

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Centro de Biotecnologia
Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular

**Caracterização molecular dos componentes
do veneno de *Lonomia obliqua*: genes
expressos e princípios ativos envolvidos nos
distúrbios da coagulação e da fibrinólise**

Ana Beatriz Gorini da Veiga

Porto Alegre
Outubro de 2005

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Centro de Biotecnologia
Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular

**Caracterização molecular dos componentes
do veneno de *Lonomia obliqua*: genes
expressos e princípios ativos envolvidos nos
distúrbios da coagulação e da fibrinólise**

Ana Beatriz Gorini da Veiga

Orientador: Prof. Dr. Jorge Almeida Guimarães

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM) da UFRGS como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Doutor.

Porto Alegre, Outubro de 2005

Banca Examinadora

Dr^a. Helena Bonciani Nader

Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de São Paulo

Dr. João Antônio Pêgas Henriques

Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dr. Robson de Queiroz Monteiro

Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro

Dr^a. Célia Regina Ribeiro da Silva Carlini

Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

(suplente)

Outubro de 2005

À minha mãe, Semíramis Gorini

Índice

Agradecimentos.....	6
Resumo.....	7
Abstract.....	10
Apresentação.....	12
Abreviaturas.....	14
1. Introdução.....	15
1.1. A Hemostasia.....	15
1.1.1. Cronologia dos Eventos.....	18
1.1.2. Papel das Plaquetas.....	22
1.2. Princípios naturais que interferem na hemostasia.....	24
1.2.1. A taturana <i>Lonomia obliqua</i>	27
2. Objetivos.....	35
3. Resultados.....	37
3.1. Atividades paradoxais no veneno de <i>L. obliqua</i> : ativador de protrombina e atividade fibrin(ogen)olítica no extrato de espículas.....	38
1º Artigo: Veiga, A.B.G., Pinto, A.F.M., Guimarães, J.A., 2003. Fibrinogenolytic and procoagulant activities in the hemorrhagic syndrome caused by <i>Lonomia obliqua</i> caterpillars. <i>Thrombosis Research</i> 111, 95-101.....	38
3.2. Genes que codificam para princípios ativos do veneno de <i>Lonomia obliqua</i>	47
2º Artigo: 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 <i>Lonomia obliqua</i> : identification of the proteins potentially involved in the coagulation disorder and hemorrhagic syndrome. <i>Gene</i> 355, 11-27.	47
3.3. Uma lipocalina de <i>Lonomia obliqua</i> participa da conversão de heme em biliverdina IX γ	65
3º Artigo: Veiga, A.B.G., Ribeiro, J.M.C., Francischetti, I.M.B., Guimarães, J.A., Andersen, J.F., 2006. <i>In situ</i> conversion of heme to biliverdin IX γ by an insect bilin-binding protein (submetido).....	65
5. Conclusões.....	81
6. Referências Bibliográficas.....	86
7. Perspectivas.....	93
8. Co-autoria em trabalhos publicados.....	94
Ana Beatriz Gorini da Veiga - <i>Curriculum Vitae</i> resumido.....	109

Agradecimentos

Não encontrei e jamais encontrarei palavras que descrevam suficientemente o quão grata me sinto por aqueles que colaboraram, ao longo desta etapa, para eu alcançar meus objetivos. O trabalho descrito aqui envolveu muitas pessoas que acreditaram na minha capacidade e me apoiaram nos devidos momentos. A lista abaixo é uma relação, sem ordem de preferências, de algumas dessas pessoas queridas, que tiveram sua devida participação nessa jornada. Algumas são de fato co-autores – oficiais ou não – desta Tese de Doutorado, por terem ensinado, pipetado, cedido espaço nos seus laboratórios ou criticado e dado sugestões. Há, ainda, aquelas que insistiram para que eu não desistisse nos momentos mais difíceis, naqueles momentos em que nada dá certo, o experimento não funciona, surgem problemas de ordem prática, de ordem pessoal, saudades, falta de vontade... e elas estavam ali, repetindo para eu não desistir, não jogar fora o que eu já havia produzido, que meu trabalho estava dando frutos, que essas fases difíceis fazem parte... enfim, pessoas que me mostraram como é a vida de fato. A todas elas, um obrigada verdadeiro, com muito carinho e a certeza de que serão sempre lembradas. Aos meus familiares, especialmente ao meu marido, Fábio Klamt, um obrigada com amor e carinho, pelo incentivo, apoio, paciência e amor.

Jorge Almeida Guimarães	José Marcos C. Ribeiro	Ivo M. B. Francischetti
John Andersen	Fábio Klamt	Carlos Termignoni
João A. P. Henriques	Helena B. Nader	Robson de Queiroz Monteiro
Célia Carlini	Giancarlo Pasquali	Edmundo Kanan Marques
Semíramis Gorini	Antônio F. M. Pinto	Augusto Schrank
Jesus Valenzuela	Israel Roisenberg	Fabiana Horn
Sílvia Centeno	Luciano Saucedo	Fernanda Mulinari
Alfredo J. da Veiga-Neto	Lina Zingali	Maria Fátima Grossi de Sá
Eduardo J. Gorini da Veiga	Eric Calvo	Silvio Sanches Veiga
Elíbio Rech	Ana Lúcia C. G. Nunes	Rafael Roesler

Colegas do Centro de Biotecnologia da UFRGS e do LMVR/NIAID/NIH
Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM) da UFRGS
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Professores do Centro de Biotecnologia da UFRGS
Colegas do Laboratório de Interação Planta-Praga do Cenargen/EMBRAPA
Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

Resumo

A hemostasia é um processo multifuncional, complexo e finamente regulado que envolve diversos componentes celulares e moleculares, incluindo plaquetas, parede vascular, cascata da coagulação sangüínea e fibrinólise. O desequilíbrio desses componentes pode desencadear condições patológicas, tais como hemorragias, hipercoagulopatias e a conseqüente trombose vascular. O descobrimento de novos princípios ativos e o desenvolvimento de drogas como instrumentos de intervenção anti-trombótica constituem estratégias de eleição para a prevenção e o tratamento do quadro trombo-embólico. Muitos desses princípios ativos são obtidos de fontes naturais, incluindo os conhecidos anti-hemostáticos presentes em venenos de serpentes e na saliva de artrópodos hematófagos. Por afetarem o sistema hemostático humano, essas moléculas são alvo de estudos para o desenvolvimento de anti-venenos, testes laboratoriais e novas drogas terapêuticas.

As lagartas do gênero *Lonomia* são conhecidas por produzirem proteínas tóxicas que estão associadas a uma severa síndrome hemorrágica em humanos, cujo quadro clínico é caracterizado por distúrbios da coagulação, insuficiência renal aguda, hematúria, sangramentos, dentre outros sintomas. O veneno é constituído por diversos princípios ativos, incluindo atividades pró-coagulantes e fibrinolíticas. Apesar da importância social e científica desses envenenamentos e do conhecimento sobre a natureza dessas toxinas, as informações sobre as características moleculares do veneno ainda são escassas, o que limita o melhor entendimento das bases moleculares da síndrome hemorrágica e o desenvolvimento de um diagnóstico e de um tratamento mais adequados para os pacientes.

O presente trabalho teve por objetivo analisar as proteínas mais abundantes e os genes expressos em maior proporção na taturana *L. obliqua* durante a fase larval (fase em que ocorrem os acidentes), visando identificar moléculas potencialmente envolvidas no envenenamento. As etapas realizadas foram: análise dos princípios ativos presentes em tecidos utilizados para a construção de bibliotecas de cDNA, seqüenciamento em massa das bibliotecas e análise dos transcritos utilizando ferramentas de bioinformática. Mais de mil seqüências de cDNA foram obtidas e agrupadas gerando um catálogo com informações sobre os transcritos encontrados, incluindo seqüências completas de cDNAs que codificam para proteínas provavelmente envolvidas no envenenamento, além de novas seqüências de função biológica desconhecida. O conteúdo protéico do veneno foi analisado por SDS-PAGE seguido por seqüenciamento da região N-terminal das proteínas mais abundantes, possibilitando a correlação entre o cDNA e a proteína por ele codificada. As seqüências completas de cDNA foram enviadas para o GenBank (NCBI/NIH, EUA) e os resultado estão disponíveis em um sítio eletrônico específico no NCBI: <http://www.ncbi.nih.gov/projects/omes>. O cDNA mais abundante da lagarta, que codifica para uma lipocalina, foi clonado e obteve-se a proteína recombinante. Demonstramos que essa lipocalina liga o grupamento heme e participa da oxidação acoplada desse ligante, levando à formação de biliverdina γ , sugerindo uma nova função para as proteínas ligadoras de bilina em insetos.

Os resultados obtidos colaboram para o maior entendimento das bases moleculares do envenenamento por *L. obliqua*, além de apontarem moléculas candidatas para o desenvolvimento de *kits* de diagnóstico para o envenenamento com *Lonomia* e

para a melhora na especificidade do soro anti-lonômico, bem como para estudos mais aprofundados dos processos hemostáticos.

Abstract

Hemostasis is a multifunctional, complex and finely regulated process that involves a variety of cellular and molecular components, such as platelets, vascular endothelium, blood coagulation cascade and fibrinolysis. A disturbance in these components may cause physio-pathologic profiles including hemorrhages, hypercoagulopathy and, eventually, vascular thrombosis. The discovery of novel active principles and the development of anti-thrombotic drugs are, nowadays, the main strategies for the prevention and treatment of thrombo-embolic diseases. Many of these active principles are obtained from natural sources, including the well known anti-hemostatic activities from snake venoms and from the salivary secretion of hematophagous arthropods. These molecules affect the human hemostatic system, thus being useful in the study and development of anti-venoms, laboratory test kits and new therapeutic drugs.

In southern Brazil, accidental contact with caterpillars of the genus *Lonomia* leads to a severe hemorrhagic syndrome caused by the toxins produced by the animal. The clinical profile is mainly characterized by coagulation disorders, acute renal failure, hematuria and generalized hemorrhage. The venom is composed of several active principles, including procoagulant and fibrinolytic activities. Even though these accidents constitute a serious social problem in Brazil, little is known about the molecular basis of the envenomation and of the active principles composing the venom. More scientific information is necessary in order to allow a better understanding of this coagulation disorder and to develop proper diagnosis and treatment of the envenomed patients.

The main objective of this study was to analyze the most abundant proteins and the most expressed genes in the caterpillar *L. obliqua*, aiming the identification of molecules potentially involved in the envenomation process. The following steps were performed: analyses of the active principles present in tissues used for construction of cDNA libraries, mass sequencing of the cDNA libraries and analyses of the transcripts using bioinformatic tools. Over one thousand of cDNA sequences were obtained and used to generate a catalog containing information on the transcripts, including full-length cDNAs coding for putative toxins involved in the envenomation, as well as novel sequences of unknown biologic functions. The protein content of the venom was analyzed by SDS-PAGE followed by N-terminal sequencing. The aminoacid sequences were correlated to the respective cDNAs in the libraries. The full-length cDNA sequences were sent to GenBank (NCBI/NIH, USA) and the results can be found in the webpage (<http://www.ncbi.nih.gov/projects/omes>). The most abundant cDNA in the caterpillar, which codes for a lipocalin, was cloned and the recombinant protein obtained. It is shown that this lipocalin binds heme and is involved in the coupled oxidation of the ligand, with formation of biliverdin γ , thus suggesting a new function for the bilin-binding proteins from insects.

The present study brings new insights for a better understanding of the molecular basis of the envenomation by *L. obliqua* caterpillars. Furthermore, the molecules identified may be of interest for the development of diagnosis kits and of a more specific anti-venom, as well as for studies of the hemostatic process itself.

Apresentação

A tese de doutorado aqui apresentada é fruto de um trabalho desenvolvido ao longo de 4 anos no Laboratório de Bioquímica Farmacológica do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sob orientação de Jorge Almeida Guimarães, e faz parte do projeto de pesquisa “Proteínas e peptídeos componentes de venenos e outros princípios ativos com ação sobre a hemostasia” – mais especificamente da linha de pesquisa com o veneno da lagarta *Lonomia obliqua*, conhecida por causar uma síndrome hemorrágica em humanos.

Iniciei minhas pesquisas com a *L. obliqua* no grupo do Professor Jorge Guimarães em 1999, durante o Bacharelado em Ciências Biológicas na UFRGS, a partir de um estudo morfo-funcional e ultra-estrutural do tegumento e das estruturas da lagarta a fim de caracterizar os mecanismos de produção e injeção de veneno pela lagarta. Dei continuidade ao estudo durante meu Mestrado (2000-2001) no Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM) do Centro de Biotecnologia da UFRGS, também sob orientação de Jorge A. Guimarães. Além do tema do Bacharelado (Veiga *et al.*, 2001), o projeto também incluiu a caracterização parcial de alguns princípios ativos do veneno que interferem na coagulação e na fibrinólise. Finalmente, ao longo do meu Doutorado no PPGBCM (2001-2005) sob orientação de Jorge A. Guimarães e Doutorado-sanduíche no National Institutes of Health (NIH, EUA) sob orientação de José Marcos C. Ribeiro, foram aprofundados os estudos sobre os princípios ativos do veneno, bem como dos principais genes expressos pela *L. obliqua* durante a fase de lagarta e que podem codificar para esses princípios ativos.

Muitos experimentos foram realizados no Laboratório de Bioquímica Farmacológica no Centro de Biotecnologia, mas o trabalho também teve a colaboração do Laboratório de Biologia Molecular Vegetal (colaboração do Dr. Giancarlo Pasquali), do Laboratório de Interação Planta-Praga (colaboração da Dr^a Fátima Grossi de Sá), do Departamento de Bioquímica Médica-ICB-UFRJ (colaboração da Dr^a Russolina Zingali) e do Laboratory of Malaria and Vector Research (LMVR) do National Institutes of Allergy and Infectious Diseases (NIAID), no NIH (Estados Unidos) (co-orientação do Dr. José Marcos C. Ribeiro e colaboração do Dr. Ivo M. B. Francischetti e do Dr. John F. Andersen).

Esta tese está dividida basicamente em Introdução, Objetivos, Resultados e Conclusões. Os resultados aqui descritos originaram trabalhos já publicados ou manuscritos em fase final para publicação. Já no capítulo Perspectivas são comentadas as novas abordagens de estudo dentro da linha de pesquisa sobre a lagarta *L. obliqua* que estão sendo seguidas como continuidade do projeto desta Tese de Doutorado. Por fim, está incluído um capítulo apresentando trabalhos publicados na linha de pesquisa de *L. obliqua* dos quais participei como co-autora.

