ALESSANDRA VELOSO DE MELO

**IDENTIFICAÇÃO DE PROTEASE(S) ENDÓGENA(S) DE ERITRÓCITOS
HUMANOS, ATIVADA(S) POR ESFINGOMIELINASES D DE VENENOS
DE ARANHAS *Loxosceles*, ENVOLVIDAS NO FENÔMENO DE
HEMÓLISE DEPENDENTE DE COMPLEMENTO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós
Graduação do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo
para obtenção do Título de Mestre em
Imunologia.

Área de concentração: Imunologia

Orientadora: Profª. Dra. Denise V. Tambourgi

São Paulo

2010

RESUMO

MELO, A. V. **Identificação de protease(s) endógena(s) de eritrócitos humanos, ativada(s) por esfingomielinases D de venenos de aranhas *Loxosceles*, envolvidas no fenômeno de hemólise dependente de complemento.** 2010. 96 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

A hemólise intravascular, decorrente do envenenamento por aranhas *Loxosceles*, é dependente da ação da esfingomielinase D (SMase D), que se liga à membrana dos eritrócitos e ativa protease(s) responsáveis pela remoção de porções das moléculas de glicoforina ricas em ácido siálico, tornando as células sensíveis à ação lítica do Sistema Complemento autólogo. O presente estudo teve por objetivo identificar a natureza das possíveis proteases de membranas envolvidas neste processo. A SMase D P2 recombinante de *L. intermedia* foi expressa, purificada e apresentou suas funções biológicas ativas, sendo capaz de induzir hemólise dependente de complemento autólogo, de forma dose dependente, e de hidrolisar esfingomielina. O tratamento das células com a SMase D P2 induziu a clivagem glicoforinas A e C, mas não alterou a expressão de marcadores como Kell, CD59, DAF e CR1. Porém, promoveu a deposição de C1q, C3, C4, C5b-9, fator B e properdina. A hemólise dependente de complemento, induzida pela SMase D, foi reduzida pelo pré-tratamento das células com inibidores de metaloproteinases, galardina, bestatina e fenantrolina, mas não por PMSF, inibidor de serinoproteinase, e simvastatina, inibidor de elastase e de MMP-9. A atividade proteolítica das membranas de eritrócitos foi explorada pelo uso de substratos de fluorescência apagada. As preparações de membranas possuem atividade basal diante dos peptídeos utilizados. Porém, o tratamento com a SMase D P2 aumentou a atividade proteolítica das membranas, em relação ao controle, somente frente ao substrato Abz-FRSSR-EDDnp. A pré-incubação com PMSF, simvastatina e fenantrolina preveniu este aumento. Em suma, os resultados obtidos sugerem que as SMases D de *L. intermedia* ativam proteases na membrana de eritrócitos envolvidas na transformação dos eritrócitos humanos em células ativadoras de complemento autólogo e que são sensíveis à ação de inibidores de metaloproteinases e outras, sensíveis a inibidores de serinoproteinases, que parecem não estar diretamente envolvidas no fenômeno de hemólise, mas cujo papel biológico precisa ser esclarecido.

Palavras-chave: Aranhas *Loxosceles*. Esfingomielinases D. Glicoforinas. Sistema Complemento. Hemólise Intravascular. Proteases Endógenas.

