. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Universidade de São Paulo. São Paulo, Brasil.

GRECO, K.N.; MENDONÇA, R.M.Z.; MORAES, R.H.P.; MANCINI, D.A.P.; MENDONÇA, R.Z. (2009). Antiviral activity of the hemolymph of *Lonomia obliqua* (Lepidoptera: Saturniidae). **Antiviral Res.** 84:84-90.

- HARPER, A.E. (1982). Nutrition, aging, and longevity. **Am. J. of Clin. Nut.** 36: 737-749.
- HE, Q.; SUN, J.; QIN, W.; WEI, W.; BIN, H. (2014). Neuroprotective effects of ginsenoside Rg1 against oxygen-glucose deprivation in cultured hippocampal neurons. **J. Chin. Med. Assoc.** 77:142-149.
- HEINEN, T.E.; VEIGA, A.B.G. (2011). Arthropods venom and cancer. **Toxicon.** 57:497-511.
- HEINEN, T.E.; FARIAS, C.B.; ABUJAMRA, A.L.; MENDONÇA, R.Z.; ROESLER, R.; VEIGA, A.B.G. (2014). Effects of *Lonomia obliqua* caterpillar venom upon the proliferation and viability of cell lines. **Cytotechnology.** 66(1):63-74.
- HEINEN, T.E.; VEIGA, A.B.G. (2011). Arthropod venoms and cancer. **Toxicon.** 57:497-511.
- HOLLER, F.G.; SKOOG, D.A.; CROUCH, S.R. (2009). Princípios de análise instrumental. 6 ed. Porto Alegre: Bookman, 1.056 p.
- HOMMEL, D.; BOUCHARÉINE, L.; HULIN, A. (1995). Envenimation par une chenille de lépidoptère: *Lonomia achelous*. Revue de la littérature: à propos de deux cas en Guyane Française. La Semaine des Hôpitaux de Paris. 71(1-2):9-12.
- HUETTNER, J.E. BAUGHMAN, R.W. (1986). Primary culture of identified neurons from the visual cortex of postnatal rats. **J. Neuros.** 6:3044-3060.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. (2008). Projeção da população do Brasil por sexo e idade 1980-2050 - Revisão 2008. Diretoria de Pesquisas. Coordenação de População e Indicadores Sociais. Estudos e Pesquisas Informação Demográfica e Socioeconômica. n. 24. Rio de Janeiro.

JAHN, C.E.; STEVENS, C.F. (1987). Glutamate activates multiple single channel conductances in hippocampal neurons. **Nature**. 325(6104):522-525.

JONSSON, A.P.; YOUSSEF, A.; PALMBERG, C.; PERCIPALLE, C.; NORDLING, E.; DANEHOLT, B.; JÖRNVALL, H.; BERGMAN, T. (2001). Recovery of gel-separated proteins for in-solution digestion and mass spectrometry. **Anal. Chem.** 73:5370-5377.

KEITH-ROACH, M.J. (2010). A review of recent trends in electrospray ionization-mass spectrometry for the analysis of metal-organic ligand complexes. **Anal. Chim. Acta.** 678(2):140-148.

KELEN, E.M.A.; PICARELLI, Z.P.; DUARTE, A.C. (1995). Hemorrhagic syndrome induced by contact with caterpillars of the genus *Lonomia* (Saturniidae, Hemileucinae). **J. Toxicol. Toxin. Rev.** 14(3):283-308.

KIM, E.J.; RHEE, W.J.; PARK, T.H. (2001). Isolation and characterization of an apoptosis inhibiting component from the hemolymph of *Bombyx mori*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 285:224-228.

KIVELL, B.M.; MCDONALD, F.J.; MILLER, J.H. (2001). Method for serum-free culture of late fetal and early post natal rat brainstem neurons. **Brain Res. Protoc.** 6(3):91-99.

KLAMMER, A.A.; MACCOSS, M.J. (2006). Effects of modified digestion schemes on the identification of proteins from complex mixtures. **J. Proteom. Res.** 5(3):695-700.

KOWACS, P.A.; CARDOSO, J.; ENTRES, M.; NOVAK, E.M.; WERNECK, L.C. Fatal Intracerebral hemorrhage secondary to *Lonomia obliqua* Caterpillar envenoming. (2006). **Arq. Neurops.** 64(4):1030-1032.

LANÇAS, F.M. ; SILVA, J.C.R. ; BICUDO, R.C. ; BENASSI-NETO, M. (2003). A química analítica do proteoma. **Rev. Analytica.** 6:60-66.

LEMAIRE, C. (2002). **The Saturniidae of America: Hemileucinae.** Keltern: Goecke & Evers, Vol. C. 1388 p.

LIBERMAN, F. (2004). Análise dos fatores determinantes para a qualidade da anotação genômica automática. **Dissertação de Mestrado.** Programa de Pós Graduação em Biotecnologia e Ciências Genômicas. Universidade de Brasília. Brasília, Brasil.

LILLA, S.; PEREIRA, R.; HYSLOP, S.; DONATO, J.L.; LE BONNIEC, B.F.; DE NUCCI, G. (2005). Purification and initial characterization of a novel protein with factor Xa activity from *Lonomia obliqua* caterpillar spicules. **J. Mass Spectrom.** 40: 405–412.

LIU, Y.; PETERSON, D.A.; KIMURA, H.; SCHUBERT, D. (1997). Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. **J. Neurochem.** 69: 581-593.

LIU, H.; SADYGOV, R. G.; YATES, J. R. (2004) A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics. **Anal. Chem.** 76:4193-4201.

LORINI, I. (1993). Aspectos biológicos e habitat de *Lonomia obliqua* Walker, 1855 (Lepidoptera, Saturniidae). Resumos do 14º Congresso Brasileiro de Entomologia. Piracicaba, p. 740. In: LORINI, L.M. (1999). **A Taturana: Aspectos Biológicos e Morfológicos da *Lonomia obliqua***. Passo Fundo: EDIUPF, 67 p.

LORINI, L.M. (1999). **A Taturana: Aspectos Biológicos e Morfológicos da *Lonomia obliqua***. Passo Fundo: EDIUPF, 67 p.

LORINI, L.M.; CORSEUIL, E. (2001). Aspectos Morfológicos de *Lonomia obliqua* Walker (Lepidoptera: Saturniidae). **Neotrop. Entomol.** 30(3):373-378.

LORINI, L.M. (2005). Criação, Comportamento Sexual e Inimigos Naturais de *Lonomia obliqua* Walker, 1855 (Lepidoptera: Saturniidae). Tese (Doutorado). Universidade Federal do Paraná – Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. Curitiba.

MACCIONE, R.B.; MUÑOZ, J.P.; BARBEITO, L. (2001). The Molecular Bases of Alzheimer's Disease and Other Neurodegenerative Disorders. **Arch. of Med. Res.** 32:367–381.

MALAUQUE, C.M.S.; ANDRADE, L.; MADALOSSO, G.; TOMY, S.; TAVARES, F.L.; SEGURO, A.C. (2006). Short report: a case of hemolysis resulting from contact with a *Lonomia* caterpillar in southern Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 74(5):807-809.

MARANGA, L.; MENDONÇA, R.Z.; BENGALA, A.; PEIXOTO, C.C.; MORAES, R.H.P.; PEREIRA, C.A.; CARRONDO, M.J.T. (2003). Enhancement of Sf-9 Cell Growth and Longevity through Supplementation of Culture Medium with Hemolymph. **Biotechnol. Prog.** 19:58-63.

MARCONDES, F.K.; BIANCHI, F.J.; TANNO, A.P. (2002). Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Braz. J. Biol.** 64(4A):609-614.

MARTINS, L.M. (2011). Estudo do efeito de uma proteína antiapoptótica obtida da hemolinfa de *Lonomia obliqua* sobre as mitocôndrias de células Sf-9. **Dissertação de Mestrado**. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Universidade de São Paulo. São Paulo, Brasil.

MATTSON, M.P. (2000). Apoptosis in neurodegenerative disorders. **Nature Rev.** 1:120-129.



MATYSIAK, J.; HAJDUK, J.; PIETRZAK, L.; SCHMELZER, C.E.H.; KOKOT, Z.J. (2014). Shotgun proteome analysis of honeybee venom using targeted enrichment strategies. **Toxicon**. 90:255-264.

MEDEIROS, D.N.M.; TOREES, H.C.C.; TROSTER, E.J. (2014). Accident involving a 2-year-old child and *Lonomia obliqua* venom: clinical and coagulation abnormalities. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** 36:445-447.

MENDONÇA, R.Z.; GRECO, K.N.; VIEIRA, H.; PEREIRA, A.C.P.; PEIXOTO, C.C.; SOUZA, A.P.B.; MORAES, R.H.P.; PEREIRA, C.A.; CARRONDO, M.J.T.; MARQUES, P. (2007). Participación de las mitocondrias em la acción anti-apoptótica de una proteína aislada de la hemolinfa de *Lonomia obliqua*. XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, 2007, Morelia-Michoachacan-México. Annais del XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Morelia: Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería. 1:74-74.