Abreviaturas

ADP: difosfato de adenosina

APC: proteína C ativada

cDNA: ácido desoxirribonucléico complementar ao RNA mensageiro

CIT: Centro de Informação Toxicológica

FDP: produto de degradação da fibrina

GPIIb-IIIa: glicoproteína II b e IIIa

NCBI: National Center for Biotechnology Information

NE: elastase liberada por neutrófilos

NIH: National Institutes of Health (Institutos Nacionais de Saúde, EUA)

N-terminal: porção amino-terminal de peptídeos e proteínas

PAF: fator ativador de plaquetas

PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida

PAI: inibidor do ativador de plasminogênio

PL: fosfolipídio

PLA₂: fosfolipase A₂

PLC: fosfolipase C

Pro: protrombina

SDS: dodecilsulfato de sódio

T: trombina

TAFI: inibidor da fibrinólise ativado por trombina

TF: fator tecidual

TFPI: inibidor da via do fator tecidual

t-PA: ativador tecidual do plasminogênio

TXA₂: tromboxana A₂

UFRGS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

u-PA: uroquinase ativadora de fibrinogênio

vWF: fator de von Willebrand

1. Introdução

1.1. A Hemostasia

Em consequência de uma lesão vascular diversos componentes celulares e moleculares são acionados, resultando na ativação de um complexo mecanismo de defesa e controle da perda de sangue, que compreende o processo hemostático. A hemostasia é, assim, um processo multifuncional, complexo e de regulação finamente controlada, envolvendo a participação de diversos componentes fisiológicos celulares e acelulares, incluindo a parede vascular e a membrana basal, microfibrilas e colágeno, ativação plaquetária, além das cascatas da coagulação e da fibrinólise. A refinada regulação desses sistemas coloca em posições antagônicas e em equilíbrio permanente dois processos: de um lado se situa um eficiente processo fisiológico, a hemostasia propriamente dita, constituindo um complexo, redundante e eficiente mecanismo de defesa capaz de prevenir a perda não controlada de sangue; do outro lado, basicamente os mesmos componentes celulares e moleculares que asseguram uma função fisiológica para a hemostasia constituem as bases do mecanismo desencadeador das condições fisiopatológicas como a hemorragia, as hipercoagulopatias e a consequente trombose vascular. Assim, o quadro trombo-embólico, freqüentemente incompatível com a própria vida, pode ser considerado uma extensão mal regulada do processo da hemostasia (ver revisão em Marcus & Safier, 1993).

O processo fisiológico compreende a participação da agregação plaquetária, da coagulação sangüínea e da vasoconstrição. O sistema, como um todo, consiste em um

conjunto de etapas auto-reguladas e de máxima eficiência, incluindo etapas seqüenciadas de eventos que ocorrem sem uma demarcação definida de limites funcionais preponderantes entre si, sendo constituído pelos três grandes processos interligados:

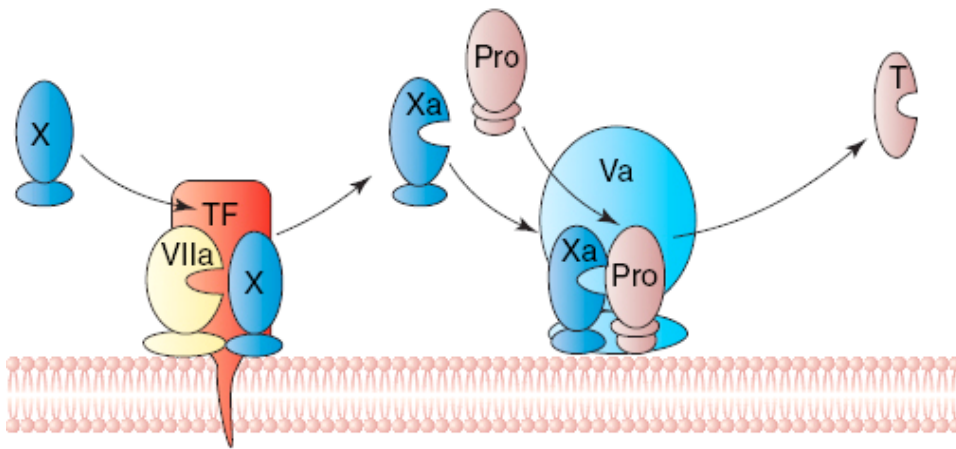
a) **Coagulação sangüínea.** Compreende as cascatas de eventos de ativação da coagulação pelas vias intrínseca e extrínseca. A via extrínseca, ou via do fator tecidual (Figura 1.1a), constitui o principal e mais rápido mecanismo que leva à geração de trombina (Opal & Esmon, 2003). Já a via intrínseca, ou via do contato mediada por superfície negativa ou ainda via do fator de Hageman (Figura 1.1b), tem papel na sustentação e manutenção do processo sob ativação. Nas duas vias atuam cerca de 18 fatores plasmáticos, quase todos de natureza protéica, sendo majoritariamente enzimas que circulam em estado de precursores zimogênicos, suscetíveis de ativação em cascata de eventos marcada por amplificação do sinal bioquímico inicial da ordem de 5×10^6 vezes em bases molares.

b) **Agregação e reatividade plaquetária.** É, por si só, um processo altamente redundante acionado independentemente por diversos agonistas, incluindo ADP originado de eventual injúria celular e tecidual, colágeno das estruturas sub-endoteliais, tromboxana A_2 (TXA_2) liberado de plaquetas ativadas, elastase dos neutrófilos (NE), trombina e fator ativador de plaquetas (PAF).

c) **Vasoconstrição.** É induzida pelos agonistas TXA_2 e serotonina, ambos vasoconstritores liberados por plaquetas ativadas.

Na resposta hemostática esses complexos sistemas fisiológicos interagem entre si e eventualmente atuam em circunstâncias opostas. Toda essa série de eventos, finamente regulados e atuando em conjunto, previnem a perda de sangue pelo organismo. A fibrinólise, por sua vez, elimina excessos de fibrina e coágulo, evitando a formação de trombos que possam se desprender e se alojar em outro local do organismo (Jenny e Mann, 1998).

a)



b)

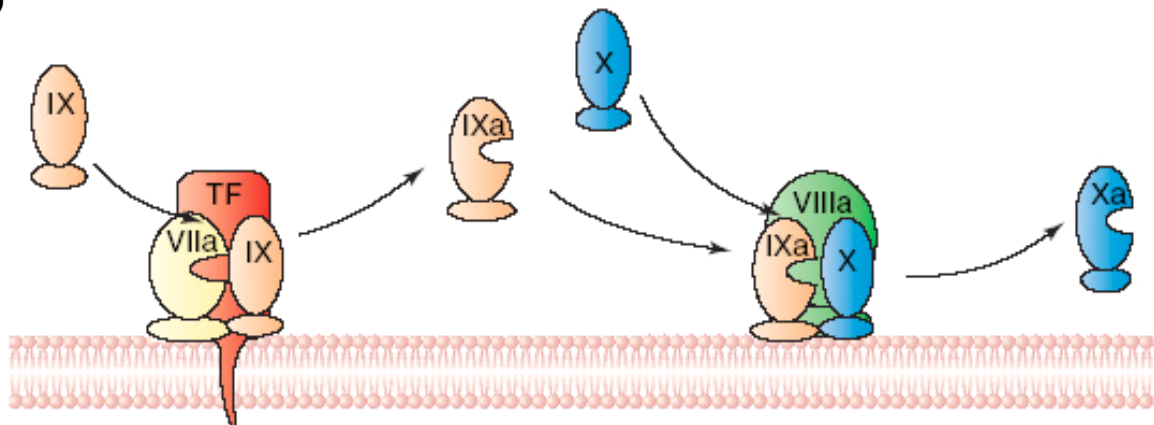


Figura 1.1. Ativação da cascata da coagulação. O fator tecidual (TF) leva à ativação do fator X e do fator IX. A ativação do fator X pelo complexo tenase da via extrínseca (a) e da via intrínseca (b) resulta na formação do complexo protrombinase inserido na membrana fosfolipídica. A conseqüente ativação da protrombina (Pro) leva à formação de trombina (T), enzima chave no controle da coagulação (ver texto). Adaptado de Esmon, 2004.

1.1.1. Cronologia dos Eventos

Em consequência de uma injúria celular, de uma lesão tecidual ou ainda de um processo inflamatório, o sistema fisiológico latente, representado principalmente pelas plaquetas e pelas proteínas plasmáticas que circulam na forma inativa (zimogênios), é “apresentado” aos componentes celulares estruturais da parede vascular (membrana basal, microfibrilas e colágeno) e se torna ativado. As plaquetas sofrem mudanças de forma, emitem pseudópodos e passam a uma etapa de intensa reatividade, produzindo adesão celular e secreção de agonistas pró-agregantes, tais como ADP e TXA₂. O fator tecidual liberado da membrana das células endoteliais, por sua vez, se liga às formas zimogênica e ativada do fator VII presentes no sangue. Essa ligação ativa o fator VII, promovendo a formação do complexo tenase extrínscico, que depende de cálcio e consiste da interação entre o fator tecidual, o fator VIIa e o fator X na membrana fosfolipídica (Figura 1.1a). O fator IXa, por sua vez, participa da formação do complexo tenase intrínscico – também dependente de cálcio – que envolve a interação entre os fatores IXa, X e VIIIa na membrana fosfolipídica (Figura 1.1b) (Opal & Esmon, 2003). Ocorre a conversão do fator X para sua forma ativa Xa, que ativa o fator V, possibilitando a formação do complexo protrombinase, formado pelos fatores Xa, Va e protrombina na membrana fosfolipídica das plaquetas. O complexo protrombinase, que também depende de cálcio, leva à conversão da protrombina em trombina, a enzima chave da coagulação sangüínea, que catalisa uma rápida e específica reação de clivagem dos fibrinopeptídeos A e B, promovendo a transformação do fibrinogênio em monômeros de fibrina, além de ativar o fator XIII. O fator XIIIa, por sua vez, promove a formação de ligações covalentes na rede de fibrina, estabilizando o coágulo. O processo é finalizado com a formação de

um aglomerado de plaquetas, englobando também outras células, especialmente eritrócitos, o que consolida o coágulo que sela a lesão e interrompe o extravasamento sanguíneo.

Vários processos de retroalimentação – tanto positiva como negativa – regulam a cascata da coagulação. Um exemplo de retroalimentação negativa é a formação do fator Xa o qual, além de ser fundamental na propagação da cascata da coagulação, aumenta a atividade inibitória do inibidor da via do fator tecidual (TFPI). O TFPI liga-se ao fator Xa e ao fator VIIa em complexo com o fator tecidual, levando à inibição do complexo tenase. O TFPI também inibe o complexo protrombinase e a ativação do fator IXa pelo complexo VIIa/fator tecidual (Broze, 1995). Desta forma, a propagação da cascata da coagulação depende de vias de amplificação por retroalimentação positiva, sendo a trombina fundamental neste aspecto. Além de catalisar a conversão do fibrinogênio em fibrina, a trombina amplifica a cascata através da ativação dos fatores V, VIII e XI. Os fatores VIII e XI fazem parte da via intrínseca da coagulação (via do fator contato), importante na manutenção do processo. O fator XIa ativa o fator IX, e o fator IXa, na presença de cálcio e fosfolipídeos de membrana, forma o complexo tenase intrínseco com os fatores VIIIa e X, levando à ativação do fator X. Outra etapa de amplificação por retroalimentação positiva é a ativação, pelos fatores VIIa, IXa e Xa, do fator VII ligado ao fator tecidual (Broze, 1995; Dahlbäck, 2000). Uma outra via de manutenção da coagulação envolve a ativação do fator XII na presença de cininogênio, precalicreína e superfície carregada negativamente pois o fator XIIa ativa o fator XI (Pierce & Guimarães, 1975; Colman et al., 1975; Webster et al., 1976; Jenny & Mann, 1998).

A maioria dos componentes envolvidos na coagulação – tais como fatores IX, X, VII, e protrombina – são proteínas dependentes de vitamina K, daí a importância desta vitamina na coagulação sanguínea (Dahlbäck, 2000). O cálcio é outro elemento importante na cascata, necessário em várias etapas da coagulação (Jenny & Mann, 1998). Existem grandes variações nas concentrações de todos os componentes da cascata de coagulação no sangue, sendo que aqueles que atuam no início do processo – como o fator VII – encontram-se em concentrações muito baixas em relação àqueles que atuam em estágios mais avançados – como o fibrinogênio – o que reflete a amplificação do sinal em várias etapas ao longo do processo.

A coagulação do sangue é também regulada negativamente por eventos anticoagulantes e fibrinolíticos. Esses eventos incluem a ativação de plasminogênio, a via do TFPI (já descrita), a participação da antitrombina III e a via anticoagulante da proteína C. O plasminogênio, precursor da plasmina, é ativado pela uroquinase (u-PA) e pelo ativador tecidual de plasminogênio (t-PA). Na ausência de fibrina, a plasmina formada degrada o fibrinogênio, liberando fibrino-peptídeos solúveis. A plasmina também apresenta retroalimentação positiva clivando o plasminogênio de maneira a facilitar a ativação por t-PA e por u-PA, além de agir sobre outros fatores da cascata da coagulação (Jenny & Mann, 1998). Esses componentes da fibrinólise, por sua vez, também sofrem inibição; o inibidor da fibrinólise, por exemplo, é ativado pela trombina, evitando a ação das enzimas fibrinolíticas sobre a rede de fibrina.

A proteína C é ativada quando a trombina liga-se à trombomodulina. A proteína C ativada (APC) inativa os fatores Va e VIIIa, o que culmina na inibição da coagulação; esse processo envolve a participação de um cofator, a proteína S, que também é

dependente de vitamina K. O fator V também atua em sinergismo com a proteína S como um cofator na clivagem do fator VIIIa pela APC (Dahlbäck, 2000; Esmon, 2000). Este é mais um exemplo da complexidade do sistema hemostático, em que uma mesma proteína pode exercer funções antagônicas conforme o processo envolvido. A Figura 1.2 resume as principais etapas das cascatas da coagulação e da fibrinólise.