ABSTRACT

MELO, A. V. **Identification of human erythrocyte endogenous protease(s), triggered by sphingomyelinase D from *Loxosceles* spiders venom, involved in the phenomenon of complement-dependent hemolysis.** 96 f. Master thesis - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Intravascular hemolysis caused by poisoning by spiders *Loxosceles*, is dependent on the sphingomyelinase D (SMase D) action, a toxin that binds to the erythrocyte membrane, promoting the and activates protease(s) responsible for removal of the enriched sialic acid portions from glycoporphins molecules, rendering the cells sensitive to the lytic action of the autologous complement system.. This study aimed to identify possible membrane proteases involved in this process. The toxin was expressed, purified and showed to be functionally active, being able to render erythrocytes susceptible to the autologous complement-dependent lysis, in a dose dependent manner, and to hydrolyze sphingomyelin.. Treatment of human erythrocytes with the toxin caused the removal of the membrane glycoporphins, but did not act on Kell, CD59, DAF and CR1 and induced deposition of C1q, C3, C4, C5b-9, factor B and properdin. Complement-dependent hemolysis, induced by the toxin, was prevented by pretreatment with inhibitors of metalloproteinases, galardin, phenanthroline and bestatin, but not with PMSF, a serine proteinase inhibitor, and simvastatin, an inhibitor of elastase and MMP-9. The proteolytic activity of erythrocyte membranes was explored by using fluorescent substrates. In these assays, it was found that the membrane preparations have basal activity upon the peptides used. However, after treatment with SMase D, the proteolytic activity of the membranes was higher than the control using the substrate Abz-FRSSR-EDDnp. The pre-incubation with PMSF, simvastatin and, to a lesser degree, with phenanthroline, prevented the increase of this activity. In conclusion, the results suggest that SMase D from *L. intermedia* spider venom is capable of activating proteases in red blood cells membrane involved in the transformation of human erythrocytes in autologous cell complement activator and which are sensitive to the action of metalloproteinases inhibitors, and others, sensitive to serine proteinases inhibitors, which appear not to be directly involved in the phenomenon of hemolysis and whose biological role has yet to be clarified.

Keywords: *Loxosceles* spiders. Sphingomyelinase D. Glycoporphins. Complement System. Intravascular hemolysis. Endogenous proteases.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aranhas *Loxosceles* sp

1.1.1 Biologia

As aranhas pertencem à ordem Araneae, uma das maiores da classe Arachnida contendo aproximadamente 41.250 espécies, distribuídas em cerca de 110 famílias e 3.750 gêneros (PLATNICK, 2009). O gênero *Loxosceles* Heineken & Lowe, 1832 (Figura 1), contido na família Sicariidae, reúne aranhas de pequenas dimensões, com comprimento corporal de 1 a 5 cm, pernas relativamente finas e alongadas e seis olhos dispostos em um padrão característico de três díades em formato de U. Tais díades são uma característica que facilita a identificação do gênero, uma vez que se opõem ao padrão comum de oito olhos, encontrado na maioria das aranhas (MÁLAQUE et al., 2002). Conhecidas popularmente como aranhas-marrom, alguns espécimes podem apresentar um formato de violino no dorso de seu cefalotórax. Entretanto, por não ser uma característica comum a todos os indivíduos, o reconhecimento do gênero não deve ser baseado somente na presença desse formato, a fim de se evitar possíveis enganos (SWANSON; VETTER, 2006).

Figura 1. Aranha-marrom *Loxosceles intermedia*.

Fonte: Adaptado de da Silva et al., 2004.

Estas aranhas possuem hábito predatório noturno e são não-cursoriais, preferindo habitar lugares secos, escuros e tranquilos, como cascas de árvores, cavernas e sob paus e pedras. Adaptam-se muito bem às condições domiciliares, alojando-se atrás de quadros, móveis, cantos de cômodos, além de roupas e sapatos, sempre ao abrigo da luz direta (FISCHER, 1996; LUCAS, 1988; RIBEIRO et al., 1993). Fischer et al. (2005) relataram que as espécies *Loxosceles intermedia* e *Loxosceles laeta* são ausentes em ambientes naturais, mas predominam em ambientes caseiros, tendo preferência por substratos como madeira, papel e material de construção.

1.1.2 Distribuição e Epidemiologia

A distribuição geográfica desse gênero é bastante ampla, compreendendo a África, Américas do Norte e do Sul, e algumas partes da Ásia e Europa (FUTRELL, 1992; MARTINS et al., 2002; GERSTSCH, 1967). No Brasil, atualmente são dez espécies descritas: *L. adelaida*, *L. amazonica*, *L. anomala*, *L. gaucho*, *L. hirsuta*, *L. immodesta*, *L. intermedia*, *L. laeta*, *L. puortoi* e *L. similis* (PLATNICK, 2009). A maioria destas, por predominar no ambiente silvestre, não tem sido avaliada quanto ao risco à saúde humana. Entretanto, as espécies *L. gaucho* Gerstsch, 1967, *L. intermedia* Mello-Leitão, 1934 e *L. laeta* Nicolet, 1849, presentes no ambiente antrópico, são os agentes responsáveis pela maioria dos acidentes causados pelo gênero (WASSERMAN; ANDERSON, 1983-1984).