MENDONÇA, R.Z.; GRECO, K.N.; SOUSA, A.P.B.; MORAES, R.H.P.; ASTRAY, R.M.; PEREIRA, C.A. (2008). Enhancing effect of a protein from *Lonomia obliqua* hemolymph on recombinant protein production. **Cytotechnology**. 57:83-91.

MORAES, R.H.P. (2002). Identificação dos Inimigos Naturais de *Lonomia obliqua* Walker, 1855 (Lepidoptera, Saturniidae) e Possíveis Fatores Determinantes do Aumento de sua População. **Dissertação de Mestrado**. Universidade de São Paulo - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba.

MORAES, M.C.B.; LAGO, C.L. (2003). Espectrometria de massas com ionização por “electrospray” aplicada ao estudo de espécies inorgânicas e organometálicas. **Quím. Nova.** 26(4):556-563.

MOSMANN, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Met.** 65:55-63.

NASCIMENTO-SILVA, V.; DA SILVA, G.R.; MORAES, J.A.; CYRINO, F.Z.; SEABRA, S.H.; BOUSKELA, E.; GUIMARÃES, J.A.; BARJA-FIDALGO, C. (2012). A pro-inflammatory profile of endothelial cell in *Lonomia obliqua* envenomation. **Toxicon.** 60:50-60.

NATION, J.L. (2001). **Insect Physiol. Biochem.** Florida: CRC Press, 496 p.

OBERHAMMER, F.; WILSON, J.W.; DIVE, C.; MORRIS, I.D.; HICKMAN, J.A.; WAKELING, A.E.; WALKER, P.R.; SIKORSKA, M. (1993). Antiapoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation. **EMBO J.** 12:3679-3684.

ORTEL, J. (1995). Changes in protein content and free amino acid composition in metal-contaminated gypsy moth larvae (*Lymantria dispar* L., Lymantriidae, Lepidoptera). **Comp. Biochem. Physiol.** 112C(3): 291-298.

PARK, S.E.; KIM, S.; SAPKOTA, K.; KIM, S.J. (2010). Neuroprotective effect of *Rosmarinus officinalis* extract on human dopaminergic cell line, SH-SY5Y. **Cell. Mol. Neurobiol.** 30:759-767.

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

PRZEDBORSKI, S.; VILA, M.; JACKSON-LEWIS, V. (2003). Neurodegeneration: What is it and where are we? **J. Clin. Invest.** 111:3–10.

RAFFOUL, T.; SWIECHT, K.; ARANTES, M.K.; SOUSA, A.P.B.; MENDONÇA, R.Z.; PEREIRA, C.A.; SUAZO, C.A.T. (2005). Performance Evaluation of Cho-K1 Cell in Culture Medium Supplemented with Hemolymph. **Braz. Arch. Biol. Technol.** 48:85-95.

RANGANATH, R.M.; NAGASHREE, N.R. (2001). Role of programmed cell death in development. **Int. Rev. Cytol.** 202:159-242.

RATCLIFFE, N.A.; MELLO, C.B.; GARCIA, E.S.; BUTT, T.M.; AZAMBUJA, P. (2011). Insect natural products and processes: New treatments for human disease. **Insect Biochem. Mol. Biol.** 41:747-769.

REID, G.E.; MCLUCKEY, S.A. (2002). ‘Top down’ protein characterization via tandem mass spectrometry. **J. Mass Spectrom.** 37:663-675.

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. (1999). A  $\text{Ca}^{2+}$  activated serine protease (LOPAP) could be responsible for the haemorrhagic syndrome caused by the caterpillar *Lonomia obliqua*. **Lancet**. 353:1942-1942.

REIS, C.V.; PORTARO, F.C.V.; ANDRADE, S.A.; FRITZEN, M.; FERNANDES, B.L.; SAMPAIO, C.A.M.; CAMARGO, A.C.M.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M. (2001a). A prothrombin Activator Serine Protease from the *Lonomia obliqua* Caterpillar Venom (Lopap) Biochemical Characterization. **Thromb. Res.** 102: 427-436.

REIS, C.V.; FARSKY, S.H.P.; FERNANDES, B.L.; SANTORO, M.L.; OLIVA, M.L.V.; MARIANO, M.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M. (2001b). *In vivo* characterization of Lopap, a Prothrombin Activator Serine Protease from the *Lonomia obliqua* Caterpillar Venom. **Thromb. Res.** 102:437-443.

REIS, C.V.; ANDRADE, S.A.; RAMOS, O.H.P.; RAMOS, C.R.R.; HO, P.L.; BATISTA, I.F.C.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M. (2006). Lopap, a prothrombin activator from *Lonomia obliqua* belonging to the lipocalin family: recombinant production, biochemical characterization and structure–function insights. **Biochem. J.** 398:295-302.

RESENDE, V.M.F. (2013). Análise proteômica de venenos de *Apis mellifera* baseada em espectrometria de massas: abordagem quantitativa *label-free* e identificação de fosforilação. **Tese de doutorado**. Faculdade de Medicina. Universidade de São Paulo. São Paulo. Brasil.

RHEE, W.J.; PARK, J.H.; HAHN, J.; PARK, T.H. (2013). Anti-apoptotic mechanism of silkworm hemolymph in HeLa cell apoptosis. **Process Biochem.** 48:1375-1380.

RHEE, W.J.; PARK, T.H. (2000). Silkworm hemolymph inhibits baculovirus-induced insect cell apoptosis. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 271:186-190.

RICCI-SILVA, M.E.; VALENTE, R.H.; LEON, I.R.; TAMBOURGI, D.V.; RAMOS, O.H.P.; PERALES, J.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M. (2008). Immunochemical and proteomic technologies as tools for unravelling toxins involved in envenoming by accidental contact with *Lonomia obliqua* caterpillars. **Toxicon.** 51:1017–1028.

RIELLA, M.C.; CHULA, D.; FREITAS, S.; MAZZA, M.; PACHALY, M.A. (2008). Acute renal failure and haemorrhagic syndrome secondary to toxin of caterpillars (*Lonomia obliqua*). **NDT Plus.** 6:445-446.

ROBERTS, M.F. (1996). Phospholipases: structural and functional motifs for working at an interface. **FASEB J.** 10(10):1159-1172.

ROMAN, H.; JEGOROV, A. (1991). Changes in free amino acid composition in haemolymph of larvae of the wax moth, *Galleria mellonella* L., during cold acclimation. **Comp. Biochem. Physiol.** 100A(4):957-962.

SANDOVAL, M.R.L. (2014). Neurotoxicity of coral snake phospholipases A2 in cultured rat hippocampal neurons. **Brain Res.** 1552:1-16.

SARASTE, A.; PULKKI, K. (2000). Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. **Cardiovasc. Res.** 45:528-537.

SCHULER, M.; MAURER, U.; GOLDSTEIN, J.C. (2003). p53 triggers apoptosis in oncogene-expressing fibroblasts by the induction of Noxa and mitochondrial Bax translocation. **Cell Death Differ.** 10: 451-460.

SCHMITBERGER, P.A.; FERNANDES, T.C.; SANTOS, R.C.; ASSIS, R.C.; GOMES, A.P.; SIQUEIRA, P.K.; VITORINO, R.R.; MENDONÇA, E.G.; OLIVIERA, M.G.A.; SIQUEIRA-BATISTA, R. (2013). Probable chronic renal failure caused by *Lonomia* caterpillar envenomation. **J. Venom. Anim. Toxins. Incl. Trop. Dis.** 19:14.

SEIBERT, C.S.; TANAKA-AZEVEDO, A.M.; SANTORO, M.L.; MACKESSY, S.P.; TORQUATO, R.J.S.; LEBRUN, I.; TANAKA, A.P.; SANO-MARTINS, I.S. (2006). Purification of a phospholipase A2 from *Lonomia obliqua* caterpillar bristle extract. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 342:1027–1033.

SILVA, R.F.M.; FALCÃO, A.S.; FERNANDES, A., GORDO, A.C.; BRITO, M.A.; BRITES, D. (2006). Dissociated primary nerve cell cultures as models for assessment of neurotoxicity. **Toxicol. Lett.** 163:1-9.

SOUZA, A.P.B.; PEIXOTO, C.C.; MARANGA, L.; CARVALHAL, A.V.; MORAES, R.H.P.; MENDONÇA, R.M.Z.; PEREIRA, C.A.; CARRONDO, M.J.T.; MENDONÇA, R.Z.

(2005). Purification and characterization of an anti-apoptotic protein isolated from *Lonomia obliqua* hemolymph. **Biotechnol. Progr.** 21:99-105.

SPECHT, A.; CORSEUIL, E.; ABELLA, H.B. (2008). **Lepidópteros de importância médica**: principais espécies no Rio Grande do Sul. Pelotas: USEB, 240 p.

SPECHT, A.; AZEVEDO, J.L.; LIMA, E.A.L.A.; BOLDO, J.T.; MARTINS, M.K.; LORINI, L.M.; BARROS, N.M. (2009). Ocorrência do fungo entomopatogênico *Isaria javanica* (Frieder. & Bally) Samson & Hywell-Jones (Fungi, Sordariomycetes) em lagartas de *Lonomia obliqua* Walker (Lepidoptera, Saturniidae, Hemileucinae). **Rev. Bras. Entomol.** 53(3):493–494.