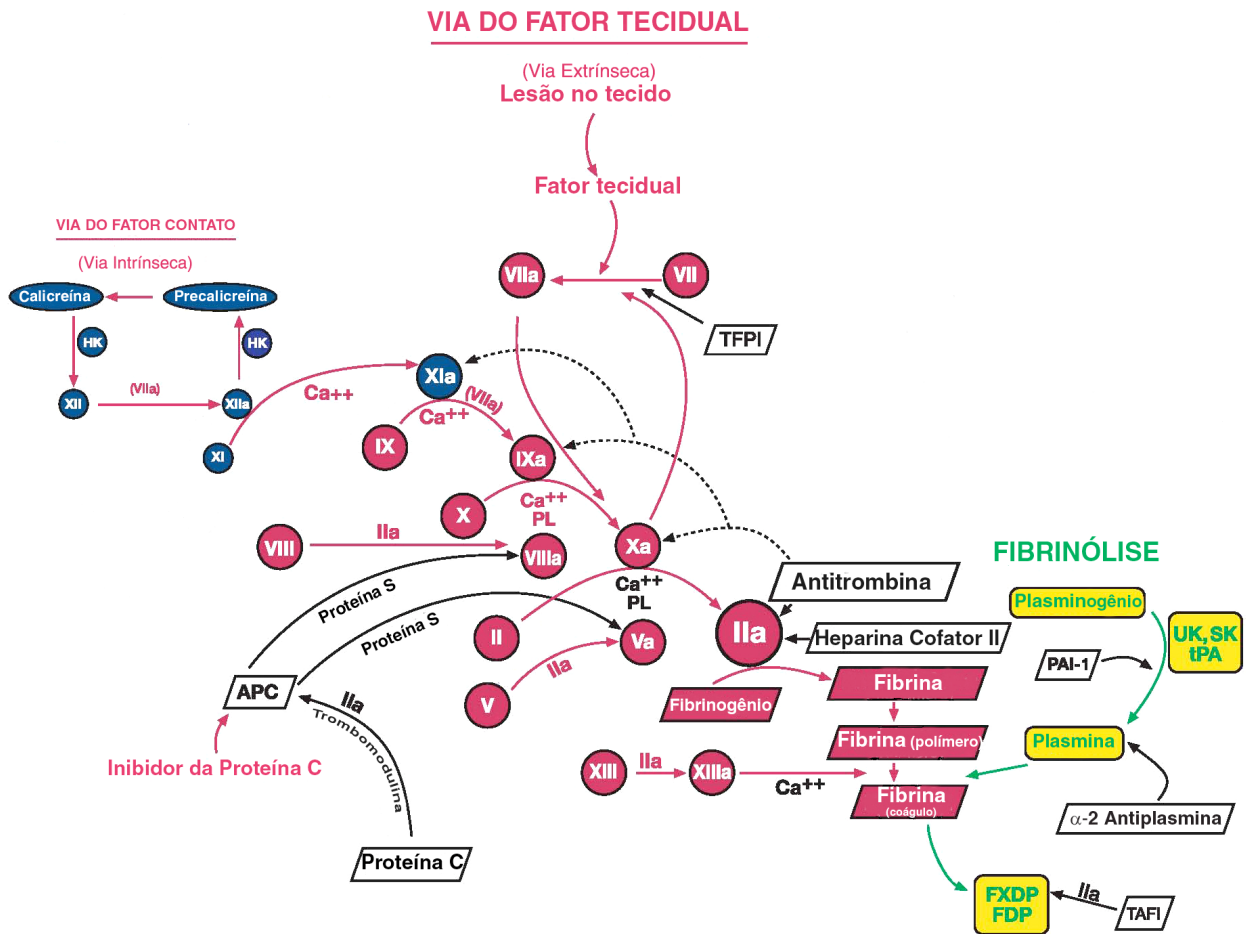


Figura 1.2. Cascata da coagulação e fibrinólise. Em vermelho, a via do fator tecidual (via extrínseca); em azul, a via intrínseca; em verde e amarelo, o processo fibrinolítico. As setas em preto indicam inibição e as setas coloridas indicam ativação. Adaptado de Enzyme Research Co., Reino Unido.

Quando os processos de formação e de dissolução do coágulo não estão em equilíbrio vários problemas cardiovasculares podem surgir, tais como a trombose e a aterosclerose (Carmeliet & Collen, 1998). Tal desequilíbrio pode ter bases genéticas ou mesmo ser decorrente de fatores externos, tais como altos níveis de estresse, tabagismo e má alimentação. A deficiência de muitos fatores da coagulação e também de inibidores fisiológicos da coagulação, como a proteína C, pode ser hereditária e leva à hemorragia ou ineficiência na coagulação sangüínea. Exemplos de deficiências hereditárias são as hemofilias A e B (deficiência de fator VIII e fator IX, respectivamente) e a doença de von Willebrand. Por outro lado existem doenças trombóticas, que também podem ser hereditárias, como resistência à APC causada por uma mutação no gene do fator V, concentrações elevadas de protrombina no plasma devido a uma mutação do gene desta proteína, deficiência de proteína C, S e antitrombina causada por mutações nos respectivos genes. Os casos de trombose adquirida geralmente resultam de cirurgias, imobilizações, diabetes, gravidez ou outros fatores (Dahlbäck, 2000; Bauer, 1998).

1.1.2. Papel das Plaquetas

Devido ao importante papel que desempenham no processo da hemostase, as plaquetas são alvo natural para estudos de anti-hemostáticos. As plaquetas circulam passivamente pela rede vascular sendo impedidas de interagir com a matriz sub-endotelial graças ao endotélio que funciona como uma barreira anatômica, exercendo, ativamente, função anti-adesiva e anti-agregante. Em resposta à lesão vascular, ou exposição a estímulos exógenos, as plaquetas aderem ao local da lesão, sofrem "shape change" (ou

metamorfose viscosa), um processo pelo qual a plaqueta, usualmente discóide, se torna esférica e passa a emitir pseudópodos. Nesta fase, passam a secretar agonistas pró-agregantes (ADP, NE e TXA₂) e em seguida agregam umas às outras. Esse fenômeno, finamente regulado, culmina com a formação do *plug* hemostático (Marcus & Safier, 1993).

O estado de ativação plaquetária é dinamicamente modulado pelo balanço de ações estimulatórias e inibitórias da função plaquetária. As plaquetas possuem uma série de receptores na superfície celular que são capazes de reconhecer ligantes envolvidos em tais processos. Entre estes estão receptores para macromoléculas adesivas, tais como o fator de von Willebrand (vWF), o fibrinogênio, a fibronectina e o colágeno, que possibilitam a aderência das plaquetas às zonas de lesão vascular, como, por exemplo, à matriz extracelular do subendotélio. Receptores, como o complexo glicoproteína Ib-IX, interagem seletivamente com o vWF presente na matriz extracelular e não com aquele presente no plasma. Outros receptores tornam-se funcionais quando as plaquetas são ativadas. Assim, na formação de um agregado compacto, são mobilizados alguns receptores de membrana, particularmente as glicoproteínas IIb e IIIa (GPIIb-IIIa, complexo conhecido como integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$), em resposta aos sinalizadores extracelulares, os quais podem ser solúveis – como o ADP e a trombina – ou imobilizados – como o colágeno. Esses agonistas extracelulares interagem com os receptores específicos, gerando o sinal necessário para a "ativação" ou "exposição" dos receptores de membrana, sendo então reconhecidos pelas macromoléculas adesivas (Marcus & Safier, 1993).

Entre os agonistas que, sabidamente, ativam as plaquetas, incluem-se: ADP, trombina, adrenalina, TXA₂, PAF e colágeno, além de componentes da matriz

extracelular do subendotélio. A informação resultante da ocupação dos receptores por estes agonistas é traduzida, por sistemas de transdução de sinal (por exemplo, proteínas G e tirosina-quinases), a sistemas efetores (PLC, PLA_2 , adenilato ciclase), com a formação subsequente de segundos-mensageiros (inositol trifosfato, diacilglicerol, cálcio), resultando na agregação plaquetária (Marcus & Safier, 1993).

Desta forma, são diversos os alvos para a atuação de possíveis agentes anti-hemostáticos, tanto naturais como sintéticos. Portanto, o descobrimento de novos princípios ativos e o desenvolvimento de drogas e produtos capazes de propiciar a adoção de procedimentos clínicos e terapêuticos como instrumentos de intervenção anti-trombótica constitui hoje a estratégia de eleição para a prevenção e o tratamento do grave quadro trombo-embólico. Não é sem razão que a busca de novos princípios anti-hemostáticos de origem natural seja objeto de acirrada competição na pesquisa acadêmica e na indústria farmacêutica.

1.2. Princípios naturais que interferem na hemostasia

Substâncias ativas sobre a hemostasia têm sido predominantemente obtidas de fontes naturais. Este é o caso da heparina, o clássico anti-coagulante de uso clínico mais difundido. Por outro lado, ao longo da evolução, por cerca de 300 milhões de anos, diversas espécies hematófagas aperfeiçoaram um diversificado processo de produção de substâncias e princípios anti-hemostáticos originados na secreção salivar e capazes de vencer em tempo mínimo a extraordinária eficiência representada pela barreira do sistema hemostático dos mamíferos.

Muitos princípios ativos de natureza protéica produzidos por animais venenosos afetam o sistema hemostático humano (Markland, 1997; Aird, 2002). Entre os exemplos mais conhecidos de proteínas animais que afetam a hemostasia estão a hirudina, um inibidor de trombina presente na saliva da sanguessuga *Hirudo medicinalis* (Markwardt, 1970); a batroxobina, presente no veneno da jararaca *Bothrops atrox*, que cliva o fibrinogênio da mesma forma que a trombina sem, no entanto, ser inibida por antitrombina (Braud et al., 2000; Matsui et al., 2000); a jararagina, uma metaloproteinase de *B. jararaca*, que inibe a agregação plaquetária (Matsui et al., 2000; Markland, 1998); a botrojaracina, uma proteína semelhante à lectina tipo C encontrada também em *B. jararaca*, que inibe a trombina e a agregação plaquetária (Zingali et al., 1993; Monteiro et al., 1999), dentre muitas outras presentes em carrapatos, vampiros, barbeiros, aranhas e outros animais (Pirkle & Markland, 1988; Bon, 2000).

O estudo desses princípios naturais é de extrema importância, uma vez que esses compostos apresentam diversas aplicações: a) no desenvolvimento de anti-venenos específicos; b) no desenvolvimento de testes laboratoriais, sendo exemplo típico a batroxobina, utilizada para analisar os níveis de fibrinogênio no plasma, e a ecarina, uma metaloproteinase da serpente asiática *Echis carinatus*, utilizada para ensaios de níveis de protrombina no plasma (Braud et al., 2000); c) no tratamento da trombose e outras coagulopatias, bem como em doenças cardiovasculares, para o qual se faz uso da hirudina, da batroxobina e de outros princípios ativos; d) no desenvolvimento do agente anti-hipertensivo captopril, derivado de um nonapeptídeo presente no veneno de *B. jararaca* (Ferreira, 1965). O conhecimento da estrutura e da função dos componentes desses venenos também é de grande interesse para estudos de modelagem de novas

drogas terapêuticas destinadas não apenas ao tratamento de trombose, como também de outros problemas de saúde humana, incluindo desde quadros inflamatórios até o câncer (Markland, 1998; Bon, 2000; Braud et al., 2000; Matsui et al., 2000). O alto grau de especificidade na atividade dessas proteínas sobre a cascata da coagulação do sangue faz com que elas sejam ferramentas muito úteis para o estudo dos mecanismos de ação, da regulação e das relações entre estrutura e função dos fatores da coagulação (Braud et al., 2000; Kini, 2005).

Entre os artrópodos, um considerável grupo produz diversos agentes que atuam no processo hemostático de diferentes maneiras, apresentando papel importante na hematofagia. Além de artrópodos hematófagos, alguns insetos da ordem Lepidoptera, quando no estágio larval ou de lagarta, produzem venenos que interferem na hemostasia e que têm papel fundamental na defesa contra predadores, os quais são envenenados ao contato com as espículas que revestem o corpo desses animais (Kelen et al., 1995; Veiga et al., 2001). Os casos mais severos de envenenamento por lagartas resultam do contato físico com indivíduos do gênero *Lonomia* (Lepidoptera, Saturniidae), que leva a uma síndrome hemorrágica em humanos, caracterizada por equimoses, hematúria, sangramentos das mucosas, hemorragia intracerebral e insuficiência renal aguda (Arocha-Piñango & Guerrero, 2001).

O presente trabalho trata de aspectos funcionais e moleculares do veneno da lagarta *Lonomia obliqua* (Fig. 1.3a). Um breve histórico sobre essa espécie, sobre sua biologia e sobre estudos científicos recentes que tratam das atividades do seu veneno são descritos a seguir.

1.2.1. *A taturana Lonomia obliqua*

Os insetos da ordem Lepidoptera, que compreendem borboletas e mariposas, quando na fase larval são conhecidos como taturanas, lagartas, bichos-cabeludos, dentre outras denominações. Nesta fase, muitas espécies são responsáveis por causar envenenamentos em humanos, cujos sintomas variam conforme a espécie envolvida, o grau de contato e a resposta individual da vítima. Os sintomas mais comuns são as reações cutâneas, urticária, dor e sensação de queimadura no local de contato, mas também pode ocorrer náusea, dores de cabeça, febre, reações alérgicas, conjuntivite e, em casos mais raros e específicos, artrite, distúrbios da coagulação, hemorragias e insuficiência renal aguda (Diaz, 2005).