A Organização Mundial da Saúde considera aranhas pertencentes aos gêneros *Loxosceles* sp, *Latrodectus* sp e *Phoneutria* sp clinicamente importantes. Os acidentes causados por picadas de aranhas venenosas são notificados ao Ministério da Saúde e registrados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN). Entretanto, somente a partir de 2006 os casos de acidentes estão mais bem contabilizados. Segundo os dados do SINAN exibidos no Tabela 1, dos 43.886 acidentes provocados por picada de aranhas venenosas no país desde 2006, 17.356 foram atribuídos ao gênero *Loxosceles*, correspondendo a 40% dos acidentes araneídicos.

Quadro 1 – Notificações de acidentes causados por animais peçonhentos registradas no sistema de informação de agravos de notificação (SINAN Net) entre 2006 e 2008

UF Notificação	Ign/Branco	<i>Phoneutria</i>	<i>Loxosceles</i>	<i>Latrodectus</i>	Outra espécie	Total
Rondônia	43	19	11	0	14	87
Acre	18	6	5	2	10	41
Amazonas	72	9	20	4	36	141
Roraima	12	2	2	0	6	22
Pará	262	49	66	12	70	459
Amapá	13	0	2	0	2	17
Tocantins	27	4	6	0	15	52
Maranhão	29	3	21	0	22	75
Piauí	33	3	7	2	14	59
Ceará	57	8	16	2	24	107
Rio Grande do Norte	84	6	10	2	38	140
Paraíba	59	4	6	2	5	76
Pernambuco	89	8	16	13	14	140
Alagoas	47	3	6	17	12	85
Sergipe	65	1	4	0	8	78
Bahia	251	26	49	27	59	412
Minas Gerais	1.811	541	499	30	588	3.469
Espírito Santo	258	103	43	6	135	545
Rio de Janeiro	215	49	72	2	36	374
São Paulo	2.333	1.045	460	25	669	4.532
Paraná	2.928	1.981	11.882	12	2.926	19.729
Santa Catarina	2.758	1.497	3.228	32	1.856	9.371
Rio Grande do Sul	1.573	440	843	9	462	3.327
Mato Grosso do Sul	53	7	7	3	7	77
Mato Grosso	102	17	22	2	39	182
Goiás	155	19	48	3	25	250
Distrito Federal	32	1	5	0	1	39
Total	13.379	5.851	17.356	207	7.093	43.886

FONTE: Ministério da Saúde, 2009.

Os estados de Santa Catarina e Paraná, onde a espécie *L. intermedia* é predominante (GONÇALVES-DE-ANDRADE et al., 2001, MARQUES-DA-SILVA; FISCHER, 2005), notificaram ao SINAN cerca de 92% dos casos de loxoscelismo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). Tal importância do loxoscelismo nos estados do Sul já havia sido descrita por Ribeiro et al. (1993), Sezerino et al. (1998), Málaque et al. (2002), Cristiano et al. (2009) e Marques-da-Silva e Fischer (2009), que também relataram uma maior incidência de acidentes nos meses mais quentes do ano – Dezembro a Maio, período no qual as aranhas aumentam sua atividade.

Apesar dessas aranhas não apresentarem comportamento agressivo, o maior contato com o ser humano, em razão da destruição de seu habitat natural, tem facilitado a ocorrência de acidentes domésticos. As picadas geralmente são defensivas, sendo que em 60% dos casos os acidentes acontecem devido à compressão do animal contra o corpo da vítima enquanto esta dorme ou se veste. Estudos realizados com os acidentados indicaram que as regiões do abdômen, glúteos e parte interna das coxas são onde se desenvolvem as piores lesões e cicatrizes. Dessa forma, cuidados com calçados e vestimentas são imprescindíveis na prevenção de tais incidentes (MÁLAQUE et al., 2002).