STROBER, W. (2001). Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. **Cur. Protoc. Immunol.** 21:3B:A.3B.1–A.3B.2.

TERRA, R.M.S. (2010). Venômica: Identificação de proteínas envolvidas na fisiopatologia de envenenamentos animais. **Tese de doutoramento**. Centro de Biotecnologia. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Brasil.

TERRA, R.M.S.; PINTO, A.F.M.; SHEMAN, N.E.; FOX, J.W.; GUIMARÃES, J.A. (2010). *Lonomia obliqua* venomous secretion: proteomic approach reveals new toxic proteins involved in the hemorrhagic syndrome. Dados não publicados. *In*: TERRA, R.M.S. (2010). Venômica: Identificação de proteínas envolvidas na fisiopatologia de envenenamentos

animais. **Tese de doutoramento.** Centro de Biotecnologia. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Brasil.

UNITED NATIONS. (2009). Department of Economic and Social Affairs, Population Division. **World Population Prospects: The 2008 Revision, Highlights, Working Paper No. ESA/P/WP. 210.**

VEENSTRA, T.D. (1999). Electrospray ionization mass spectrometry: A promising new technique in the study of protein/DNA noncovalent complexes. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 257:1–5.

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

VEIGA, A.B.G.; RIBEIRO, J.M.C.; GUIMARÃES, J.A.; FRANCISCHETTI, I.M.B. (2005). A catalog for the transcripts from the venomous structures of the caterpillar *Lonomia obliqua*: Identification of the proteins potentially involved in the coagulation disorder and hemorrhagic syndrome. **Gene.** 355:11–27.

VIEIRA, H.L.A.; PEREIRA A.C.P.; PEIXOTO, C.C.; MORAES, R.H.P.; ALVES, P.M.; MENDONÇA, R.Z. (2010). Improvement of recombinant protein production by an anti-apoptotic protein from hemolymph of *Lonomia obliqua*. **Cytotechnology.** 62:547-555.



WAISMAM, K.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M.; CARRIJO-CARVALHO, L.C.; PACHECO, M.T.F.; FARSKY, S.H.P. (2009). Lopap: A non-inflammatory and cytoprotective molecule in neutrophils and endothelial cells. **Toxicol.** 53:652-659.

WANG, H.; CHANG-WONG, T.; TANG, H.Y.; SPEICHER, D.W. (2010). Comparison of extensive protein fractionation and repetitive LC-MS/MS analyses on depth of analysis for complex proteomes. **J. Proteome Res.** 9(2):1032-1040.

WERTZ, I.E.; HANLEY, M.R. (1996). Diverse molecular provocation of programmed cell death. **Trends Biochem. Sci.** 21:359-364.

WESSEL, D.; FLÜGGE, U.I. (1984). A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. **Anal Biochem.** 138(1):141-143.

WEST, M.J.; COLEMAN, P.D.; FLOOD, D.G.; TRONCOSO, J.C. (1994). Differences in the pattern of hippocampal neuronal loss in normal ageing and Alzheimer's disease. **Lancet.** 344:769-772.

WHITMORE, E.; GILBERT, L.I. (1974). Haemolymph proteins and lipoproteins in Lepidoptera – A comparative electrophoretic study. **Comp. Biochem. Physiol.** 47:63-78.

WHITTEMORE, E.R.; LOO, D.T.; WATT, J.A.; COTMANS, C.W. (1995). A detailed analysis of hydrogen peroxide-induced cell death in primary neuronal culture. **Neuroscience.** 67(4):921-932.

WILKINS, M.R.; WILLIAMS, K.L.; APPEL, R.D.; HOCHSTRASSER, D.F. (Eds.) (1997).

**Proteome research:** New frontiers in functional genomics. New York: Springer. 243 p.

WOLFF, J.L.C.; MORAES, R.H.P.; KITAJIMA, E.; LEAL, E.S.; ZANOTTO, P.M.A.

(2002). Identification and characterization of a baculovirus from *Lonomia obliqua* (Lepidoptera: Saturniidae). **J. Inverteb. Pathol.** 79:137–145.

XIE, C.; MARKESBERY, W.R.; LOVELL, M.A. (2000). Survival of hippocampal and

cortical neurons in a mixture of MEM+ and B27-supplemented neurobasal medium. **Free**

**Rad. Biol. Med.** 28(5):665-672.

YATES, J.R.; RUSE, C.I.; NAKORCHEVSKI, A. (2009). Proteomics by mass spectrometry:

approaches, advances, and applications. **Annu. Rev. Biomed. Eng.** 11:49-79.

ZANNIN, M.; LOURENÇO, D.M.; MOTTA, G.; DALLA COSTA, L.R.; GRANDO, M.;

GAMBORGI, G.P.; NOGUTI, M.A.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M. (2003). Blood

coagulation and fibrinolytic factors in 105 patients with hemorrhagic syndrome caused by

accident contact with *Lonomia obliqua* caterpillar in Santa Catarina, Southern Brazil.

**Thromb. Haemost.** 89(2):355-364.

## ANEXOS

**ANEXO A - Autorização Especial de Acesso ao Patrimônio Genético nº 02001.004238/2013-52 (CGEN).**



MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE  
INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS  
Diretoria de Uso Sustentável da Biodiversidade e Florestas  
Coordenação de Geração de Conhecimento dos Recursos Fainísticos e Pesquisas  
SCEN Trcho 2 Ed. Sede do Ibama - Ca. Postal nº 09566 Brasília - DF  
CEP: 70818-900 e (61) 3316-1475  
www.ibama.gov.br

OF 02001.013646/2014-86 COCFP/IBAMA

Brasília, 01 de dezembro de 2014.

A Sua Magnificência o Senhor  
Isidoro Zorzi  
Reitor da Fundação Universidade de Caxias do Sul  
R. FRANCISCO GETÚLIO VARGAS  
CAXIAS DO SUL - RIO GRANDE DO SUL  
CEP.: 95070560

Assunto: **Acesso ao patrimônio genético.**

Magnífico Reitor,

Informamos que o projeto de pesquisa Avaliação da atividade da hemolinfa e extrato de cerdas da lagarta *Lanomia obliqua* Walker, 1855 (Lepidoptera: Saturniidae) em células de hipocampo de ratos Wistar, coordenado pelo pesquisador Sidnei Moura e Silva, processo nº 02001.004238/2013-52, foi incluído no portfólio da Autorização Especial de Acesso ao Patrimônio Genético da Universidade Caxias do Sul.

Atenciosamente,

**MARIA IZABEL SOARES GOMES DA SILVA**  
Coordenadora da COCFP/IBAMA

**ANEXO B – Autorização SISBIO nº 42780-1 para atividades com finalidade científica MMA-ICMBio (Ministério do Meio Ambiente – Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade).**



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

**Autorização para atividades com finalidade científica**

Número: 42780-1	Data da Emissão: 29/05/2014 13:42	Data para Revalidação*: 28/06/2015
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

**Dados do titular**

Nome: Sidnei Moura e Silva	CPF: 802.383.780-04
Título do Projeto: Avaliação da atividade da hemolinfa e extrato de cerdas da lagarta Lonormia obliqua Walker, 1855 (Lepidoptera: Saturniidae) em células de hipocampo de ratos Wistar	
Nome da Instituição: FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL	CNPJ: 88.648.761/0001-03

**Cronograma de atividades**

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta das lagartas na natureza	02/2014	03/2014
2	Extração e processamento das cerdas e hemolinfa	03/2014	04/2014
3	Fracionamento cromatográfico das amostras	04/2014	06/2014
4	Avaliação da ação das frações de hemolinfa sobre a sobrevivência celular de cultivos de células de h	04/2014	10/2014
5	Caracterização química das amostras	05/2014	07/2014
6	avaliação dos resultados e redação dos artigos científicos	10/2014	03/2015

**Observações e ressalvas**

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e mineralia, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, possessor ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa IBAMA nº 154/2007 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen.
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

**Equipe**

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Silviane Maggi	pesquisador	814.669.510-87	7080576213 SJS-RS	Brasileira

**Locais onde as atividades de campo serão executadas**

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	CAXIAS DO SUL	RS	caxias do sul	Fora de UC Federal
2		RS	passo fundo	Fora de UC Federal

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

**Código de autenticação: 41612182**



Página 1/4



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 42780-1	Data da Emissão: 29/05/2014 13:42	Data para Revalidação*: 28/06/2015
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: Sidnei Moura e Silva	CPF: 802.383.780-04
Título do Projeto: Avaliação da atividade da hemolinfa e extrato de cerdas da lagarta Lonomia obliqua Walker, 1855 (Lepidoptera: Saturniidae) em células de hipocampo de ratos Wistar	
Nome da Instituição : FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL	CNPJ: 88.648.761/0001-03

\* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

**Código de autenticação: 41612182**



Página 4/4

**ANEXO C** – Ofício CEUA/FCF nº 58.2014-P459 – Certificado de aprovação do Protocolo CEUA/FCF nº 459 pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF-USP).