No Brasil, já na época da colonização, o padre Anchieta citou, na “Carta de São Vicente” de 1560, o medo dos índios frente a algumas lagartas que causavam tais acidentes, produzindo inúmeras reações e dor intensa após o contato físico (Rotberg, 1971; Costa, 1994). Esses animais eram chamados de “tatá-raná”, nome que em Tupi-Guarani significa “como fogo” ou “semelhante ao fogo”; mais tarde este nome originou, na língua portuguesa, a palavra “taturana”. Em artigo intitulado “Estudo Biológico das Lagartas Urticantes ou Tatoranas” publicado nos Annaes Paulistas de Medicina e Cirurgia em 1914, Rodolpho von Ihering descreveu características morfológicas e histológicas de algumas lagartas brasileiras, bem como os efeitos causados pelos respectivos venenos sobre o organismo humano, citando inclusive os estudos realizados por Marcgrave e Piso, publicados nas duas edições da “Historia Naturalis Brasiliae”, de 1648 e 1658. Um dos casos relatados, ocorrido em 1912 (também citado por Rotberg, 1971 e por Costa, 1994), envolvia um paciente que, após o contato com uma colônia de

lagartas desconhecidas, passou a apresentar – além dos sintomas já conhecidos de acidentes com outras espécies – saliva sangüinolenta e hematúria, sintomas característicos de distúrbios no sistema hemostáticos, os quais duraram cerca de 3 dias. As lagartas que causaram esse acidente não foram, todavia, identificadas na época. Apesar do artigo de von Ihering ser uma obra de extrema utilidade para os estudos atuais, o conhecimento científico da época – bem como a metodologia disponível para ser utilizada – limitavam sobremaneira o aprofundamento dos estudos sobre a ação desses venenos no organismo humano.

No final da década de 60 surgiram as primeiras publicações relatando casos de envenenamento por contato com lagartas do gênero *Lonomia* na América do Sul, mais especificamente com a espécie *L. achelous* na Venezuela (Arocha-Piñango, 1967), enquanto no Brasil os primeiros relatos datam do final da década de 80, envolvendo a espécie *L. obliqua*, no sul do país (Duarte et al., 1990). As vítimas, após contato com o animal, apresentavam distúrbios na coagulação sangüínea semelhantes àqueles descritos no trabalho de von Ihering.

O gênero *Lonomia* pertence à ordem Lepidoptera, subordem Ditrysia, superfamília Bombycoidea, família Saturniidae, subfamília Hemileucinae. A maioria das espécies de mariposas desse gênero distribuem-se em regiões da América do Sul, mas há registros também de sua ocorrência no México e na América Central. No Brasil, além das espécies acima citadas, já foram descritas as espécies *L. cynira*, *L. cluacina*, *L. circumstans*, *L. falcata submacula*, porém não existe nenhum registro de envenenamento causado por essas espécies (Lorini, 1999).

O ciclo de vida da *L. obliqua* é mostrado na Figura 1.3b. Na fase adulta, as mariposas de *L. obliqua* têm hábito noturno e apresentam dimorfismo sexual, sendo o macho amarelado e de cores mais vivas do que a fêmea, que apresenta tonalidade pardosado (Lorini, 1999). Os adultos vivem cerca de 15 dias (Ministério da Saúde, 1998) e a ovipostura ocorre cerca de 7 dias após a cópula. Os ovos são esverdeados e o período de incubação pode variar de 17 a 30 dias. Após a eclosão, as larvas passam por 6 instares antes de atingirem a fase de pupa, período que pode variar de 50 a 80 dias (Ministério da Saúde, 1998; Lorini, 1999). Na fase de pupa também é observado dimorfismo sexual, sendo o macho menor que a fêmea. A duração desta fase varia conforme as condições do ambiente. O valor mínimo já registrado para o ciclo de vida de *L. obliqua* foi de quatro meses e meio e o valor máximo de oito meses e meio (Lorini, 1999).

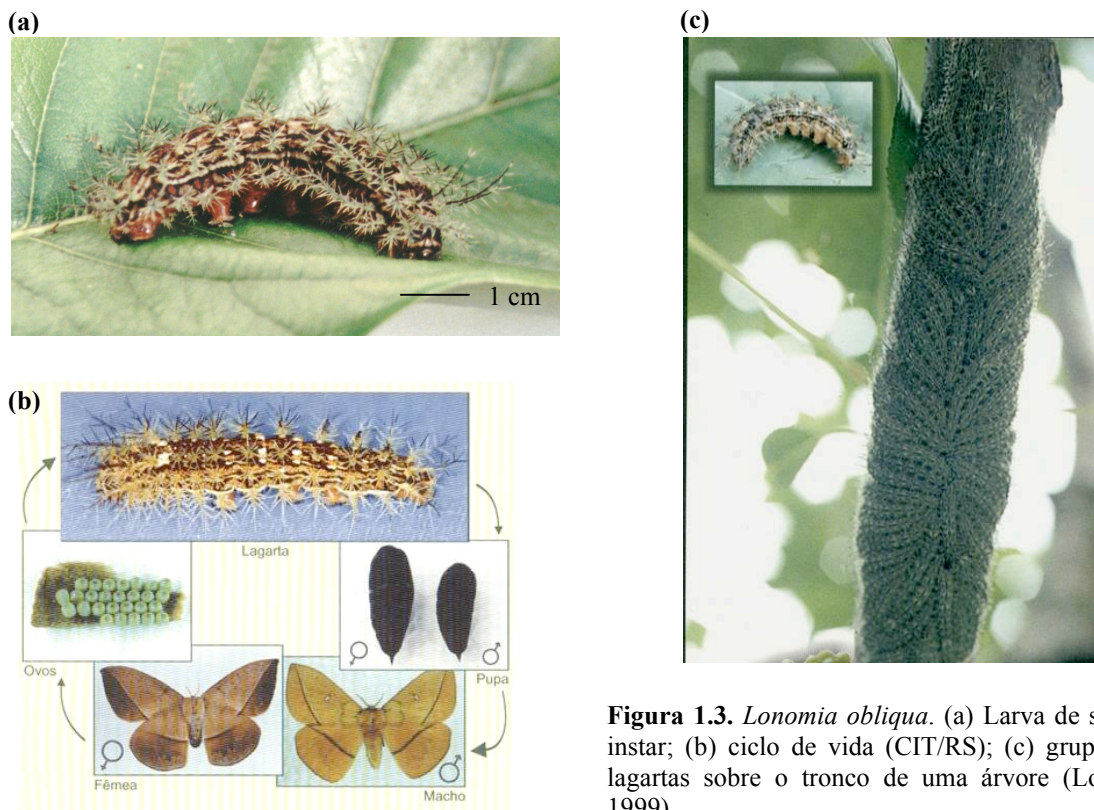


Figura 1.3. *Lonomia obliqua*. (a) Larva de sexto instar; (b) ciclo de vida (CIT/RS); (c) grupo de lagartas sobre o tronco de uma árvore (Lorini, 1999).

As larvas de *L. obliqua* têm hábito gregário, vivendo em colônias sobre troncos de diversas árvores – como ipê, araticum, abacateiro, goiabeira, pessegueiro e amoreira – de cujas folhas se alimentam. À noite sobem aos galhos mais altos para se alimentarem e durante o dia permanecem agrupadas nas partes mais baixas e sombreadas dos troncos das árvores, o que facilita a ocorrência dos acidentes, os quais ocorrem quando uma pessoa encosta no tronco sem notar a presença das lagartas. Diversos estudos consideram que o hábito gregário em insetos é uma resposta adicional para acentuar a existência de outras formas de defesa, geralmente morfológicas (espículas) ou químicas (toxinas de base protéica) apresentadas por estes organismos. No que diz respeito à defesa química, a toxicidade está geralmente presente em regiões mais proeminentes do corpo (asas, pêlos e cerdas), o que torna a defesa mais eficiente (Vulinec, 1990). O mimetismo também é um importante mecanismo de defesa para as espécies de hábito gregário, uma vez que estas estão sujeitas a uma maior exposição física do que os animais de hábito isolado, aumentando assim o risco de serem tornarem presas fáceis (Bücherl, 1971; Vulinec, 1990). A combinação de todas essas defesas permite que uma espécie explore ambientes de risco e de exposição, como por exemplo a superfície de folhas e de troncos. A espécie *Lonomia obliqua* demonstra possuir todas essas defesas, pois além da toxicidade das espículas e do corpo dos indivíduos, o mimetismo é notável quando as lagartas estão agrupadas sobre os troncos das árvores (Fig. 1.3c).

Cabe aqui diferenciar a ação defensiva do veneno dessas lagartas do envenenamento causado por muitos outros animais, tais como escorpiões, aranhas e serpentes, cujas substâncias tóxicas (também de natureza protéica), quando inoculadas nas vítimas, funcionam como mecanismo de apreensão das presas e vêm a funcionar,

posteriormente, como coadjuvantes (geralmente enzimas proteolíticas) na digestão das presas deglutidas. Nesses últimos, há uma relação morfológica e fisiológica entre o aparelho produtor de veneno e os aparelhos digestivo e salivar. Já as larvas de lepidópteros, assim como abelhas e vespas, diversos animais marinhos e algumas espécies de sapos, possuem substâncias venenosas que não estão relacionadas à obtenção de alimento e que se prestam tão somente como mecanismo de defesa do animal contra predadores, não havendo relação dos sistemas digestivo e salivar com a produção de veneno (Bücherl, 1971; Marval & Arocha-Piñango, 1993).

Em um estudo detalhado da morfologia da *L. obliqua* mostramos anteriormente (Veiga et al., 2001) que não há glândula produtora de veneno no animal e que o tegumento da lagarta é revestido internamente por um epitélio secretor e composto externamente por inúmeras especializações cuticulares, de formato espinhoso, as quais apresentam um papel fundamental na defesa do animal, pois penetram na superfície de contato do inimigo, sofrendo ruptura e injetando o veneno (Fig. 1.4) (Veiga et al., 2001).

Os sintomas apresentados pela maioria das vítimas incluem hemorragias, hematomas, epistaxe, hematuria, sangue nas fezes, insuficiência renal aguda e, em casos graves, hemorragia intracerebral e morte (Duarte et al., 1990; Duarte, 1996; Arocha-Piñango & Guerrero, 2001) (Fig. 1.5). O quadro clínico é muito semelhante àquele descrito para os acidentes que ocorrem na Venezuela com a espécie *L. achelous*, porém a insuficiência renal aguda não é tão comum naquela espécie. Os estudos realizados *in vitro* com os venenos dessas duas espécies também apresentam diferenças nas atividades encontradas, que estão resumidas na Tabela 1. Apesar da semelhança nas demais atividades encontradas, ainda existe muita controvérsia sobre as bases moleculares do

envenenamento: a síndrome hemorrágica causada por *L. achelous* é atribuída principalmente à atividade fibrinogenolítica presente no veneno e a uma leve coagulopatia de consumo causada pelas atividades pró-coagulantes; já nos casos que envolvem a espécie *L. obliqua*, a maioria dos estudos atribuíam os sintomas do envenenamento à ação do ativador de protrombina e à coagulopatia de consumo resultante (Reis et al., 1999; Reis et al., 2001), enquanto a presença de uma atividade fibrinogenolítica não era considerada relevante. Uma das explicações para a diferença das atividades encontradas é o tipo de material utilizado em cada estudo. Enquanto aqueles com *L. achelous* empregam principalmente a hemolinfa da lagarta, a maioria dos estudos com *L. obliqua* fazem análise do extrato de espículas.

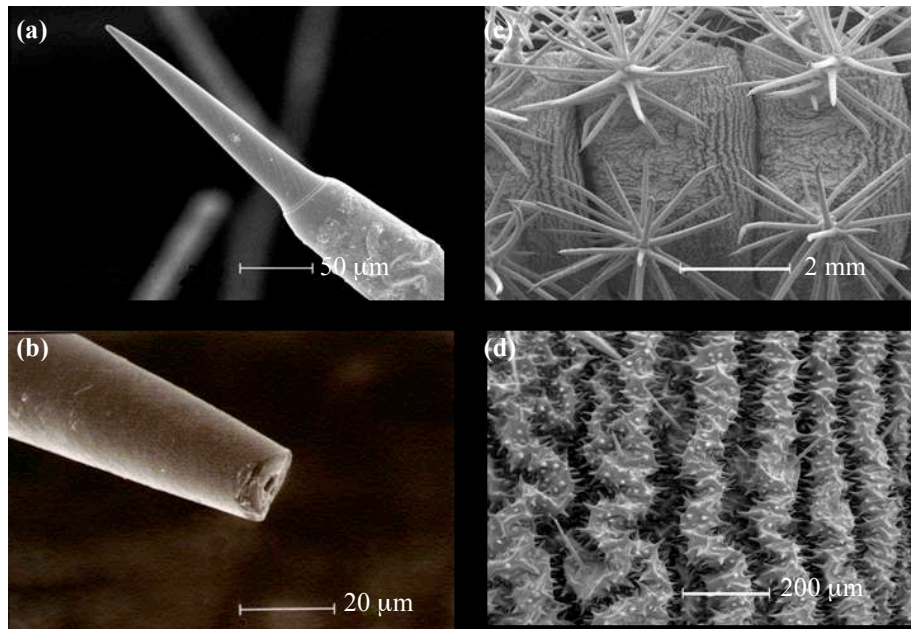


Figura 1.4. Ultraestrutura do tegumento de *L. obliqua*. Em (a), espícula íntegra; em (b), espícula quebrada na extremidade, com canal interno exposto; em (c), região dorsal do tegumento com vários *scoliti* contendo as espículas; em (d), diversas estruturas quitinosas que compõem a base do tegumento. Veiga et al., 2001.

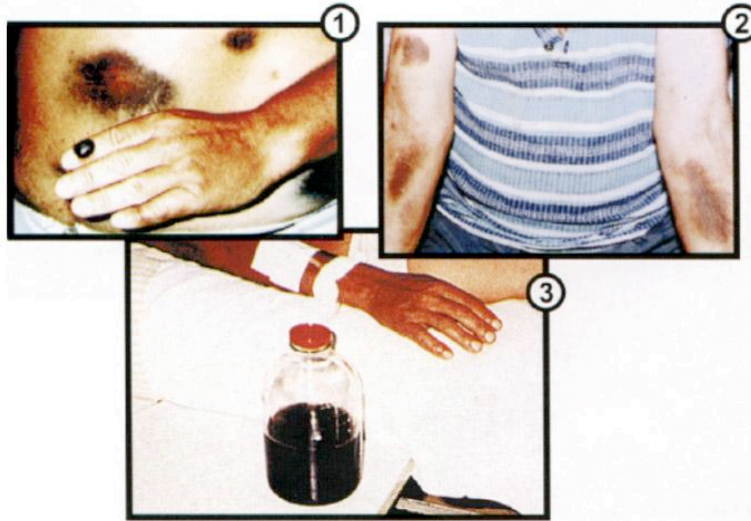


Figura 1.5. Quadro clínico resultante do envenenamento por *L. obliqua*. Em (1) e (2), hematomas, hemorragias e bolha de sangue decorrentes do contato físico com a lagarta; em (3), urina do paciente. Abella et al., 1998.