1.1.3 Veneno e Esfingomielinases D

O envenenamento causado pelas aranhas-marrom promove reações locais e sistêmicas importantes, embora uma aranha adulta seja capaz de inocular apenas alguns microlitros de veneno ao picar sua vítima (DE ROODT et al., 2002; KURPIEWSKI et al., 1981), contendo não mais que 30 µg de toxina (TAMBOURGI et al., 2000).

O estudo da composição do veneno de aranhas *Loxosceles* revelou a presença de collagenases, esfingomielinases D (SMases D), fosfatase-alcálicas, fosfolipases, hialuronidases, metaloproteinases, peptidases e 5'-ribonucleotidase (DA SILVEIRA et al., 2002; FEITOSA et al., 1998; FORRESTER et al., 1978; FUTRELL, 1992; REES et al., 1985). As enzimas fosfatase-alcálica, 5'-ribonucleotidase, fosfolipase e hialuronidase não possuem a capacidade de desenvolver a lesão típica causada pela picada, embora a hialuronidase facilite o espalhamento gravitacional da toxina através do tecido (WRIGHT, 1973).

Apesar da variedade de elementos e das diversas atividades enzimáticas descritas para esse veneno, a esfingomielinase D é o componente responsável pelos sintomas observados no

quadro de envenenamento. Forrester et al. (1978) demonstraram que o veneno de *Loxosceles reclusa* Gertsch & Mulaik, 1940 possui uma esfingomielinase D capaz de hidrolisar um lipídio de membrana, a esfingomielina, gerando colina e ceramida 1-fosfato. A enzima purificada apresentou massa molecular de 32 kDa e foi identificada como uma dermonecrotóxina capaz de induzir lesão tecidual quando injetada em modelos experimentais, além de induzir agregação plaquetária (KURPIEWSKI et al., 1981).

Tambourgi et al. (1995) demonstraram que os venenos de *L. gaucho*, *L. intermedia* e *L. laeta* contêm elementos que preparam os eritrócitos humanos para a lise mediada pelo sistema complemento autólogo. A caracterização bioquímica do veneno de *L. intermedia* revelou a presença de uma fração com proteínas com massa molecular de 35 kDa, denominada F35, capaz de tornar os eritrócitos susceptíveis à lise pela via alternativa do sistema complemento com a utilização de soro autólogo. Esta fração também foi capaz de induzir reação dermonecrótica característica, com edema e eritema no local da injeção, e de causar morte em modelo murino (TAMBOURGI et al., 1995, 1998a,b), além de promover um quadro semelhante ao quadro endotóxico, com a produção de altos níveis de Fator de Necrose Tumoral α (TNF- α) e óxido nítrico (TAMBOURGI et al., 1998a).

A fração F35 foi submetida à cromatografia de fase reversa, revelando três picos contíguos denominados P1, P2 e P3, de acordo com a sequência de eluição. As toxinas P1 e P2 mostraram ter atividade esfingomielinásica e foram capazes de induzir lise de eritrócitos humanos, dependente da ação de proteínas do complemento, e dermonecrose em coelhos. Por outro lado, a isoforma P3 foi completamente inativa para os mesmos experimentos. Portanto, P1 e P2 foram descritas como as toxinas responsáveis pelos efeitos locais e sistêmicos causados pelo envenenamento por *L. intermedia*. As atividades biológicas descritas para P1 e P2 podem ser inibidas pela adição de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), sugerindo a dependência de íons para sua ação (TAMBOURGI et al., 1998b).

Em 2004, Tambourgi et al. clonaram as esfingomielinases P1 e P2 a partir do RNA mensageiro (RNA-m) extraído das glândulas de veneno de *L. intermedia* e as proteínas recombinantes expressas foram capazes de reproduzir todas as propriedades biológicas descritas para o veneno total e para as toxinas nativas P1 e P2.