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Ofício CEUA/FCF 58.2014-P459

### **CERTIFICADO**

A Comissão de Ética no Uso de Animais, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da Universidade de São Paulo, **CERTIFICA** que o Projeto de Pesquisa “**Avaliação da atividade protetora de frações da hemolinfa e extrato de cerdas de Lonomia obliqua Walker, 1855 (Lepidoptera, Saturniidae) em cultura primária de células hipocâmpais de ratos Wistar**” (Protocolo CEUA/FCF/459), de responsabilidade do(a) **Profa. Dra. Tania Marcourakis**, está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** em reunião de **11 de abril de 2014**. Conforme a legislação vigente, deverá ser apresentado, no encerramento deste Projeto de Pesquisa, o respectivo **relatório final**.

São Paulo, 11 de junho de 2014.

Assinatura manuscrita em tinta azul do Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins.

**Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins**  
Coordenador da CEUA/FCF/USP

## APÊNDICE

### APÊNDICE A – Tabelas 9 a 15. Proteínas identificadas na hemolinfa e frações.

**Tabela 9.** Proteínas identificadas na fração de hemolinfa de *L. obliqua* do Lote 1.

Nº de Acesso	Proteína	MM Proteína (Da)	Nº de Peptídeos Únicos	Cobertura (%)	Contagem Espectral
gi 56462146 gb AAV91356.1	Fator de alongamento 1 [LO]	46.667,3	3	5,8	5
gi 94471613 gb ABF21073.1	Hemolina [LO]	45.068,1	4	71,9	204
gi 94471609 gb ABF21071.1	Hemolina [LO]	45.543,3	17	68,5	176
gi 94471607 gb ABF21070.1	Hemolina [LO]	45.094,1	6	73,1	196
gi 236202 gb AAB19941.1	Achelase I (Proteinase fibrinolítica) [LA]	22.440,0	4	26,3	15
gi 236201 gb AAB19940.1	Achelase II (Proteinase fibrinolítica) [LA]	22.694,1	1	6,1	3
gi 74903288 sp Q5MGH0.1 SPI3_LONON	Inibidor de serino protease 3/4 (Serpina - 3/4) [LO]	43.149,5	6	22,2	13
gi 56462332 gb AAV91449.1	Inibidor de protease 7 [LO]	10.200,1	2	34,7	13
gi 56462274 gb AAV91420.1	Precursor de cistatina putativo1 [LO]	13.195,8	1	12,5	2
gi 56462328 gb AAV91447.1	Lipocalina 1 [LO]	22.401,2	0	22,9	6
gi 56462308 gb AAV91437.1	Proteína hipotética 22 (parcial) [LO]	19.090,4	2	69,5	2
gi 374259680 gb AEZ02311.1	Proteína antiviral putativa [LO]	19.761,0	4	24,7	10

[LO]: *Lonomia obliqua*; [LA]: *Lonomia achelous*; MM: Massa Molecular.

**Tabela 10.** Proteínas identificadas na fração de hemolinfa de *L. obliqua* do Lote 2.

Nº de Acesso	Proteína	MM Proteína (Da)	Nº de Peptídeos Únicos	Cobertura (%)	Contagem Espectral
gi 74767372 sp Q5MGQ0.1 DFP1_LONON	Proteína de defesa putativa 1(DFP-1) [LO]	17.772,0	24	87,5	141
gi 56462366 gb AAV91466.1	Proteína sensorial 1 [LO]	14.465,1	21	77,2	131
gi 56462368 gb AAV91467.1	Proteína sensorial 2 [LO]	12.677,5	4	61,6	7
gi 94471609 gb ABF21071.1	Hemolina [LO]	45.543,3	84	90,3	733
gi 94471613 gb ABF21073.1	Hemolina [LO]	45.068,1	6	89,1	569
gi 94471607 gb ABF21070.1	Hemolina [LO]	45.094,1	8	88,1	604
gi 94471611 gb ABF21072.1	Hemolina [LO]	45.108,1	4	89,1	561
gi 56462148 gb AAV91357.1	Ferritina 1 [LO]	25.657,9	4	10,6	5
gi 56462300 gb AAV91433.1	Proteína do tipo serino protease putativa 2 [LO]	32.107,1	10	45,0	27
gi 56462344 gb AAV91455.1	Serino protease 7 [LO]	30.465,2	3	10,4	4
gi 236202 gb AAB19941.1	Achelase I (proteínase fibrinolítica) [LA]	22.440,0	4	26,3	7
gi 56462350 gb AAV91458.1	Fator ativador de profenoloxidase 1 (parcial) [LO]	42.849,2	6	12,3	12
gi 56462332 gb AAV91449.1	Inibidor de protease 7 [LO]	10.200,1	4	56,8	13
gi 56462286 gb AAV91426.1	Inibidor de protease putativo 4 [LO]	10.945,1	8	74,5	18
gi 56462296 gb AAV91431.1	Inibidor de serino protease 4 (parcial) [LO]	36.392,9	5	86,3	241
gi 74903288 sp Q5MGH0.1 SPI3_LONON	Inibidor de serino protease 3/4 (Serpina - 3/4) [LO]	43.149,5	2	69,2	246
gi 56462274 gb AAV91420.1	Precursor de cistatina putativo 1 [LO]	13.195,8	13	78,3	58
gi 56462328 gb AAV91447.1	Lipocalina 1 [LO]	22.401,2	7	92,0	1.148
gi 56462280 gb AAV91423.1	Lipocalina 4 [LO]	21.684,8	5	89,3	909
gi 56462354 gb AAV91460.1	Lectina 5 [LO]	18.217,9	4	24,7	10
gi 56462322 gb AAV91444.1	Proteína hipotética 31 [LO]	24.934,4	19	68,0	49
gi 56462278 gb AAV91422.1	Proteína hipotética 21 (parcial) [LO]	30.890,2	3	4,4	3
gi 56462178 gb AAV91372.1	Proteína hipotética 4 [LO]	12.248,0	1	12,6	4
gi 56462166 gb AAV91366.1	Proteína hipotética 13 [LO]	16.893,4	2	13,2	2
gi 56462380 gb AAV91473.1	Proteína hipotética 38 [LO]	15.212,1	2	6,1	3
gi 56462164 gb AAV91365.1	Proteína hipotética 12 (parcial) [LO]	20.852,9	2	10,3	3
gi 229462770 sp P85249.2 UP04_LONON	Proteína desconhecida 4	2.831,5	2	88,0	4
gi 229462771 sp P85251.2 UP06_LONON	Proteína desconhecida 6	2.500,3	1	70,8	1
gi 229462769 sp P85248.2 UP03_LONON	Proteína desconhecida 3	2.107,1	1	55,6	2
gi 56462276 gb AAV91421.1	Proteína do tipo esterase 1 [LO]	7.566,8	1	23,8	5
gi 374259680 gb AEZ02311.1	Proteína antiviral putativa [LO]	19.761,0	45	91,0	487
gi 56462338 gb AAV91452.1	Cisteíno peptidase 2 do tipo catepsina-B [LO]	36.881,7	4	16,3	7

[LO]: *Lonomia obliqua*; [LA]: *Lonomia achelous*; MM: Massa Molecular.



**Tabela 11.** Proteínas identificadas na fração de hemolinfa de *L. obliqua* do Lote 3.

Nº de Acesso	Proteína	MM Proteína (Da)	Nº de Peptídeos Únicos	Cobertura (%)	Contagem Espectral
gi 74767372 sp Q5MGQ0.1 DFP1_LONON	Proteína de defesa putativa 1 (DFP-1) [LO]	17.772,0	9	72,6	28
gi 56462366 gb AAV91466.1	Proteína sensorial 1 [LO]	14.465,1	24	70,0	187
gi 56462368 gb AAV91467.1	Proteína sensorial 2 [LO]	12.677,5	6	53,6	18
gi 56462262 gb AAV91414.1	Tropomiosina 1 [LO]	32.510,6	5	16,9	6
gi 94471613 gb ABF21073.1	Hemolina [LO]	45.048,1	0	79,7	601
gi 94471609 gb ABF21071.1	Hemolina [LO]	45.543,3	52	81,4	482
gi 94471607 gb ABF21070.1	Hemolina [LO]	45.094,1	5	81,4	571
gi 94471611 gb ABF21072.1	Hemolina [LO]	45.108,1	3	78,4	595
gi 56462364 gb AAV91465.1	Proteína de choque térmico 4 (cognato da proteína de choque térmico 70) [LO]	71.440,4	23	40,4	74
gi 56462350 gb AAV91458.1	Fator ativador de profenoloxidase 1, (parcial) [LO]	42.849,2	49	64,8	172
gi 236202 gb AAB19941.1	Achelase I (proteínase fibrinolítica) [LA]	22.440,0	25	62,0	137
gi 236201 gb AAB19940.1	Achelase II (proteínase fibrinolítica) [LA]	22.694,1	12	51,9	97
gi 56462332 gb AAV91449.1	Inibidor de protease 7 [LO]	10.200,1	10	57,9	42
gi 56462286 gb AAV91426.1	Inibidor de protease putativo 4 [LO]	10.945,1	2	32,3	3
gi 74903288 sp Q5MGH0.1 SPI3_LONON	Inibidor de serino protease 3/4 (Serpina-3/4) [LO]	43.149,5	2	52,2	106
gi 56462296 gb AAV91431.1	Inibidor de serino protease 4 (parcial) [LO]	36.392,9	7	69,9	156
gi 56462340 gb AAV91453.1	Inibidor de protease 6 [LO]	9.268,5	1	12,8	1
gi 56462274 gb AAV91420.1	Precursor de cistatina putativo 1 [LO]	13.195,8	14	73,3	40
gi 156632705 sp Q5ECE3.2 LOPAP_LONON	Lopap (Lipocalina-1/4; Ativador de Protrombina)	22.400,2	0	92,0	1.025
gi 56462328 gb AAV91447.1	Lipocalina 1 [LO]	22.401,2	3	92,0	1.026
gi 56462280 gb AAV91423.1	Lipocalina 4 [LO]	21.684,8	3	81,2	808
gi 56462164 gb AAV91365.1	Proteína hipotética 12 (parcial) [LO]	20.852,9	3	11,7	7
gi 56462380 gb AAV91473.1	Proteína hipotética 38 [LO]	15.212,1	3	11,5	7
gi 229462769 sp P85248.2 UP03_LONON	Proteína desconhecida 3	2.107,1	2	55,6	3
gi 59709575 gb AAW88441.1	Ativador de protrombina [LO]	22.472,2	2	87,1	890
gi 374259680 gb AEZ02311.1	Proteína antiviral putativa [LO]	19.761,0	25	74,7	154
gi 56462338 gb AAV91452.1	Cisteíno peptidase 2 do tipo catepsina-B [LO]	36.881,7	12	41,4	25
gi 56462276 gb AAV91421.1	Proteína do tipo esterase 1 [LO]	7.566,8	3	42,9	11