Tabela 1. Atividades dos venenos de *Lonomia* (*in vitro*)

Espécie	Atividade	Referência
<i>L. obliqua</i>	Ativador de protrombina	Donato et al., 1998
	Ativador de Fator X	Donato et al., 1998
	Fosfolipase	Seibert et al., 2003
	Atividade fibrin(ogen)olítica	Veiga et al., 2003; Pinto et al., 2004
	Hialuronidase	Gouveia et al., 2004
<i>L. achelous</i>	Atividade fibrin(ogen)olítica	Arocha-Piñango et al., 1981; Amarant et al., 1991
	Ativador de protrombina	Guerrero & Arocha-Piñango, 1992
	Atividade que degrada Fator XIII	Guerrero et al., 1997
	Ativador de Fator V	López et al., 2000
	Inibidor de Fator V	López et al., 2000

Considerando que o epitélio que reveste o tegumento apresenta células secretoras e que na maioria dos acidentes o animal é esmagado e a vítima entra em contato com várias secreções – não apenas com as espículas – nosso grupo vem trabalhando com diferentes preparações de veneno, o que possibilita obter o máximo de informação das atividades possivelmente envolvidas no envenenamento. As preparações de veneno são:

hemolinfa, extraída através de um corte no pseudopé (pseudopata) do animal; criosecreção, extraída lavando animais previamente congelados a -20 °C; extrato de espículas, obtido por homogenização das espículas cortadas na base do *scolus*; extrato de tegumento, obtido por homogenização de todo o tegumento (cutícula, incluindo espículas) após dissecação dos órgãos internos da lagarta. A presença de uma atividade fibrinogenolítica em *L. obliqua* vem sendo estudada desde 2000 pelo nosso grupo de pesquisa (Pinto et al., 2000). Tal atividade foi encontrada na criosecreção, o que explica o fato de ela não ser identificada por outros grupos. No presente trabalho esta atividade é identificada no extrato de espículas de *L. obliqua* (Veiga et al., 2003). Diferenças em outras atividades também são notáveis quando as quatro amostras são estudadas, como por exemplo a ativação de protrombina, que é maior no extrato de espículas e praticamente inexistente na criosecreção (Veiga, dissertação de mestrado).

Apesar da importância social e científica do envenenamento por essas lagartas, o conhecimento sobre a estrutura molecular e a composição das toxinas de *Lonomia* sp. é praticamente inexistente. De fato, até novembro de 2004, uma busca no GenBank utilizando a palavra-chave “*Lonomia*” apresentava como resultado apenas a seqüência parcial de aminoácidos das duas proteases fibrinolíticas de *L. achelous* (Amarant et al., 1991), além da seqüência da poliedrina de um nucleopoliedrovírus de *L. obliqua*. O presente trabalho teve como objetivo preencher essa lacuna, buscando maiores informações sobre os constituintes moleculares do veneno de *L. obliqua*.

2. Objetivos

O presente trabalho teve dois objetivos principais: 1) identificar genes que codificam para os princípios ativos do veneno das lagartas da espécie *L. obliqua* e correlacioná-los às proteínas que compõem as preparações venenosas; 2) selecionar moléculas candidatas para clonagem e expressão de proteínas provavelmente envolvidas no envenenamento e que possam ser utilizados em estudos funcionais e estruturais, no diagnóstico do envenenamento e no tratamento dos pacientes.

Para tanto, o projeto teve como base o estudo das principais atividades do veneno, bem como o estudo do transcriptoma e do proteoma da lagarta. O projeto constituiu-se das seguintes etapas:

- análise dos princípios ativos presentes no veneno de *L. obliqua* utilizando ensaios de atividade;
- construção de bibliotecas de cDNA de tecidos envolvidos no envenenamento por *L. obliqua* (tegumento e espículas);
- seqüenciamento em massa de transcritos (cDNAs) e análise das seqüências utilizando ferramentas de bioinformática;
- análise das proteínas mais abundantes de secreções venenosas da lagarta através de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e seqüenciamento da região amino (N)-terminal por degradação de Edman;
- análise das seqüências de aminoácidos obtidas e das seqüências nucleotídicas das bibliotecas de cDNA para que fosse feita, quando possível, a correlação entre o cDNA e a provável proteína por ele codificada;

- organização de um catálogo de genes transcritos (cDNAs) e de proteínas de *L. obliqua*;
- seleção de moléculas candidatas, clonagem e expressão das proteínas;
- análise da atividade das proteínas expressas e comparação com as proteínas nativas.

O provável papel de cada molécula na síndrome hemorrágica causada pelo envenenamento com esta lagarta é discutido ao longo do trabalho.

3. Resultados

Este capítulo apresenta as etapas do trabalho que foram concluídas e cujos resultados deram origem a artigos completos. O capítulo está dividido em três sub-capítulos, cada um consistindo de um artigo, sendo que os dois primeiros já foram publicados, enquanto o terceiro foi submetido para publicação.

Cada artigo contém uma introdução, os materiais e a metodologia utilizados, a descrição dos resultados, a discussão e a bibliografia consultada. Portanto, essas seções não serão descritas novamente na tese e podem ser consultadas diretamente na versão publicada do trabalho.

3.1. Atividades paradoxais no veneno de *L. obliqua*: ativador de protrombina e atividade fibrin(ogen)olítica no extrato de espículas

1º Artigo: Veiga, A.B.G., Pinto, A.F.M., Guimarães, J.A., 2003. Fibrinogenolytic and procoagulant activities in the hemorrhagic syndrome caused by *Lonomia obliqua* caterpillars. *Thrombosis Research* 111, 95-101.

Como não há uma glândula de veneno na lagarta (Veiga et al., 2001), os tecidos selecionados para estudos de biologia molecular (extração de RNA e construção de bibliotecas de cDNA) foram as espículas e o tegumento. Para maior garantia de que as principais atividades tóxicas do veneno encontram-se em pelo menos um dos tecidos selecionados, foi feita a identificação da atividade ativadora de protrombina e da atividade fibrin(ogen)olítica nas espículas. Pela primeira vez foi mostrado que ambas as atividades estão presentes neste tecido.

Até então os sintomas do envenenamento eram atribuídos principalmente à atividade pró-coagulante do extrato de espículas (Reis et al., 1999; Reis et al., 2001, Zannin et al., 2003). A maioria dos estudos com o ativador de protrombina sugerem que a ação desse princípio ativo causa uma coagulação intravascular disseminada e que a hemorragia observada nos pacientes seria resultante de uma “fibrinólise secundária”. Em outras palavras, a fibrinólise observada estaria associada à formação de fibrina resultante da ação da trombina a qual, por sua vez, encontra-se em altos níveis devido à presença do ativador de protrombina do veneno.

Entretanto, neste artigo é mostrado, pela primeira vez, que uma atividade fibrin(ogen)olítica também está presente no extrato de espículas, o que sugere que a atividade fibrin(ogen)olítica apresenta papel até mesmo em envenenamentos mais leves, nos quais a vítima apenas encosta na lagarta, sem haver esmagamento. Portanto, sugerimos que no envenenamento por *L. obliqua* ocorre também um quadro de fibrinólise primária, em que há ação de uma atividade fibrin(ogen)olítica direta, com conseqüente degradação de fibrinogênio e de fibrina. Tal atividade, combinada à atividade pró-coagulante e outras atividades menos estudadas do veneno, leva ao quadro final de hemorragia acompanhada por coagulação intravascular disseminada.

O trabalho foi publicado no *Thrombosis Research*, conforme segue. Em outro trabalho (Capítulo 8), nosso grupo identificou e purificou a mesma atividade na criosecreção da lagarta (Pinto et al., 2004).

3.2. Genes que codificam para princípios ativos do veneno de

Lonomia obliqua

2º Artigo: 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.

A principal etapa deste projeto deu origem ao artigo apresentado a seguir. O trabalho baseou-se na construção de bibliotecas de cDNA de tecidos de *L. obliqua*, seguida por seqüenciamento em massa e análise das seqüências utilizando ferramentas de bioinformática. Também foi realizada análise por SDS-PAGE e seqüenciamento da região N-terminal das proteínas mais abundantes nos materiais venenosos. Os resultados obtidos foram utilizados para gerar, no final, um catálogo contendo informações sobre as moléculas provavelmente associadas ao envenenamento. Além disso, as primeiras seqüências de *L. obliqua* enviadas ao GenBank (NCBI) resultaram deste trabalho.

O trabalho foi publicado no *Gene*, conforme anexado. As figuras e tabelas também podem ser acessadas no sítio eletrônico do NCBI <http://www.ncbi.nih.gov/projects/omes>.

3.3. Uma lipocalina de *Lonomia obliqua* participa da conversão de heme em biliverdina IX γ

3º Artigo: Veiga, A.B.G., Ribeiro, J.M.C., Francischetti, I.M.B., Guimarães, J.A., Andersen, J.F., 2005. *In situ* conversion of heme to biliverdin IX γ by an insect bilin-binding protein.

Os estudos que originaram o artigo anterior mostraram que a proteína mais abundante em lagartas de *L. obliqua* pertence à família das lipocalinas; o número de transcritos para essa proteína também é significativamente maior do que para outros grupos de proteínas, principalmente na biblioteca de cDNA de espículas.

As primeiras lipocalinas descritas em insetos foram a insecticianina de *Manduca sexta* (Riley et al., 1984) e a proteína ligadora de bilina de *Pieris brassicae* (Huber et al., 1987), ambas capazes de ligar biliverdina, sendo importantes na camuflagem do animal, conferindo assim proteção contra predadores. Outras lipocalinas descritas em insetos são as nitroforinas de *Rhodnius prolixus*, que apresentam atividade anti-hemostática, seja através da inibição de fatores da coagulação ou, como doadoras de NO, promoverem vasodilatação e redução de processos inflamatórios do hospedeiro.

Alguns estudos recentes sobre o ativador de protrombina de *L. obliqua* descrevem essa proteína como sendo uma serino-protease e membro da família das lipocalinas. A seqüência de aminoácidos descrita é a mesma encontrada, por nós, para a lipocalina de *L.*

obliqua. Entretanto, não se conhece nenhuma outra lipocalina com atividade serino-proteásica.

A fim de elucidar a função da lipocalina de *L. obliqua* e verificar um possível papel dessa proteína no envenenamento, foi realizada a clonagem do cDNA codificante e a expressão dessa proteína. Nossos resultados, conforme o trabalho apresentado a seguir, mostram que a proteína recombinante é uma lipocalina típica, é desprovida de atividade pró-coagulante e não parece ter qualquer outra atividade direta sobre a coagulação sangüínea. A lipocalina de *L. obliqua* apresenta alta similaridade com as proteínas ligadoras de biliverdina já conhecidas e, além disso, liga o grupamento heme e promove a oxidação acoplada (atividade tipo heme-oxigenase) do heme levando à formação de biliverdina.

O manuscrito resultante desta etapa está formatado para ser submetido para publicação no *The Journal of Biological Chemistry*.

5. Conclusões

Os resultados obtidos e aqui apresentados mostram o quão complexa é a composição protéica do veneno de *Lonomia obliqua*. No desenvolvimento do trabalho mostramos que:

- o extrato de espículas contém princípios ativos pró-coagulantes e fibrinolíticos, isto é, além de consumir rapidamente os fatores da coagulação através da ativação da protrombina, o veneno degrada o fibrinogênio e a fibrina, contribuindo diretamente para o desenvolvimento do grave quadro hemorrágico.

- um número significativo de genes expressos no tegumento e nas espículas codificam para proteases e inibidores de proteases com potencial ação no processo hemostático. Estes princípios ativos apresentam propriedades que os indica como possíveis participantes no envenenamento.

- outras proteínas produzidas no tegumento e nas espículas podem estar direta ou indiretamente relacionadas ao quadro clínico do envenenamento, tais como lectinas, fosfolipases A₂ e moléculas com ação anti-microbiana.

- o grupo de seqüências (*cluster*) mais abundante na biblioteca de cDNA de espículas é aquele que codifica para uma lipocalina (LOqua-Lipcl1).

- a lipocalina recombinante não apresenta atividade sobre a coagulação sangüínea nem sobre a fibrinólise.

- a lipocalina recombinante liga o grupamento heme e, na presença de um agente redutor como o ascorbato, participa da conversão do heme em biliverdina γ , o mesmo pigmento ligador da lipocalina nativa do extrato de espículas.

Os resultados aqui descritos sugerem que, além de princípios ativos agindo diretamente sobre a coagulação sangüínea e sobre o processo fibrinolítico, várias outras proteínas estão presentes nas secreções produzidas pela lagarta, as quais também são inoculadas nas vítimas do envenenamento. A análise do transcriptoma do tegumento e das espículas da lagarta sugere que muitas dessas proteínas constituem princípios ativos provavelmente envolvidos, direta ou indiretamente, na evolução do quadro clínico observado nos pacientes envenenados.

A hemolinfa e o veneno de artrópodos possuem uma variedade de peptídeos anti-microbianos e citolíticos que não apenas conferem proteção imunológica ao animal como também, ao interagirem entre si, tornam o veneno mais potente. Por exemplo, peptídeos citolíticos tais como a melitina de *Apis mellifera* e a bombolitina de *Megabombus pennsylvanicus* facilitam a atividade das fosfolipases A_2 presentes nos venenos dessas espécies de abelhas (ver revisão em Kuhn-Nentwig, 2003). De forma semelhante, é possível que moléculas citolíticas ou anti-microbianas presentes em *L. obliqua*, tais como as LOqua-Def's, contribuam para a atividade hemorrágica do veneno, seja diretamente ou indiretamente, através da interação com outros componentes do veneno da lagarta, como por exemplo com fosfolipase A_2 .