1.1.4 Loxoscelismo

O quadro clínico causado pelo envenenamento pela picada de aranhas do gênero

Loxosceles é denominado loxoscelismo. Ele se manifesta de duas formas bem definidas – cutânea e sistêmica, e pode ser influenciado tanto por variações intra- e interespecíficas dos venenos, associadas à espécie (BÁRBARO et al., 1996; DE OLIVEIRA et al., 2005; PRETEL et al., 2005; TAMBOURGI et al., 1995), ao estágio do desenvolvimento (GONÇALVES-DE-ANDRADE et al., 1999), ao sexo (DE OLIVEIRA et al., 1999, 2005), a quantidade de veneno injetada (BERNSTEIN; EHRLICH, 1986) e à região da picada (FUTRELL, 1992), quanto por características do próprio paciente, como a idade e constituição genética (BARRETO et al., 1990; NANCE, 1961; TAMBOURGI et al., 1998a).

1.1.4.1 Loxoscelismo Cutâneo

O loxoscelismo cutâneo é a forma mais comumente descrita em acidentes por aranhas do gênero *Loxosceles*, sendo verificada em 83% dos casos (SCHENONE, 2003). Como a picada é pouco dolorosa e a lesão dermonecrótica é de progressão lenta, somente 10% dos acidentados procuram atendimento médico nas primeiras 12 horas após a picada. Nas 6 horas iniciais surgem edema e eritema no local, que podem ser interpretados como uma reação alérgica. Depois de 24 horas a lesão evolui com áreas equimóticas mescladas com palidez, denominada placa marmórea, podendo sofrer espraçamento e intensificação da dor local. Geralmente, após esse período, o acidentado se queixa de sensação de queimação no local, febre alta, prurido generalizado, mialgia, vômito, visão turva e diarreia, justificando a variação do tempo médio de procura por atendimento médico entre 12 e 48 horas após a picada (CARDOSO et al., 2003; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1998). Entre 5 e 7 dias a lesão se delimita, formando uma crosta necrótica seca que se desprende em até 3 semanas, deixando uma úlcera local que se cura entre 6 e 8 semanas.

Alterações histopatológicas incluem espessamento do endotélio dos vasos sanguíneos, infiltração de leucócitos polimorfonucleares, coagulação intravascular, vasodilatação, hemorragia e acumulação de neutrófilos ao redor dos vasos sanguíneos. (FUTRELL, 1992). Estudos do envolvimento do sistema complemento no recrutamento dos leucócitos polimorfonucleares (PMN) revelaram que a depleção dos leucócitos circulantes promove inibição da necrose em coelhos inoculados com veneno de *L. reclusa* (SMITH; MICKS, 1970) e resulta na prevenção do dano vascular que seria induzido pelo veneno de *L. reclusa*, injetado em camundongos (SUNDERKÖTTER et al., 2001). Além disso, Tambourgi et al. (2005) relataram a participação do complemento pelo recrutamento de neutrófilos, dependente

da geração da anafilotoxina C5a, e pela formação do Complexo de Ataque à Membrana (MAC). Experimentos de depleção do complemento mostraram significativa redução na infiltração de neutrófilos, embora não tenha evitado hemorragia nem a dissociação das fibras colágenas. No entanto, foi demonstrado que a expressão de metaloproteinases de matriz extracelular, induzidas pelas esfingomielinases D do veneno, é um dos principais fatores relacionados à patogênese do loxoscelismo cutâneo (PAIXÃO-CAVALCANTE et al., 2006, 2007; TAMBOURGI et al., 2005).

1.1.4.2 Loxoscelismo sistêmico

O loxoscelismo sistêmico é menos observado que o cutâneo, ocorrendo em até 16% dos casos. Apesar disso, corresponde à forma mais grave de loxoscelismo, caracterizando-se por distúrbios hematológicos como hemólise intravascular, responsável por anemia hemolítica, icterícia e hemoglobinúria. As vítimas podem evoluir com coagulação intravascular disseminada e insuficiência renal aguda sendo, esta última, a principal causa de óbito no loxoscelismo (DA SILVA et al., 2004; FUTRELL, 1992; MÁLAQUE, 2002; SEZERINO, 1998).