[LO]: *Lonomia obliqua*; [LA]: *Lonomia achelous*; MM: Massa Molecular.

**Tabela 12.** Proteínas identificadas na hemolinfa bruta de *L. obliqua* do Lote 1.

Nº de Acesso	Proteína	MM Proteína (Da)	Nº de Peptídeos Únicos	Cobertura (%)	Contagem Espectral
gi 56462256 gb AAV91411.1	Cadeia leve da miosina 1 [LO]	13.195,8	2	11,11	4
gi 56462146 gb AAV91356.1	Fator de alongamento [LO]	46.667,3	21	42,6	59
gi 74767372 sp Q5MGQ0.1 DFP1_LONON	Proteína de defesa putativa 1 (DFP-1) [LO]	17.772,0	5	44,65	11
gi 94471609 gb ABF21071.1	Hemolina [LO]	45.543,3	10	53,59	78
gi 94471613 gb ABF21073.1	Hemolina [LO]	45.068,1	3	63,08	61
gi 94471607 gb ABF21070.1	Hemolina [LO]	45.094,1	3	64	98
gi 94471611 gb ABF21072.1	Hemolina [LO]	45.108,1	2	62,23	97
gi 56462364 gb AAV91465.1	Proteína de choque térmico 4 (cognato da proteína de choque térmico 70) [LO]	71.540,4	62	69,26	368
gi 56462244 gb AAV91405.1	Proteína ribossomal 7 [LO]	11.269,6	5	65,46	13
gi 56462250 gb AAV91408.1	Actina 1 [LO]	32.918,5	16	42,18	84
gi 56462366 gb AAV91466.1	Proteína sensorial 1 [LO]	14.465,1	15	66,14	67
gi 56462158 gb AAV91362.1	Proteína de choque térmico 3 [LO]	21.429,1	8	50,36	28
gi 56462154 gb AAV91360.1	Proteína de choque térmico 1 [LO]	21.880,2	2	13,54	16
gi 56462198 gb AAV91382.1	Proteína ribossomal 11 (subunidade maior) [LO]	12.282,7	2	13,46	2
gi 56462216 gb AAV91391.1	Proteína ribossomal subunidade S19 [LO]	16.981,2	3	8,85	5
gi 56462240 gb AAV91403.1	Proteína ribossomal subunidade 5 [LO]	15.994,8	3	10,26	3
gi 56462238 gb AAV91402.1	Proteína ribossomal subunidade 4 [LO]	17.950,6	2	7,1	3
gi 56462300 gb AAV91433.1	Proteína do tipo serino protease putativa 2 [LO]	32.107,1	11	39,41	22
gi 63207765 gb AAV91432.2	Serino protease 1 [LO]	57.249,9	4	2,31	5
gi 56462350 gb AAV91458.1	Fator ativador de profenoloxidase 1 (parcial) [LO]	42.849,2	30	64,24	100
gi 236202 gb AAB19941.1	Achelase I (proteínase fibrinolítica) [LA]	22.440,0	8	51,48	20
gi 236201 gb AAB19940.1	Achelase II (proteínase fibrinolítica) [LA]	22.694,1	4	21,49	7
gi 56462332 gb AAV91449.1	Inibidor de protease 7 [LO]	10.200,1	2	34,74	6
gi 74903288 sp Q5MGH0.1 SPI3_LONON	Inibidor de serino protease 3/4 [LO]	43.149,5	2	46,74	140
gi 56462296 gb AAV91431.1	Inibidor de serino protease 4 (parcial) [LO]	36.392,9	2	56,83	136
gi 56462292 gb AAV91429.1	Serpina 2 [LO]	43.718,4	2	26,24	33
gi 56462290 gb AAV91428.1	Serpina 1 [LO]	43.694,3	0	26,24	32
gi 56462274 gb AAV91420.1	Precursor de cistatina putativo1[LO]	13.195,8	7	50,83	36
gi 56462328 gb AAV91447.1	Lipocalina 1 [LO]	22.401,2	31	90,55	574
gi 56462306 gb AAV91436.1	Lectina 1 imunolectina putativa [LO]	60.247,9	2	5,91	3
gi 56462334 gb AAV91450.1	Lectina 3 [LO]	36.305,4	1	9,97	2
gi 56462360 gb AAV91463.1	Lectina 4 tipo C [LO]	17.131,2	2	14,87	6
gi 56462354 gb AAV91460.1	Lectina 5 [LO]	18.217,9	2	14,81	9
gi 56462322 gb AAV91444.1	Proteína hipotética 31 [LO]	24.934,4	30	68,15	307
gi 56462310 gb AAV91438.1	Proteína hipotética 23 (parcial) [LO]	16.600,9	5	18,32	9
gi 56462188 gb AAV91377.1	Proteína hipotética 9 (parcial) [LO]	20.470,4	3	11,83	15
gi 56462308 gb AAV91437.1	Proteína hipotética 22 (parcial) [LO]	19.090,4	8	53,09	39
gi 56462184 gb AAV91375.1	Proteína hipotética 7 (parcial) [LO]	12.629,2	2	16,96	3

gi 56462174 gb AAV91370.1	Proteína hipotética 2 [LO]	24.899,2	10	36,82	38
gi 56462166 gb AAV91366.1	Proteína hipotética 13 [LO]	16.893,4	27	89,92	333
gi 56462160 gb AAV91363.1	Proteína hipotética 10 (parcial) [LO]	22.578,4	10	58,29	33
gi 56462176 gb AAV91371.1	Proteína hipotética 3 [LO]	24.331,3	10	42,55	32
gi 56462164 gb AAV91365.1	Proteína hipotética 12 (parcial) [LO]	20.852,9	4	26,33	9
gi 56462162 gb AAV91364.1	Proteína hipotética 11 (parcial) [LO]	29.617,2	14	49,34	44
gi 229462769 sp P85248.2 UP03_LONON	Proteína desconhecida 3	2.107,1	2	51,85	3
gi 229462770 sp P85249.2 UP04_LONON	Proteína desconhecida 4	2.831,5	1	52,00	1
gi 56462254 gb AAV91410.1	Proteína LIM 1 [LO]	10.089,7	2	19,86	3
gi 74837218 sp Q5MGM6.1 TCTP_LONON	Homólogo da proteína tumoral controlado traducionalmente (TCTP) [LO]	19.907,8	16	76,94	72
gi 374259680 gb AEZ02311.1	Proteína antiviral putativa [LO]	19.761	41	89,14	575
gi 56462272 gb AAV91419.1	Cisteína peptidase 1 catepsina-L-like, (parcial) [LO]	7.051,5	2	40,00	6
gi 56462276 gb AAV91421.1	Proteína do tipo esterase 1 [LO]	7.566,8	1	23,81	4

[LO]: *Lonomia obliqua*; [LA]: *Lonomia achelous*; MM: Massa Molecular.