Além da resposta imune envolvendo peptídeos anti-microbianos como os acima citados, os artrópodos também possuem um sistema hemostático muito eficiente, o qual está intimamente relacionado ao sistema imunológico, participando da defesa contra patógenos e evitando o extravasamento de hemolinfa face a uma lesão na cutícula. As principais cascatas enzimáticas envolvidas nesses processos é a cascata da coagulação da hemolinfa – que, de forma semelhante à coagulação em vertebrados, leva à deposição de

proteínas especializadas na formação do coágulo – e a cascata da profenoloxidase. Estudos mais recentes têm mostrado que a cascata da profenoloxidase, antes tida como processo exclusivamente imune, participa diretamente do processo da coagulação da hemolinfa. A ampla diversidade de genes que codificam para profenoloxidases em insetos sugere a variedade desse processo quanto à atividade enzimática e à especificidade de substratos (Theopold et al., 2002). As profenoloxidases de *L. obliqua* descritas no presente trabalho, além de contribuírem para o melhor conhecimento do sistema imunológico e hemostático de insetos, podem estar relacionadas aos efeitos do veneno sobre a coagulação humana. Uma hipótese seria que a ruptura das estruturas quitinosas da lagarta durante o contato físico levem ao desencadeamento da cascata da coagulação e da profenoloxidase no inseto, e que enzimas participantes desses processos apresentem especificidade para substratos presentes não apenas na hemolinfa do animal, mas também no sangue humano, ativando a cascata da coagulação sangüínea e/ou a fibrinólise.

A otimização da composição dos venenos e da hemolinfa dos artrópodos é importante para garantir o sucesso na defesa contra inimigos e predadores sem, no entanto, representar grande gasto de energia para o animal. Assim, é esperada a presença de uma variedade de moléculas que, mesmo quando produzidas em baixas quantidades, são altamente eficazes e agem, muitas vezes, de maneira sinérgica aumentando a eficiência do processo. Muitos estudos, inclusive os mais recentes, atribuem papel central ao ativador de protrombina como o principal – senão único – princípio ativo responsável pelos vários sintomas da síndrome hemorrágica por *L. obliqua* (Reis et al., 1999; Fritzen et al., 2005). Ao nosso ver, esses estudos simplificam o quadro do envenenamento e não

levam em consideração a variedade de princípios ativos da lagarta que possam estar agindo no processo. Além disso, esses estudos empregam extrato de espículas parcialmente purificado, o que não exclui a possibilidade de mais de uma atividade estar presente na amostra utilizada nos ensaios. Ou seja, enzimas extremamente ativas presentes em quantidades muito baixas no extrato de espículas podem estar atuando conjuntamente com o ativador de protrombina, erroneamente sugerindo que todas as atividades sejam devidas a esse princípio ativo. Como exemplo dessa simplificação temos o fato de que, dependendo da técnica de purificação por cromatografia utilizada para isolar as proteínas do extrato de espículas, a lipocalina – proteína mais abundante deste extrato – pode formar aglomerados, sendo eluída na maioria das frações cromatográficas (resultados não mostrados nesta Tese de Doutorado). Assim, a seqüência de aminoácidos obtida para frações com diferentes atividades é aquela da lipocalina e não a do princípio ativo de interesse. Esse tipo de análise acaba gerando informações confusas, como por exemplo trabalhos relatando a mesma seqüência de aminoácidos para o ativador de protrombina (Reis et al., 2001) e para uma atividade tipo fator Xa (Lilla et al., 2005). Essa seqüência, como esperado, é aquela encontrada, por nós, para a lipocalina. No entanto, nossos resultados com a proteína recombinante mostram que a lipocalina não apresenta nenhuma atividade sobre a coagulação sangüínea nem sobre a fibrinólise. Por outro lado, em experimentos recentes obtivemos a purificação de um ativador de protrombina separado da lipocalina e que apresentou a seqüência de aminoácidos de outra serino protease (resultados não mostrados nesta Tese de Doutorado).

Em face disto, consideramos fundamental desenvolver estudos mais aprofundados das secreções venenosas para que possam ser feitas conclusões mais coerentes e com bases mais fundamentadas sobre as origens deste envenenamento. A clonagem de genes da lagarta e a expressão de proteínas com ação na hemostasia, simultaneamente à análise do proteoma, purificação das amostras de veneno e ensaios de atividade constituem ferramentas mais completas para a identificação e caracterização dos princípios ativos do veneno. Além disso, é fundamental a realização de ensaios biológicos em diferentes modelos animais, a fim de melhor elucidar e simular o envenenamento em humanos.

6. Referências Bibliográficas

- Aird, S.D., 2002. Ophidian envenomation and the role of the purines. *Toxicon* 40, 335-393.
- Amarant, T., Burkhart, W., LeVine, H., Arocha-Piñango, C.L., Parikh, I., 1991. Isolation and complete aminoacid sequence of two fibrinolytic proteinases from the toxic *Saturnid* caterpillar *Lonomia achelous*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1079, 214-221.
- Arocha-Piñango, C.L., 1967. Fibrinólisis producida por contacto con orugas. Comunicación preliminar. *Acta Científica Venezolana* 18, 136-139.
- Arocha-Piñango, C.L., Perales, J., Carvajal, Z., 1981. Studies on the degradation of fibrinogen by fibrinolytic enzymes from the larvae of *Lonomia achelous* (Cramer). *Thrombosis and Haemostasis* 45, 233-236.
- Arocha-Piñango, C.L., Guerrero, B., 2001. *Lonomia* genus caterpillar envenomation: clinical and biological aspects. *Haemostasis* 31, 288-293.
- Bauer, K.A., 1998. Approach to Thrombosis. In: Loscalzo, J. e Schafer, A. I. *Thrombosis and Hemorrhage*. Maryland, Williams & Wilkins. Cap. 24, p. 477-490.
- Bon, C., 2000. The natural toxins. *Biochimie* 82, 791-792.
- Braud, S., Bon, C., Wisner, A., 2000. Snake venom proteins acting on hemostasis. *Biochimie* 82, 851-859.
- Broze, G.J., 1995. Tissue factor pathway inhibitor and the revised theory of coagulation. *Annual Review of Medicine* 46, 103-112.

- Bücherl, W., 1971. Introduction. In: Bücherl, W., Buckley, E.E. *Venomous Animals and their Venoms*, vol. 3. New York, Academic Press. p. xix-xxii.
- Carmeliet, P., Collen, D., 1998. Genetic Models of Thrombosis and Hemorrhage. In: Loscalzo, J. e Schafer, A. I. *Thrombosis and Hemorrhage*. Maryland, Williams & Wilkins. Cap. 22, p. 435-455.
- Colman, R.W., Bagdasarian, A., Talamo, R.C., Scott, C.F., Seavey, M., Guimarães, J.A., Pierce, J.V., Kaplan, A.P., 1975. Williams trait. Human kininogen with diminished levels of plasminogen and prekallikrein associated with abnormalities of Hageman factor-dependent pathways. *Journal of Clinical Investigation* 56, 1650-1662.
- Costa, R.M., 1994. Acidentes por Lagartas Venenosas. In: Barraviera, B. (coord.) *Venenos animais: uma visão integrada*. Rio de Janeiro, Ed. de Publicações Científicas. p. 327-338.
- Dahlbäck, B., 2000. Blood coagulation. *The Lancet* 355, 1627-1632.
- Donato, J.L., Moreno, R.A., Hyslop, S., Duarte, A., Antunes, E., Le Bonniec, B.F., Rendu, F., De Nucci, G., 1998. *Lonomia obliqua* caterpillar spicules trigger human blood coagulation via activation of Factor X and prothrombin. *Thrombosis and Haemostasis* 79, 539-542.
- Duarte, A.C., Caovilla, J., Lorini, I., Lorini, D., Mantovani, G., Sumida, J., Manfre, P.C., Silveira, R.C., de Moura, S.P., 1990. Insuficiência renal aguda por acidentes com lagartas. *Jornal Brasileiro de Nefrologia* 12, 184-186.
- Duarte, A.C., Crusius, P.S., Pires, C.A.L., Schilling, M.A., Fan, H.W., 1996. Intracerebral haemorrhage after contact with *Lonomia* caterpillars. *The Lancet* 348, 1033.

- Esmon, C.T., 2000. Regulation of blood coagulation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1477, 349-360.
- Esmon, C.T., 2004. Interactions between the innate immune and blood coagulation systems. *Trends in Immunology* 25, 536-542.
- Ferreira, S., 1965. A bradykinin-potentiating factor (BPF) present in the venom of *Bothrops jararaca*. *Brazilian Journal of Pharmacology* 24, 163-169.
- Fritzen, M., Flores, M.P.A., Reis, C.V., Chudzinski-Tavassi, A.M., 2005. A prothrombin activator (Lopap) modulating inflammation, coagulation and cell survival mechanisms. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 333, 517-523.
- Gouveia, A.I.C.B., Silveira, R.B., Nader, H.B., Dietrich, C.P., Gremski, W., Veiga, S.S., 2005. Identification and partial characterisation of hyaluronidases in *Lonomia obliqua* venom. *Toxicon* 45, 403-410.
- Guerrero, B., Arocha-Piñango, C.L., 1992. Activation of human prothrombin by the venom of *Lonomia achelous* (Cramer) caterpillars. *Thrombosis Research* 66, 169-178.
- Guerrero, B., Arocha-Piñango, C.L., Gil, A., 1997. *Lonomia achelous* Caterpillar Venom (LACV) selectively inactivates blood clotting factor XIII. *Thrombosis Research* 87, 83-93
- Huber, R., Schneider, M., Epp, O., Mayr, I., Messerschmidt, A., Pflugrath, J., Kayser, H., 1987. Crystallization, crystal structure analysis and preliminary molecular model of the bilin binding protein from the insect *Pieris brassicae*. *Journal of Molecular Biology* 195,423-434.

- Jenny, N.S., Mann, K.G., 1998. Coagulation Cascade: an Overview. In: Loscalzo, J. e Schafer, A. I. *Thrombosis and Hemorrhage*. Maryland, Williams & Wilkins, 1998. Cap. 1, p. 3-27.
- Kelen, E.M.A., Picarelli, Z.P., Duarte, A.C., 1995. Hemorrhagic syndrome induced by contact with caterpillars of the genus *Lonomia* (Saturniidae, Hemileucinae). *Journal of Toxicology - Toxin Reviews* 14, 283-308.
- Kini, R.M., 2005. The intriguing world of prothrombin activators from snake venom. *Toxicon* 45, 1133-1145.
- Kuhn-Nentwig, L., 2003. Antimicrobial and cytolytic peptides of venomous arthropods. *Cellular and Molecular Life Sciences* 60, 2651-2668.
- 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. *Journal of Mass Spectrometry* 40, 405-412.
- López, M., Gil, A., Arocha-Piñango, C.L., 2000. The action of *Lonomia achelous* caterpillars venom on human factor V. *Thrombosis Research* 98, 103-110.
- Lorini, L.M., 1999. *A Taturana – Aspectos biológicos e morfológicos da Lonomia obliqua*. Passo Fundo, EDIUPF.
- Marcus, A.J., Safier, L.B., 1993. Thromboregulation-multicellular modulation of platelet reactivity in hemostasis and thrombosis. *FASEB Journal* 7, 516-522.
- Markland, F.S. Jr., 1997. Snake venoms. *Drugs* 54, 1-10.
- Markland, F.S., 1998. Snake Venoms and the Hemostatic System. *Toxicon* 36 (12), 1749-1800.

- Markwardt, F., 1970. Hirudin as an inhibitor of thrombin. *Methods in Enzymology* 19, 924-932.
- Marval, E., Arocha-Piñango, C.L., 1993. Efecto de algunos venenos y secreciones de animales sobre el mecanismo hemostático. *Interciencia* 18, 10-15.
- Matsui, T., Fujimura, Y., Titani, K., 2000. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1477, 146-156.
- Ministério da Saúde, 1998. Acidentes por Lepidópteros. In: *Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos*. Brasília, Fundação Nacional de Saúde. p. 75-84.
- Monteiro, R.Q., Rapôso, J.G., Wisner, A., Guimarães, J.A., Bon, C., Zingali, R.B., 1999. Allosteric Changes of Thrombin Catalytic Site Induced by Interaction of Bothrojaracin with Anion-Binding Exosites I and II. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 262, 819-822.
- Opal, S.M., Esmon, C.T., 2003. Bench-to-bedside review: Functional relationships between coagulation and the innate immune response and their respective roles in the pathogenesis of sepsis. *Critical Care* 7, 23-38.
- Pierce, J.V., Guimarães, J.A., 1975. Further characterization of highly purified human plasma kininogen. *Life Sciences* 16, 790-791.
- Pinto, A.F.M., Veiga, A.B.G., Blochtein, B., Guimarães, J.A., 2000. Proteases from different secretions are involved on the paradoxical (pro-coagulant and hemorrhagic) envenomation caused by *Lonomia obliqua* caterpillars. In: Ménez, A. et al. (org.) *Toxins from animals, plants and microbes*. (Livro de Programa e Resumos – XIIIth World Congress of the International Society on Toxinology-IST, Paris). P 178.

- Pinto, A.F.M., Dobrovolski, R., Veiga, A.B.G., Guimarães, J.A., 2004. Lonofibrase, a novel α -fibrinogenase from *Lonomia obliqua* caterpillars. *Thrombosis Research* 113, 147–154.
- Pirkle, H., Markland Jr., F.S., 1988. Hemostasis and Animal Venoms. *Hematology*, vol.7. New York, Marcel Dekker.
- 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 Ca^{++} activated serine protease (LOPAP) could be responsible for the haemorrhagic syndrome caused by the caterpillar *Lonomia obliqua*. *The Lancet* 353, 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., 2001. A Prothrombin Activator Serine Protease from the *Lonomia obliqua* Caterpillar Venom (Lopap) Biochemical Characterization. *Thrombosis Research* 102, 427-436.
- Riley, C.T., Barbeau, B.K., Keim, P.S., KCzdy, F.J., Heinrikson, R.L., Law, J.H., 1984. The covalent protein structure of insecticyanin, a blue biliprotein from the hemolymph of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Journal of Biological Chemistry* 259, 13159-13165.
- Rotberg, A., 1971. Lepidopterism in Brazil. In: Bücherl, W., Buckley, E.E. *Venomous Animals and their Venoms*, vol. 3. New York, Academic Press. p. 157-168.
- Seibert, C.S., Shinohara, E.M.G., Sano-Martins, I.S., 2003. In vitro hemolytic activity of *Lonomia obliqua* caterpillar bristle extract on human and Wistar rat erythrocytes. *Toxicon* 41, 831-839.
- Theopold, U., Li, D., Fabbri, M., Scherfer, C., Schmidt, O., 2002. The coagulation of insect hemolymph. *Cellular and Molecular Life Sciences* 59, 363-372.

- 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., Pinto, A.F.M., Guimarães, J.A., 2003. Fibrinogenolytic and procoagulant activities in the hemorrhagic syndrome caused by *Lonomia obliqua* caterpillars. *Thrombosis Research* 111, 95–101.
- 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.
- Webster, M.E., Guimarães, J.A., Kaplan, A.P., Colman, R.W., Pierce, J.V., 1976. Activation of surface-bound Hageman factor: pre-eminent role of high molecular weight kininogen and evidence for a new factor. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 70, 285-299.
- Vulinec, K., 1990. Collective Security: Aggregation by Insects as a Defense. In: Evans, D.L., Schmidt, J.O. *Insect Defenses – Adaptive Mechanisms and Strategies of Prey and Predators*. State University of New York. p. 251-288.
- Zannin, M., Lourenço, D.M., Motta, G., Costa, L.R.D., 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 accidental contact with *Lonomia obliqua* caterpillar in Santa Catarina, Southern Brazil. *Thrombosis and Haemostasis* 89, 355–364.
- Zingali, R.B., Jandrot-Perrus, M., Guillin, M.C., Bon, C., 1993. Bothrojaracin, a new thrombin inhibitor isolated from *Bothrops jararaca* venom. *Biochemistry* 32, 10794-10802.

7. Perspectivas

O presente trabalho abriu novas perspectivas de estudos dos princípios ativos produzidos pela lagarta *L. obliqua*. Várias moléculas foram descobertas com o estudo do transcriptoma da lagarta, muitas das quais já estão sendo clonadas para expressão e caracterização das proteínas, a fim de buscar possíveis mecanismos de ação do veneno.

Paralelamente estamos buscando metodologias mais adequadas para purificar os princípios ativos do veneno, visto que temos notado que as técnicas de separação tradicionalmente empregadas para purificar o veneno de *L. obliqua* têm resultado em contaminação das atividades com a lipocalina. Os resultados até agora obtidos nesta nova fase (não publicados nesta Tese de Doutorado) sugerem que o ativador de protrombina é uma nova proteína ainda desconhecida, que necessita de estudos mais aprofundados antes de ser utilizada como droga terapêutica.

Pela primeira vez é mostrado que uma proteína ligadora de bilinas de inseto – a lipocalina de *L. obliqua* – liga heme e participa do mecanismo de oxidação acoplada levando à formação de biliverdina γ , sugerindo uma nova atividade para essas proteínas em insetos. O manuscrito será em breve submetido para publicação.

8. Co-autoria em trabalhos publicados

Durante o doutorado participei parcialmente de outros projetos de pesquisa na linha de estudo de *Lonomia obliqua*. Os seguintes trabalhos foram publicados, e seguem anexados:

Bastos, L.C., Veiga, A.B.G., Guimarães, J.A. and Tonussi, C.R. (2004) Nociceptive and edematogenic response elicited by a crude bristle extract of *Lonomia obliqua* caterpillars. *Toxicon* 43, 273-278.

Neste trabalho colaborei na obtenção do veneno a ser utilizado, na análise dos resultados e na preparação do manuscrito.

Pinto, A.F.M., Dobrovolski, R., Veiga, A.B.G. and Guimarães, J.A. (2004) Lonofibrase, a novel a-fibrinogenase from *Lonomia obliqua* caterpillars. *Thrombosis Research* 113, 147-154.

No artigo do Sub-capítulo 3.1. desta tese (Veiga et al., 2003), a atividade fibrin(ogen)olítica foi descrita nas espículas de *L. obliqua*. No trabalho que segue, a mesma atividade foi purificada da criosecreção da lagarta.

Ana Beatriz Gorini da Veiga

Curriculum Vitae

Março, 2006

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Ana Beatriz Gorini da Veiga
Nascimento: 03/06/1976, Criciúma/SC - Brasil
Carteira de identidade: 2066402237 / SSP / RS / 22/05/1992
CPF: 89639243000

Endereço profissional:

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Centro de Biotecnologia, Laboratório de Bioquímica Farmacológica
Av. Bento Gonçalves, 9500/ Prédio 43431/ Laboratório 214
Agronomia 91501-970
Porto Alegre, RS - Brasil - Caixa Postal: 15005
Telefone: (51) 3316-6062 Fax: 3316-7309
E-mail: anabgv@cbiot.ufrgs.br

Endereço residencial:

Av. Érico Veríssimo, 441/ 615
Menino Deus 90160-181
Porto Alegre, RS - Brasil
Telefone celular: (51) 9714-2424
E-mail: anabgv@uol.com.br

2. FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

2001 - 2005 **Doutorado em Biologia Celular e Molecular**

Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil
Título: *Caracterização molecular dos componentes do veneno de Lonomia obliqua: genes expressos e princípios ativos envolvidos nos distúrbios da coagulação e da fibrinólise.*
Ano de obtenção: 2005
Orientador: Jorge Almeida Guimarães
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil

2000 - 2001 **Mestrado em Biologia Celular e Molecular**

Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil
Título: *Lonomia obliqua: estrutura secretora e propriedades funcionais do seu veneno sobre a coagulação e a fibrinólise.*
Ano de obtenção: 2002
Orientador: Jorge Almeida Guimarães
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil

1999 - 2000 **Graduação**

Bacharelado em Ciências Biológicas, ênfase em Biologia Celular, Molecular e Funcional
Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil

Título: *Relações morfo-funcionais das estruturas celulares e tegumentares associadas à produção e à liberação do veneno de Lonomia obliqua Walker, 1855 (Lepidoptera, Saturniidae).*

Orientador: Jorge Almeida Guimarães

Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPQ, Brasil.

1995 – 1999 Graduação

Licenciatura em Ciências Biológicas

Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil

3. ATUAÇÃO PROFISSIONAL

National Institutes of Health - NIH

2004 – 2005 Aluna de doutorado. Bolsa de Doutorado com Estágio no Exterior ("Bolsa Sanduiche") da CAPES. National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID), NIH.

Parte do projeto de doutorado. Construção de bibliotecas de cDNA, seqüenciamento em massa, análise das seqüências, clonagem de genes, expressão de proteínas em células procarióticas e células eucarióticas, genômica funcional, purificação de proteínas, ensaios de cinética enzimática.

2004 – 2004 Estágio temporário atuando como voluntária no National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID), NIH (agosto-setembro).

Colaboração realizando análise de seqüências utilizando ferramentas de Bioinformática.

2003 – 2003 Pesquisador-colaborador visitante.

Colaboração de 2 meses (agosto-outubro) aperfeiçoando técnicas de Biologia Molecular. Construção de bibliotecas de cDNA e seqüenciamento em massa; análise de proteínas.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

2001 - 2005 Aluna de Doutorado do Curso de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS. (Bolsa da CAPES).

2000 – 2001 Aluna de Mestrado do Curso de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS. (Bolsa da CAPES).

1999 – 2000 Bolsista de Iniciação Científica (CNPq) do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

1995 - 1996 Bolsista de Iniciação Científica (CNPq).

Atividades didáticas

2002 Disciplina: Biofísica Veterinária, Departamento de Biofísica, UFRGS. 6 horas de aulas teóricas e 8 horas de aulas práticas.

- 2002 Tutorial para alunos do Curso de Graduação em Ciências Biológicas da UFRGS junto à disciplina de Biologia Molecular Básica. Projeto “Ensino da Biologia Molecular Através de um Processo Formativo”, aprovado no PROIN da CAPES pelo DBMB e PPGBCM.
- 2000 Tutorial para alunos do Curso de Graduação em Ciências Biológicas da UFRGS junto à disciplina de Biologia Molecular Básica. Projeto “Ensino da Biologia Molecular Através de um Processo Formativo”, aprovado no PROIN da CAPES pelo DBMB e PPGBCM.
- 1998 16 horas/aula de Biologia para a 2ª série do Segundo Grau do Colégio de Aplicação da UFRGS, como requisito parcial da disciplina Prática de Ensino em Biologia do curso de Licenciatura em Ciências Biológicas.

Participação em projetos

1999 – 2005 Centro de Biotecnologia, Laboratório de Bioquímica Farmacológica.

1. Proteínas e peptídeos componentes de venenos e outros princípios ativos com ação sobre a hemostasia.

1998 Faculdade de Educação, Departamento de Ensino e Currículo.

1. Um olhar sobre a questão ambiental: práticas curriculares e não curriculares em algumas escolas de Porto Alegre.

1995 – 1997 Centro de Biotecnologia, Laboratorio Unindus.

1. Projeto "Identificação de antígenos de *Mycoplasma gallisepticum* importantes para a resposta celular em aves".
2. Projeto "Identificação e caracterização de sorotipos de *Salmonella* por PCR-RFLP".

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA

2004 – 2004 Estágio no Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia, Laboratório de Interação Planta-Praga.

Colaboração de 10 semanas aperfeiçoando técnicas de Biologia Molecular: clonagem e expressão de genes.

Fundação Universitária de Endocrinologia e Fertilidade - FUEFE

1998 – 1999 Estágio remunerado.

Área de semiologia, preparo e análise de sêmen humano para fins laboratoriais. Coleta, preparo e congelamento de biópsias testiculares para técnicas de reprodução assistida; cultivo de gametas humanos para técnicas de reprodução assistida.

Participação em projetos

1. Valor preditivo da morfologia espermática para FIV e ICSI.

2. Efeitos da proteína promotora da fertilização -FPP - em casos de oligoastenospermia humana.

Serviços técnicos especializados.

1. Análise laboratorial de sêmen humano.

Canyon Ferry Limnological Institute - CFLI (atual Montana Science Institute, MSI)

1997 – 1997 Estágio-residência de 6 meses.

Projeto de pesquisa *Omega-III Fatty Acids in Fish from the Canyon Ferry Reservoir*.
Ensino de Biologia para o Ensino Fundamental e Ensino Médio.
Participação em reuniões e seminários da área de Ciências.

4. ÁREAS DE ATUAÇÃO

- 1 Bioquímica e Biologia Molecular
- 2 Bases Moleculares da Hemostasia.
- 2 Princípios Ativos Com Ação na Hemostasia.
- 3 Sequenciamento de DNA e análise de seqüências
- 4 Transcriptoma e Proteoma, Estudo Molecular do Veneno da Lagarta *Lonomia obliqua*.
- 5 Ensino, Ensino de Ciências e Biologia.

5. IDIOMAS

Compreende: Espanhol (Bem), Francês (Razoavelmente), Inglês (Bem).
Fala: Espanhol (Razoavelmente), Francês (Razoavelmente), Inglês (Bem).
Lê: Espanhol (Bem), Francês (Pouco), Inglês (Bem).
Escreve: Espanhol (Razoavelmente), Francês (Pouco), Inglês (Bem).

6. PRÊMIOS E TÍTULOS

2005 XXI Prêmio Jovem Cientista (CNPq, Ministério da Ciência e Tecnologia, Fundação Roberto Marinho, Gerdau, Eletrobrás/Procel).

1999 Prêmio Jovem Pesquisador (XI Salão de Iniciação Científica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul).

1999 Destaque do XI Salão de Iniciação Científica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

1996 Menção Honrosa na Área de Sanidade, FACTA - Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas.

7. PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigos completos publicados em periódicos

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

PINTO, A.F.M.; DOBROVOLSKI, R.; **VEIGA, A.B.G.**; GUIMARÃES, J.A.. Lonofibrase, a novel a-fibrinogenase from *Lonomia obliqua* caterpillars. **Thrombosis Research**, Canada, v. 113, p. 147-154, 2004.

BASTOS, L.C.; **VEIGA, A.B.G.**; GUIMARÃES, J.A.; TONUSSI, C.R.. Nociceptive and edematogenic response elicited by a crude bristle extract of *Lonomia obliqua* caterpillars. **Toxicon**, v. 43, n. 3, p. 273-278, 2004.

VEIGA, A.B.G.; PINTO, A.F.M.; GUIMARÃES, J.A.. Fibrinogenolytic and procoagulant activities in the hemorrhagic syndrome caused by *Lonomia obliqua* caterpillars. **Thrombosis Research**, Canada, v. 111, p. 95-101, 2003.

VEIGA, A.B.G.; BLOCHTEIN, B.; GUIMARÃES, J.A.. Structures involved in production, secretion and injection of the venom produced by the caterpillar *Lonomia obliqua* (Lepidoptera, Saturniidae). **Toxicon**, v. 39, n. 9, p. 1343-1351, 2001.

BOSMIKICH, A.; **VEIGA, A.B.G.**; MATTOS, A.L.G.; FERRARI, A.N.. Influência da morfologia espermática avaliada pelo critério estrito nos resultados de FIV/ICSI. **Reprodução e Climatério**, v. 15, n. 3, p. 170-174, 2000.

VEIGA, A.B.G.; RIBEIRO, J.M.C.; FRANCISCHETTI, I. M.B.; GUIMARÃES, J.A.; ANDERSEN, J.F. *In situ* conversion of heme to biliverdin IX γ by an insect bilin-binding protein. Manuscrito submetido para publicação no *The Journal of Biological Chemistry* (02/02/2006).

Artigos resumidos publicados em periódicos

LUNGE, V.R.; **VEIGA, A.B.G.**; IKUTA, N.; FONSECA, A.A.S.K.; MARQUES, E.K.. *Salmonella* species and serovars characterization by PCR-RFLP of the invA gene. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 19, p. 379-379, 1996.

Resumos simples em anais de eventos

VEIGA, A.B.G.; RIBEIRO, J.M.C.; GUIMARÃES, J.A.; FRANCISCHETTI, I.M.B.. 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. In: Graduate Student Research Symposium - The Faces of Tomorrow's Science, 2005, Bethesda, Maryland. **Second Annual Graduate Student Research Symposium -The Faces of Tomorrow's Science**. Bethesda: Graduate Partnership Program -National Institutes of Health, 2005. p. 21-21.

VEIGA, A.B.G.; PASQUALI, G.; GUIMARÃES, J.A.. Analysis of ESTs from a cDNA library of *Lonomia obliqua* caterpillars. In: V Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS, 2003, Porto Alegre. **Livro de Resumos da V Reunião Anual do PPGBCM**. 2003. v. Único, p. 69.

DOBROVOLSKI, R.; PINTO, A.F.M.; **VEIGA, A.B.G.**; GUIMARÃES, J.A.. Anti-hemostatic activities

of *Lonomia obliqua*: procoagulant and phospholipase A2 activities. In: XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq, 2003, Caxambu. **Livro de Programa e Resumos da XXXII Reunião Anual da SBBq**. 2003. v. único, p. 6-6.