**Tabela 13.** Proteínas identificadas na hemolinfa bruta de *L. obliqua* do Lote 2.

Nº de Acesso	Proteína	MM Proteína (Da)	Nº de Peptídeos Únicos	Cobertura (%)	Contagem Espectral
gi 56462262 gb AAV91414.1	Tropomiosina 1 [LO]	32.510,6	8	13,03	10
gi 56462148 gb AAV91357.1	Ferritina 1 [LO]	25.657,9	5	14,60	6
gi 56462272 gb AAV91419.1	Cisteíno peptidase 1 do tipo catepsina-L (parcial) [LO]	7.051,5	3	40,00	6
gi 56462146 gb AAV91356.1	Fator de alongamento 1 [LO]	46.667,3	12	27,49	34
gi 56462366 gb AAV91466.1	Proteína sensorial 1 [LO]	14.465,1	18	78,48	96
gi 56462368 gb AAV91467.1	Proteína sensorial 2 [LO]	12.677,5	5	40,18	8
gi 56462364 gb AAV91465.1	Proteína de choque térmico 4 (cognato da proteína de choque térmico 70) [LO]	71.540,4	34	48,17	97
gi 56462244 gb AAV91405.1	Proteína ribossomal 7 [LO]	11.269,6	2	16,81	4
gi 56462250 gb AAV91408.1	Actina 1 [LO]	32.918,5	17	44,11	85
gi 94471611 gb ABF21072.1	Hemolina [LO]	45.108,1	2	81,03	409
gi 94471609 gb ABF21071.1	Hemolina [LO]	45.543,3	55	85,31	589
gi 94471613 gb ABF21073.1	Hemolina [LO]	45.068,1	6	80,79	423
gi 94471607 gb ABF21070.1	Hemolina [LO]	45.094,1	4	80,06	402
gi 74767372 sp Q5MGQ0.1 DFP1_LONON	Proteína de defesa putativa 1 (DFP-1) [LO]	17.772,0	14	77,58	81
gi 74837218 sp Q5MGM6.1 TCTP_LONON	Homólogo da proteína tumoral traducionalmente controlada (TCTP) [LO]	19.907,8	8	42,05	19
gi 56462256 gb AAV91411.1	Cadeia leve da miosina 1 [LO]	16.644,2	4	13,67	4
gi 56462126 gb AAV91346.1	Proteína da cutícula 1 [LO]	11.468,7	4	32,09	4
gi 56462132 gb AAV91349.1	Proteína da cutícula 4 [LO]	12.136,2	3	19,52	7
gi 56462300 gb AAV91433.1	Proteína do tipo serino protease putativa 2[LO]	32.107,1	17	49,64	34
gi 63207768 gb AAV91457.2	Serino protease 6 [LO]	35.475,6	2	6,77	3
gi 56462304 gb AAV91435.1	Serino protease 4 (parcial) [LO]	25.881,8	5	29,55	9
gi 56462344 gb AAV91455.1	Serino protease 7 [LO]	30.465,2	6	19,88	8
gi 56462350 gb AAV91458.1	Fator ativador de profenoloxidase 1 (parcial) [LO]	42.849,2	34	67,34	123
gi 236202 gb AAB19941.1	Achelase I (proteínase fibrinolítica) [LA]	22.440,0	12	58,06	29
gi 56462274 gb AAV91420.1	Precursor de cistatina putativo 1[LO]	13.195,8	9	62,50	124
gi 56462332 gb AAV91449.1	Inibidor de protease 7 [LO]	10.200,1	9	56,84	33
gi 56462296 gb AAV91431.1	Inibidor de serino protease 4 (parcial) [LO]	36.392,9	6	71,12	363
gi 56462290 gb AAV91428.1	Serpina 1 [LO]	43.694,3	1	35,02	47
gi 56462292 gb AAV91429.1	Serpina 2 [LO]	43.718,4	5	35,02	54
gi 74903288 sp Q5MGH0.1 SPI3_LONON	Inibidor de serino protease inhibitor 3/4	43.149,5	12	63,62	359
gi 56462282 gb AAV91424.1	Inibidor de protease 1 [LO]	17.007,0	2	15,48	2
gi 56462288 gb AAV91427.1	Inibidor de protease 5 (parcial) [LO]	9.633,5	1	25,58	1
gi 56462286 gb AAV91426.1	Inibidor de protease putativo 4 [LO]	10.945,1	6	65,03	11
gi 56462280 gb AAV91423.1	Lipocalina 4 [LO]	21.684,8	5	70,39	757
gi 56462328 gb AAV91447.1	Lipocalina 1 [LO]	22.401,2	12	87,23	914
gi 56462306 gb AAV91436.1	Lectina 1 imunolectina putativa [LO]	60.247,9	1	4,34	3
gi 56462334 gb AAV91450.1	Lectina 3 [LO]	36.305,4	1	6,96	3
gi 56462354 gb AAV91460.1	Lectina 5 [LO]	18.217,9	3	19,96	7
gi 56462172 gb AAV91369.1	Proteína hipotética [LO]	17.411,1	2	12,04	4

gi 56462174 gb AAV91370.1	Proteína hipotética 2 [LO]	24.899,2	6	30,00	10
gi 56462176 gb AAV91371.1	Proteína hipotética 3 [LO]	24.331,3	9	41,47	33
gi 56462188 gb AAV91377.1	Proteína hipotética 9 (parcial) [LO]	20.470,4	5	10,75	6
gi 56462160 gb AAV91363.1	Proteína hipotética 10 (parcial) [LO]	22.578,4	22	65,88	65
gi 56462162 gb AAV91364.1	Proteína hipotética 11 (parcial) [LO]	29.617,2	7	38,30	12
gi 56462164 gb AAV91365.1	Proteína hipotética 12 (parcial) [LO]	20.852,9	5	32,65	18
gi 56462166 gb AAV91366.1	Proteína hipotética 13 [LO]	16.893,4	15	83,12	103
gi 56462308 gb AAV91437.1	Proteína hipotética 22 (parcial) [LO]	19.090,4	89	89,71	745
gi 56462310 gb AAV91438.1	Proteína hipotética 23 (parcial) [LO]	16.600,9	6	21,19	9
gi 56462322 gb AAV91444.1	Proteína hipotética 31 [LO]	24.934,4	57	72,74	502
gi 56462380 gb AAV91473.1	Proteína hipotética 38 [LO]	15.212,1	4	22,56	11
gi 229462769 sp P85248.2 UP03_LONON	Proteína desconhecida 3	2.107,1	3	55,56	7
gi 229462770 sp P85249.2 UP04_LONON	Proteína desconhecida 4	2.831,5	1	52,00	3
gi 56462320 gb AAV91443.1	Peptídeo putative secretado 30 [LO]	7.014,6	7	64,52	28
gi 56462338 gb AAV91452.1	Cisteíno peptidase 2 do tipo catepsina-B [LO]	36.881,7	7	7,99	15
gi 374259680 gb AEZ02311.1	Proteína antiviral putativa [LO]	19.761,0	79	91,01	2.694
gi 56462276 gb AAV91421.1	Proteína do tipo esterase 1 [LO]	7.566,8	2	23,81	7

[LO]: *Lonomia obliqua*; [LA]: *Lonomia achelous*; MM: Massa Molecular.

**Tabela 14.** Proteínas identificadas na hemolinfa bruta de *L. obliqua* do Lote 3.

Nº de Acesso	Proteína	MM Proteína (Da)	Nº de Peptídeos Únicos	Cobertura (%)	Contagem Espectral
gi 56462146 gb AAV91356.1	Fator de alongamento 1 [LO]	46.667,3	3	4,44	5
gi 374259680 gb AEZ02311.1	Proteína antiviral putativa [LO]	19.761	58	81,65	913
gi 56462272 gb AAV91419.1	Cisteíno peptidase do tipo catepsina-L (parcial) [LO]	7.051,5	3	30,77	4
gi 56462366 gb AAV91466.1	Proteína sensorial 1 [LO]	14.465,1	16	59,32	36
gi 56462368 gb AAV91467.1	Proteína sensorial 2 [ <i>L. obliqua</i> ]	12.677,5	3	15,77	5
gi 94471609 gb ABF21071.1	Hemolina [LO]	45.543,3	25	69,09	204
gi 94471613 gb ABF21073.1	Hemolina [LO]	45.068,1	5	56,17	154
gi 94471607 gb ABF21070.1	Hemolina [LO]	45.094,1	5	57,87	153
gi 56462262 gb AAV91414.1	Tropomiosina 1 [LO]	32.510,6	3	7,16	3
gi 74837218 sp Q5MGM6.1 TCTP_LONON	Homólogo da proteína tumoral controlada traducionalmente (TCTP) [LO]	19.907,8	13	51,35	38
gi 56462364 gb AAV91465.1	Proteína de choque térmico 4 (Cognato da proteína de choque térmico 70) [LO]	71.540,4	22	30,12	54
gi 56462148 gb AAV91357.1	Ferritina 1 [LO]	25.657,9	9	29,65	20
gi 158451473 gb ABW39097.1	Proteína dopa-decarboxilase putativa (parcial) [LA]	46.048,6	6	15,90	11
gi 158451475 gb ABW39098.1	Proteína dopa-decarboxilase putativa (parcial) [LA]	30.141,2	1	11,42	5
gi 74767372 sp Q5MGQ0.1 DFP1_LONON	Proteína de defesa putativa 1 (DFP-1)	17.772,0	8	45,04	15
gi 56462350 gb AAV91458.1	Fator ativador de profenoloxidase 1 (parcial) [LO]	42.849,2	48	54,19	189
gi 236202 gb AAB19941.1	Achelase I (proteínase fibrinolítica) [LA]	22.440,0	25	65,73	156
gi 56462300 gb AAV91433.1	Proteína do tipo serino protease putativa 2 [LO]	32.107,1	17	42,50	50
gi 56462302 gb AAV91434.1	Serino protease 3 [LO]	29.636,7	4	6,50	6
gi 56462304 gb AAV91435.1	Serino protease 4 (parcial)	25.881,8	7	31,73	20
gi 74903288 sp Q5MGH0.1 SPI3_LONON	Inibidor de serino protease 3/4 (Serpina-3/4)	43.149,5	4	57,09	154
gi 56462296 gb AAV91431.1	Inibidor de serino protease 4 (parcial) [LO]	36.392,9	6	68,22	160
gi 56462282 gb AAV91424.1	Inibidor de protease 1 [LO]	17.007,0	5	25,16	8
gi 56462332 gb AAV91449.1	Inibidor de protease 7 [LO]	10.200,1	5	51,23	9
gi 56462274 gb AAV91420.1	Precursor de cistatina putativo 1 [LO]	13.195,8	17	60,55	106
gi 56462292 gb AAV91429.1	Serpina 2 [LO]	43.718,4	0	29,20	33
gi 56462290 gb AAV91428.1	Serpina 1 [LO]	43.694,3	1	29,20	34
gi 56462328 gb AAV91447.1	Lipocalina 1 [LO]	22.401,2	16	78,11	424
gi 156632705 sp Q5ECE3.2 LOPAP_LONON	Lopap (Lipocalin-1/4; Prothrombin activator)	22.400,2	1	79,35	415
gi 56462244 gb AAV91405.1	Proteína ribossomal 7 [LO]	11.269,6	3	35,14	5
gi 56462250 gb AAV91408.1	Actina 1 [LO]	32.918,5	9	29,93	32
gi 236201 gb AAB19940.1	Achelase II (proteínase fibrinolítica) [LA]	22.694,1	8	47,82	61
gi 56462334 gb AAV91450.1	Lectina 3 [LO]	36.305,4	8	24,51	12
gi 56462354 gb AAV91460.1	Lectina 5 [LO]	18.217,9	4	18,93	6
gi 56462174 gb AAV91370.1	Proteína hipotética 2 [LO]	24.899,2	2	11,21	3
gi 56462176 gb AAV91371.1	Proteína hipotética 3 [LO]	24.331,3	12	46,54	46
gi 56462160 gb AAV91363.1	Proteína hipotética 10 (parcial) [LO]	22.578,4	1	6,64	1
gi 56462162 gb AAV91364.1	Proteína hipotética 11 (parcial) [LO]	29.617,2	2	9,33	2
gi 56462164 gb AAV91365.1	Proteína hipotética 12 (parcial) [LO]	20.852,9	6	31,28	10

gi 56462166 gb AAV91366.1	Proteína hipotética 13 [LO]	16.893,4	8	45,61	46
gi 56462308 gb AAV91437.1	Proteína hipotética 22 (parcial) [LO]	19.090,4	13	47,12	51
gi 56462322 gb AAV91444.1	Proteína hipotética 31 [LO]	24.934,4	56	66,67	421
gi 229462769 sp P85248.2 UP03_LONON	Proteína desconhecida 3	2.107,1	3	55,56	7
gi 56462254 gb AAV91410.1	Proteína LIM 1 [LO]	10.089,7	3	20,21	3
gi 56462338 gb AAV91452.1	Cisteíno peptidase 2 do tipo catepsina-B [LO]	36.881,7	7	22,19	12
gi 56462276 gb AAV91421.1	Proteína do tipo esterase 1[LO]	7.566,8	4	55,03	8

[LO]: *Lonomia obliqua*; [LA]: *Lonomia achelous*; MM: Massa Molecular.

**Tabela 15.** Proteínas identificadas na hemolinfa bruta e frações dos 3 lotes com as respectivas abundâncias e atividades.

Nº de Acesso	Proteína	Média das contagens espectrais dos lotes das frações	Média das contagens espectrais dos lotes de hemolinfa	Atividade	Família	Método de identificação	Referência
AAV91447.1	Lipocalina 1 [LO]	727	637	Serino Protease (ativador de protrombina)	Lipocalinas	Transcriptoma	Reis <i>et al.</i> , 2001; Chudzinski-Tavassi <i>et al.</i> , 2001; Fritzen <i>et al.</i> ; 2005; Veiga <i>et al.</i> , 2005; Ricci-Silva <i>et al.</i> , 2008
AAV91423.1	Lipocalina 4 [LO]	572	252	Serino Protease (ativador de protrombina)	Lipocalinas	Transcriptoma	Reis <i>et al.</i> , 2001; Chudzinski-Tavassi <i>et al.</i> , 2001; Fritzen <i>et al.</i> ; 2005; Veiga <i>et al.</i> , 2005; Ricci-Silva <i>et al.</i> , 2008
Q5ECE3.2	Lopap (Lipocalina-1/4; Ativador de Protrombina)	342	138	Serino Protease (ativador de protrombina)	Lipocalinas	Transcriptoma	Reis <i>et al.</i> , 2001; Chudzinski-Tavassi <i>et al.</i> , 2001; Fritzen <i>et al.</i> ; 2005; Veiga <i>et al.</i> , 2005; Ricci-Silva <i>et al.</i> , 2008
AAW88441.1	Ativador de protrombina [LO]	297	0	Serino Protease (ativador de protrombina)	Lipocalinas	Transcriptoma	Reis <i>et al.</i> , 2001; Chudzinski-Tavassi <i>et al.</i> , 2001; Fritzen <i>et al.</i> ; 2005; Veiga <i>et al.</i> , 2005; Ricci-Silva <i>et al.</i> , 2008
AAB19941.1	Achelase I (proteínase fibrinolítica) [LA]	53	68	Serino protease (fibrinolítica)	Peptidase S1	Transcriptoma	Veiga <i>et al.</i> , 2005
AAB19940.1	Achelase II (proteínase fibrinolítica) [LA]	33	23	Serino protease (fibrinolítica)	Peptidase S1	Sequenciamento	Amarant <i>et al.</i> , 1991
AAV91458.1	Fator ativador de profenoxidase 1 (parcial) [LO]	61	137	Serino protease	Peptidase S1	Sequenciamento	Amarant <i>et al.</i> , 1991
AAV91433.1	Proteína do tipo serino protease putativa 2 [LO]	9	35	Serino Protease	NI	Transcriptoma	Veiga <i>et al.</i> , 2005
AAV91432.2	Serino protease 1 [LO]	0	2	Serino Protease	Peptidase S1	Transcriptoma	Veiga <i>et al.</i> , 2005
AAV91434.1	Serino protease 3 [LA]	0	2	Serino Protease	Peptidase S1	Transcriptoma	Veiga <i>et al.</i> , 2005
AAV91435.1	Serino protease 4 (parcial) [LO]	0	10	Serino Protease	Peptidase S1	Transcriptoma	Veiga <i>et al.</i> , 2005
AAV91457.2	Serino protease 6 [LO]	0	1	Serino Protease	Peptidase S1	Transcriptoma	Veiga <i>et al.</i> , 2005
AAV91455.1	Serino protease 7 [LO]	1	3	Serino protease	Peptidase S1	Transcriptoma	Veiga <i>et al.</i> , 2005
AAV91473.1	Proteína hipotética 38 [LO]	3	4	Cisteíno protease	NI	Transcriptoma	Veiga <i>et al.</i> , 2005
AAV91419.1	Cisteíno peptidase 1 do tipo catepsina-L (parcial) [LO]	0	5	Cisteíno protease	Cisteíno peptidases	Transcriptoma	Veiga <i>et al.</i> , 2005