VEIGA, A.B.G.; PASQUALI, G.; GUIMARÃES, J.A.. Analysis of ESTs from a cDNA library of *Lonomia obliqua* caterpillars. In: XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq, 2003, Caxambu. **Livro de Programa e Resumos da XXXII Reunião Anual da SBBq**. 2003. v. único, p. 31-31.

PINTO, A.F.M.; **VEIGA, A.B.G.**; DOBROVOLSKI, R.; GUIMARÃES, J.A.. Lonofibrase, a new α -fibrinogenase isolated from *Lonomia obliqua*. In: XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq, 2003, Caxambu. **Livro de Programa e Resumos da XXXII Reunião Anual da SBBq**. 2003. v. único, p. 149-149.

ASSAFIM, M.; FRATANE, F.S.; DOBROVOLSKI, R.; PINTO, A.F.M.; **VEIGA, A.B.G.**; GUIMARÃES, J.A.; ZINGALI, R.. The use of thrombosis experimental model for the study of crude venom, caterpillar secretions and synthetic drugs. In: XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq, 2003, Caxambu. **Livro de Programa e Resumos da XXXII Reunião Anual da SBBq**. 2003. v. único, p. 254-254.

VEIGA, A.B.G.; PASQUALI, G.; GUIMARÃES, J.A.. Expressed sequence tags from a cDNA library of *Lonomia obliqua*. In: XVIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FESBE, 2003, Curitiba. 2003.

SILVA, K.R.L.M.; **VEIGA, A.B.G.**; PINTO, A.F.M.; GUIMARÃES, J.A.. Caracterização diferencial de proteínas do veneno de *Lonomia obliqua*. In: XVIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FESBE, 2003, Curitiba. 2003.

PINTO, A.F.M.; DOBROVOLSKI, R.; **VEIGA, A.B.G.**; GUIMARÃES, J.A.. Lonofibrase, a new α -fibrinogenase isolated from *Lonomia obliqua*. In: XVIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FESBE, 2003, Curitiba. 2003.

VEIGA, A.B.G.; PINTO, A.F.M.; DOBROVOLSKI, R.; GUIMARÃES, J.A.. Effects of *Lonomia obliqua* venomous secretions upon blood coagulation and fibrinolysis. In: Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FESBE, 2002, Salvador. 2002.

PINTO, A.F.M.; DOBROVOLSKI, R.; **VEIGA, A.B.G.**; GUIMARÃES, J.A.. Characterization of fibrin(ogen)olytic activities present in a *Lonomia obliqua* secretion. In: XVII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FESBE, 2002, Salvador. 2002.

DOBROVOLSKI, R.; PINTO, A.F.M.; **VEIGA, A.B.G.**; GUIMARÃES, J.A.. Comparative study of anti-hemostatic activities from different materials of *Lonomia obliqua*. In: XXXI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq, 2002, Caxambu. **Livro de Programa e Resumos da XXXI Reunião Anual da SBBq**. 2002. v. único, p. 121-121.

PINTO, A.F.M.; DOBROVOLSKI, R.; **VEIGA, A.B.G.**; GUIMARÃES, J.A.. Purification and characterization of a fibrin(ogen)olytic activity from *Lonomia obliqua* caterpillars. In: XXXI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq, 2002, Caxambu. **Livro de Programa e Resumos da XXXI Reunião Anual da SBBq**. 2002. v. único, p. 122-122.

VEIGA, A.B.G.; PINTO, A.F.M.; DOBROVOLSKI, R.; GUIMARÃES, J.A.. Fibrin(ogen)olytic activity of four materials from *Lonomia obliqua*. In: XXXI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq, 2002, Caxambu. **Livro de Programa e Resumos da XXXI Reunião Anual da SBBq**. 2002. v. único, p. 122-122.

DOBROVOLSKI, R.; PINTO, A.F.M.; **VEIGA, A.B.G.**; GUIMARÃES, J.A.. O veneno da taturana *Lonomia obliqua* e a hemostasia. In: XIV Salão de Iniciação Científica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2002, Porto Alegre. **Livro de Resumos do XIV Salão de Iniciação Científica e XI Feira de Iniciação Científica da UFRGS**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2002. v. único, p. 425-425.

VEIGA, A.B.G.; PINTO, A.F.M.; DOBROVOLSKI, R.; GUIMARÃES, J.A.. Phospholipase A2, procoagulant and fibrinolytic activities from *Lonomia obliqua* venom. In: IV Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS, 2002, Porto Alegre. **Livro de Resumos da IV Reunião Anual do PPGBCM**. 2002. v. Único, p. 85.

DOBROVOLSKI, R.; PINTO, A.F.M.; **VEIGA, A.B.G.**; GUIMARÃES, J.A.. Estudo comparativo de atividades anti-hemostáticas de diferentes extratos de *Lonomia obliqua*. In: XIII Salão de Iniciação Científica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2002, Porto Alegre. **Livro de Resumos do XIII Salão de Iniciação Científica e X Feira de Iniciação Científica da UFRGS**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2002. v. único, p. 353-353.

VEIGA, A.B.G.; PINTO, A.F.M.; DOBROVOLSKI, R.; GUIMARÃES, J.A.. Phospholipase A2, procoagulant and fibrinolytic activities from *Lonomia obliqua* venom. In: VII Simpósio da Sociedade Brasileira de Toxinologia, 2002, Pirenópolis. **Livro de programa e resumos da VII SBTx -Vencendo as fronteiras da biodiversidade molecular**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Toxinologia, 2002. v. Único, p. 311-311.

VEIGA, A.B.G.; BLOCHTEIN, B.; GUIMARÃES, J.A.. Ultrastructure and histology of the elements involved in production and injection of *Lonomia obliqua* venomous secretions. In: XI Congresso Brasileiro de Biologia Celular, 2002, Porto Alegre. **Anais do XI Congresso Brasileiro de Biologia Celular**. 2002. v. único, p. 60-60.

VEIGA, A.B.G.; PINTO, A.F.M.; BLOCHTEIN, B.; SCHRANK, A.; GUIMARÃES, J.A.. Biochemical and molecular characterization of the secretory epithelium involved in venom production in *Lonomia obliqua* caterpillar. In: 3ª Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS, 2001, Porto Alegre. **Livro de Resumos da 3ª Reunião Anual do PPGBCM**. 2001. v. Único, p. 84.

VEIGA, A.B.G.; PINTO, A.F.M.; BLOCHTEIN, B.; SCHRANK, A.; GUIMARÃES, J.A.. Biochemical and molecular characterization of the secretory epithelium involved in venom production in *Lonomia obliqua* caterpillar. In: XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq, 2001, Caxambu. **Livro de Programa e Resumos da XXX Reunião Anual da SBBq**. 2001. v. único, p. 30-30.

PINTO, A.F.M.; **VEIGA, A.B.G.**; GUIMARÃES, J.A.. Fibrinogenolytic activity from *Lonomia obliqua* caterpillars secretions. In: XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq, 2001, Caxambu. **Livro de Programa e Resumos da XXX Reunião Anual da SBBq**. 2001. v. único, p. 129-129.

VEIGA, A.B.G.; GUIMARÃES, J.A.. Cloning and expression of the genes coding for the protein principles, acting on the haemostatic process, produced by *Lonomia obliqua* caterpillars. In: II Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS, 2000, Porto Alegre. **Livro de Resumos da II Reunião Anual do PPGBCM**. 2000. v. Único, p. 62.

VEIGA, A.B.G.; BLOCHTEIN, B.; GUIMARÃES, J.A.. Histologia e Ultraestrutura do Tegumento da Taturana *Lonomia obliqua*. In: 52ª Reunião Anual da SBPC -7ª Jornada Nacional de Iniciação Científica, 2000, Brasília. **Anais da 52ª Reunião Anual da SBPC**. 2000. v. único.

VEIGA, A.B.G.; BOSMIKICH, A.; MATTOS, A.L.G.; FERRARI, A.N. Influence of sperm strict morphology analysis on IVF/ICSI. In: 16th Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction and Embriology, 2000, Bologna. **Human Reproduction**. Oxford University Press, 2000. v. 15, p. 218.

VEIGA, A.B.G.; BLOCHTEIN, B.; GUIMARÃES, J.A.. Morphological description of the structures involved in production and injection of *Lonomia obliqua* caterpillar venom. In: VI Simpósio da Sociedade Brasileira de Toxinologia, 2000, São Pedro. **Livro de Programa e Resumos do VI Simpósio da SBTx-Contribuições da Toxinologia Para o Desenvolvimento das Ciências Biomédicas..** São Paulo: Sociedade Brasileira de Toxinologia, 2000. v. Único, p. 141-141.

PINTO, A.F.M.; VEIGA, A.B.G.; BLOCHTEIN, B.; GUIMARÃES, J.A.. Proteases from different secretions are involved on the paradoxial (pro-coagulant and hemorrhagic) envenomation caused by *Lonomia obliqua* caterpillars. In: XIIIth World Congress of the International Society on Toxinology (IST), 2000, Paris. **IST -Toxins from animals, plants and microbes (Toxines d'origine animale, vegetale et microbienne)..** 2000. v. único, p. P178.

VEIGA, A.B.G.; BLOCHTEIN, B.; GUIMARÃES, J.A.. Histologia e Ultraestrutura do Tegumento da Taturana *Lonomia obliqua*. In: XI Salão de Iniciação Científica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1999, Porto Alegre. **Livro de Resumos do XI Salão de Iniciação Científica e VIII Feira de Iniciação Científica.** Porto Alegre: UFRGS, 1999. v. Único, p. 211-211.

LUNGE, V.R.; IKUTA, N.; FONSECA, A.A.S.K.; IRINO, K.; VEIGA, A.B.G.; MARQUES, E.K.. Desenvolvimento de testes para detecção molecular e diferenciação de sorotipos de *Salmonella* para controle de plantéis e de alimentos de origem animal. In: Conferência APINCO 1996 de Ciência e Tecnologia Avícolas, 1996, Curitiba. **Anais Conferência APINCO (FACTA-Trabalhos de Pesquisa).** Curitiba: FACTA, 1996. v. Único, p. 91 (anexo 10.3.29 e anexo do item 9.3).

LUNGE, V.R.; VEIGA, A.B.G.; IKUTA, N.; FONSECA, A.S.; MARQUES, E.K.. *Salmonella* species and serovars characterization by PCR-RFLP of the invA gene. In: 42º Congresso Nacional de Genética, 1996, Caxambu. **Revista Brasileira de Genética (Brazilian Journal of Genetics).** Sociedade Brasileira de Genética, 1996. v. 19 (3), p. 379 (anexo do item 10.2).

8. TRADUÇÃO DE LIVROS

VOET, D., VOET, J., 2005 (a ser publicado). **Biochemistry**. Porto Alegre: Artes Médicas (**tradução do capítulo 6**).

ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P., 2004. **Biologia Molecular da Célula**. Porto Alegre: Artes Médicas (**tradução do índice remissivo**).

KREUZER, H., MASSEY, A., 2002. **Engenharia Genética e Biotecnologia**. Porto Alegre: Artes Médicas (**tradução do capítulo 3**).

PURVES, W.K., SADAVA, D., ORIAN, G.H., HELLER, H.C., 2002. **Vida – A Ciência da Biologia**. Porto Alegre: Artes Médicas (**tradução dos capítulos 26-33**).

9. SEMINÁRIOS MINISTRADOS

Princípios ativos do veneno da lagarta *Lonomia obliqua* que interferem na coagulação sanguínea e na fibrinólise: análise bioquímica e molecular. Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), 22 de fevereiro de 2006.

Análise molecular dos componentes do veneno da taturana *Lonomia obliqua*: identificação de princípios ativos envolvidos na síndrome hemorrágica. Seminário do Departamento de Bioquímica da UFRGS, 30 de novembro de 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. Malaria and Vector Biology Interest Group Seminar, Laboratory of Malaria and Vector Research, National Institute of Infectious Diseases, National Institutes of Health, Estados Unidos. 6 de maio de 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. Second Annual Graduate Student Research Symposium – The Faces of Tomorrow's Science, National Institutes of Health, Bethesda, MD, Estados Unidos. 22 de abril de 2005.

Proteoma e transcriptoma de *Lonomia obliqua* – genes que codificam para princípios anti-hemostáticos do veneno. Seminário de Dados do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS, 2 de março de 2004.

Analysis of ESTs from a cDNA library of *Lonomia obliqua* caterpillars. XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq, Caxambu, MG, Brasil, maio de 2003.

Fosfolipases. Seminário ministrado na Disciplina de Biofísica Veterinária, Departamento de Biofísica, UFRGS. 2002 (anexo do item 4.2.5.1)

***Lonomia obliqua*: estrutura funcional, princípios ativos e banco de cDNA.** Seminário de Dados do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS, 21 de agosto de 2001.

10. DADOS COMPLEMENTARES

Aprovação em Concurso Público: Concurso Público de Títulos e Provas para Professor Adjunto, Nível I, com Titulação de Doutor, na Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre, área de conhecimento de Biologia Molecular. 2006.

VEIGA, A.B.G.; RIBEIRO, J.M.C.; GUIMARÃES, J.A.; FRANCISCHETTI, I.M.B. 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. Trabalho apresentado (itens 10.3.1 e 11.2) comentado e descrito no *The NIH Catalyst*, 2005. In: ASHOK, A.. Graduate Students at NIH: The Faces of Tomorrow's Science. *The NIH Catalyst*, NIH, Bethesda, EUA, v. 13, p. 5-5 (May-June 2005).

Membro da Comissão Julgadora do 49th Montgomery Area Science Fair – Science Montgomery, Gaithersburg, MD, Estados Unidos, 12 de março de 2005.

Membro da Comissão Organizadora do 45th Symposium of the International Association for Vegetation Science (IAVS), UFRGS, Porto Alegre, 3-8 de março de 2002.

Curso organizado e ministrado: Teia Temática Venenos Animais e Hemostasia. I Bioencontro Internacional e II Bioencontro Regional, Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), Campus Cachoeira do Sul, RS, 20 de outubro de 2001.

Membro da Comissão Organizadora do XII Salão de Iniciação Científica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 11-15 de setembro de 2000.

Representante discente do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM) do Centro de Biotecnologia da UFRGS.

Membro instituidora da Fundação Cbiot, Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia, UFRGS.

Colaboradora e Monitora do XXI Congresso Brasileiro de Zoologia. Porto Alegre, RS, 5 a 9 de fevereiro de 1996.