AAV91452.1	Cisteíno peptidase 2 do tipo cathepsina-B [LO]	11	9	Cisteíno protease	Peptidase C1	Transcriptoma	Veiga <i>et al.</i> , 2005
AAV91424.1	Inibidor de protease 1 [LO]	0	3	Inibidor de protease	Kazal 1	Transcriptoma	Veiga <i>et al.</i> , 2005
Q5MGH0.1	Inibidor de serino protease 3/4 (Serpina - 3/4) [LO]	122	218	Inibidor de serino Protease	Serpinas	Transcriptoma	Veiga <i>et al.</i> , 2005; Ricci-Silva <i>et al.</i> , 2008
AAV91431.1	Inibidor de serino protease 4 (parcial) [LO]	132	220	Inibidor de serino Protease	Serpinas	Transcriptoma	Veiga <i>et al.</i> , 2005; Ricci-Silva <i>et al.</i> , 2008
AAV91426.1	Inibidor de protease putativo 4 [LO]	6	4	Inibidor de protease	NI	Transcriptoma	Veiga <i>et al.</i> , 2005
AAV91427.1	Inibidor de protease 5 (parcial) [LO]	0	0	Inibidor de protease	NI	Transcriptoma	Veiga <i>et al.</i> , 2005
AAV91453.1	Inibidor de protease 6 [LO]	0	0	Inibidor de protease	NI	Transcriptoma	Veiga <i>et al.</i> , 2005
AAV91449.1	Inibidor de protease 7 [LO]	23	16	Inibidor de protease	NI	Transcriptoma	Veiga <i>et al.</i> , 2005
AAV91420.1	Precursor de cistatina putativo 1 [LO]	33	89	Inibidor de cisteíno protease	NI	Transcriptoma	Veiga <i>et al.</i> , 2005
AAV91428.1	Serpina 1 [LO]	0	40	NI	Serpina	Transcriptoma	Veiga <i>et al.</i> , 2005
AAV91429.1	Serpina 2 [LO]	0	37	NI	Serpina	Transcriptoma	Veiga <i>et al.</i> , 2005
ABF21071.1	Hemolina [LO]	464	290	NI	Imunoglobulinas	Sequenciamento peptídico	Alvarez-Flores <i>et al.</i> , 2011
ABF21070.1	Hemolina [LO]	457	218	NI	Imunoglobulinas	Sequenciamento peptídico	Alvarez-Flores <i>et al.</i> , 2011
ABF21073.1	Hemolina [LO]	458	213	NI	Imunoglobulina	Sequenciamento peptídico	Alvarez-Flores <i>et al.</i> , 2011
ABF21072.1	Hemolina [LO]	385	168	NI	Imunoglobulinas	Sequenciamento peptídico	Alvarez-Flores <i>et al.</i> , 2011
ABW39097.1	Proteína dopa-decarboxilase putativa (parcial) [LA]	0	4	Liase	Decarboxilase grupo II		Regier, 2007
ABW39098.1	Proteína dopa-decarboxilase putativa (parcial) [LA]	0	2	Liase	Decarboxilase grupo II		Regier, 2007
AAV91357.1	Ferritina 1 [LO]	2	9	Oxidoredutase	Ferritina	Transcriptoma	Veiga <i>et al.</i> , 2005
AAV91377.1	Proteína hipotética 9 (parcial) [LO]	0	7	Oxidoredutase	Aldeído/histidinol desidrogenase	Transcriptoma	Veiga <i>et al.</i> , 2005
AAV91363.1	Proteína hipotética 10 (parcial) [LO]	0	33	Oxidoredutase	Aldeído desidrogenase	Transcriptoma	Veiga <i>et al.</i> , 2005
AAV91356.1	Fator de alongamento $\alpha$ -1 [LO]	2	33	GTPase	Fator de tradução clássico de GTPase	Transcriptoma	Veiga <i>et al.</i> , 2005

AAV91370.1	Proteína hipotética 2 [LO]	0	17	Hidrolase	NI	Transcriptoma	Veiga <i>et al.</i> , 2005
AAV91402.1	Proteína ribossomal 4 [LO]	0	1	Ribonucleoproteína	Proteínas ribossômicas S17P	Transcriptoma	Veiga <i>et al.</i> , 2005
AAV91403.1	Proteína ribossomal 5 [LO]	0	1	Ribonucleoproteína	Proteínas ribossômicas S12P	Transcriptoma	Veiga <i>et al.</i> , 2005
AAV91405.1	Proteína ribossomal 7 [LO]	0	7	Ribonucleoproteína	NI	Transcriptoma	Veiga <i>et al.</i> , 2005
AAV91382.1	Proteína ribossomal 11 (subunidade maior) [LO]	0	1	Ribonucleoproteína	Proteínas ribossômicas L44e	Transcriptoma	Veiga <i>et al.</i> , 2005
AAV91391.1	Proteína ribossomal subunidade S19 [LO]	0	2	Ribonucleoproteína	Proteínas ribossômicas S19P	Transcriptoma	Veiga <i>et al.</i> , 2005
AAV91410.1	Proteína LIM 1 [LO]	0	2	Ligante de íons zinco	NI	Transcriptoma	Veiga <i>et al.</i> , 2005
AAV91411.1	Cadeia leve da miosina 1 [LO]	0	3	Ligante de íons cálcio	Cadeias Leves de Miosina	Transcriptoma	Veiga <i>et al.</i> , 2005
Q5MGM6.1	Homólogo da proteína tumoral traducionalmente controlada (TCTP) [LO]	0	43	Ligante de cálcio e estabilizante de microtúbulos	TCTP	Transcriptoma	Veiga <i>et al.</i> , 2005
AAV91436.1	Lectina 1 imunolectina putative [LO]	0	2	Ligante de carboidratos	NI	Transcriptoma	Veiga <i>et al.</i> , 2005
AAV91450.1	Lectina 3 [LO]	0	6	Ligante de carboidratos	Lectina do tipo C	Transcriptoma	Veiga <i>et al.</i> , 2005
AAV91463.1	Lectina 4 tipo C [LO]	0	2	Ligante de carboidratos	NI	Transcriptoma	Veiga <i>et al.</i> , 2005
AAV91460.1	Lectina 5 [LO]	3	7	Ligante de carboidratos	NI	Transcriptoma	Veiga <i>et al.</i> , 2005
AAV91369.1	Proteína hipotética [LO]	0	1	Ligante de RNA	NI	Transcriptoma	Veiga <i>et al.</i> , 2005
AAV91365.1	Proteína hipotética 12 (parcial) [LO]	3	12	Ligante de NAD	NI	Transcriptoma	Veiga <i>et al.</i> , 2005
AAV91408.1	Actina 1 [LO]	0	67	Ligante de ATP	Actina	Transcriptoma	Veiga <i>et al.</i> , 2005
AAV91364.1	Proteína hipotética 11 (parcial) [LO]	0	19	Ligante de ATP	NI	Transcriptoma	Veiga <i>et al.</i> , 2005
AAV91438.1	Proteína hipotética 23 (parcial) [LO]	0	6	Ligante de ATP	Ligases	Transcriptoma	Veiga <i>et al.</i> , 2005
AAV91465.1	Proteína de choque térmico 4 [LO]	25	173	Ligante de ATP	Proteína do choque térmico 70	Transcriptoma	Veiga <i>et al.</i> , 2005
AAV91360.1	Proteína de choque térmico 1 [LO]	0	5	Constituinte estrutural das lentes oculares	Proteínas pequenas do choque térmico (HSP 20)	Transcriptoma	Veiga <i>et al.</i> , 2005
AAV91362.1	Proteína de choque térmico 3 [LO]	0	9	Resposta ao estresse	Proteínas pequenas do choque térmico (HSP	Transcriptoma	Veiga <i>et al.</i> , 2005

Q5MGQ0.1	Proteína de defesa putativa 1(DFP-1) [LO]	56	36	Antimicrobiana (imunidade)	20)	Proteínas de defesa de insetos	Transcriptoma	Veiga <i>et al.</i> , 2005
AEZ02311.1	Proteína antiviral putativa [LO]	217	1.394	Antiviral	NI	NI	Transcriptoma	Carmo <i>et al.</i> , 2012
AAV91346.1	Proteína da cutícula 1 [LO]	0	1	Constituinte estrutural da cutícula	NI	NI	Transcriptoma	Ricci-Silva <i>et al.</i> , 2008
AAV91349.1	Proteína da cutícula 4 [LO]	0	2	Constituinte estrutural da cutícula	NI	NI	Transcriptoma	Veiga <i>et al.</i> , 2005
AAV91414.1	Tropomiosina 1 [LO]	2	4	NI	Tropomiosina	NI	Transcriptoma	Veiga <i>et al.</i> , 2005
AAV91466.1	Proteína sensorial 1 [LO]	106	66	NI	NI	NI	Transcriptoma	Veiga <i>et al.</i> , 2005
AAV91467.1	Proteína sensorial 2 [LO]	8	4	NI	NI	NI	Transcriptoma	Veiga <i>et al.</i> , 2005
AAV91443.1	Peptídeo putativo secretado 30 [LO]	0	9	NI	NI	NI	Transcriptoma	Veiga <i>et al.</i> , 2005
AAV91421.1	Proteína do tipo esterase 1 [LO]	5	6	NI	NI	NI	Transcriptoma	Veiga <i>et al.</i> , 2005
AAV91371.1	Proteína hipotética 3 [LO]	0	37	NI	GST	NI	Transcriptoma	Veiga <i>et al.</i> , 2005
AAV91372.1	Proteína hipotética 4 [LO]	1	0	NI	Lipina	NI	Transcriptoma	Veiga <i>et al.</i> , 2005
AAV91375.1	Proteína hipotética 7 (parcial) [LO]	0	1	NI	NI	NI	Transcriptoma	Veiga <i>et al.</i> , 2005
AAV91366.1	Proteína hipotética 13 [LO]	1	161	NI	NI	NI	Transcriptoma	Veiga <i>et al.</i> , 2005
AAV91422.1	Proteína hipotética 21 (parcial) [LO]	1	0	Catalítica	Lipase	NI	Transcriptoma	Veiga <i>et al.</i> , 2005
AAV91437.1	Proteína hipotética 22 (parcial) [LO]	1	278	NI	Hemocianina	NI	Transcriptoma	Veiga <i>et al.</i> , 2005
AAV91444.1	Proteína hipotética 31 [LO]	16	410	NI	NI	NI	Transcriptoma	Veiga <i>et al.</i> , 2005
P85248.2	Proteína desconhecida 3	2	6	NI	NI	NI	Sequenciamento	Ricci-Silva <i>et al.</i> , 2008
P85249.2	Proteína desconhecida 4	1	1	NI	NI	NI	Sequenciamento	Ricci-Silva <i>et al.</i> , 2008
P85251.2	Proteína desconhecida 6	0	0	NI	NI	NI	Sequenciamento	Ricci-Silva <i>et al.</i> , 2008

LO: *Lonomia obliqua*; LA: *Lonomia achelous*; NI: Não identificada