A hemólise intravascular é um dos sintomas mais severos do loxoscelismo sistêmico. Futrell et al. (1979) demonstraram que eritrócitos humanos incubados com o veneno de *L. reclusa* eram lisados por soro humano fresco. No entanto, eritrócitos não tratados com o veneno não sofriam lise, sugerindo uma possível participação do sistema complemento na hemólise induzida por veneno.

A participação do sistema complemento foi analisada utilizando-se hemácias humanas tratadas com veneno de *L. intermedia* e suas esfingomielinases, P1 e P2. A lise causada pelas SMases D era dependente da ativação da via alternativa do complemento autólogo sobre a superfície dos eritrócitos (TAMBOURGI et al., 1995, 1998b, 2000). Entretanto, foi verificado que a falha na regulação deste sistema não era devida à clivagem de moléculas reguladoras do sistema complemento, como Fator de Aceleração de Decaimento (DAF), Receptor tipo-1 do Complemento (CR1) e CD59, mas sim à remoção das porções extracelulares ricas em ácido siálico das moléculas de glicoforina após o tratamento com as esfingomielinases. No entanto, a remoção não estava diretamente associada à ação das SMases D sobre tais moléculas, uma vez que glicoforinas purificadas incubadas com as toxinas P1 e P2 não sofriam clivagem. Desta forma, sugeriu-se que a ativação de uma metaloproteinase da membrana dos eritrócitos

era a responsável pela clivagem da porção extracelular das moléculas de glicoforina e posterior ativação do complemento, considerando que tal hidrólise era inibida pelo inibidor de metaloproteinase fenantrolina. O uso de EDTA preveniu parcialmente a clivagem de glicoforinas pela sua ligação a íons metálicos, bloqueando a ligação das SMases D à membrana dos eritrócitos (TAMBOURGI et al., 2000).

A via clássica do complemento também pode ser ativada pela ação das SMases D, uma vez que estas induzem alterações na membrana dos eritrócitos, resultando na perda da sua assimetria, com conseqüente exposição de fosfatidilserina na superfície celular. Tal afirmação é confirmada pela ligação com a Anexina V (TAMBOURGI et al., 2002) e pela associação direta de C1q à membrana dos eritrócitos (TAMBOURGI et al., 2007). A perda da assimetria da membrana pode ser devido a mudanças na composição lipídica induzidas pela ligação e atividade hidrolítica da esfingomielinase D sobre a superfície dos eritrócitos (REES et al., 1984; TAMBOURGI et al., 1995, 1998, 2000, 2002, 2004, 2007). De fato, um estudo realizado por Foller et al. (2008) demonstrou a participação de esfingomielinases na exposição de fosfatidilserina na superfície de eritrócitos humanos. Segundo os autores, situações estressantes provocam a entrada de cálcio na célula, levando à liberação do Fator Ativador de Plaquetas (PAF) pelos eritrócitos que estimula a ativação de uma esfingomielinase presente na membrana celular. Uma vez ativada, ela promove a formação de ceramida, capaz de ativar uma enzima - escramblase, responsável por promover a perda de assimetria da membrana celular (FOLLER et al., 2008).

A ativação desses mecanismos como conseqüência da ação das esfingomielinases D do veneno assemelha-se aos mecanismos fisiológicos ativados durante a eriptose, processo de morte celular de eritrócitos, em decorrência de fatores como estresse oxidativo, choque osmótico, remoção de cloro ou depleção de energia. Tais estimulantes promovem a abertura de canais de cátions não seletivos, aumentando a concentração de cálcio citosólico. Esse incremento é um fator desencadeante de uma série de eventos que sinalizam para a retirada dessas células da circulação sanguínea. A abertura de canais de potássio sensíveis ao aumento citosólico de cálcio promove a saída de potássio para o meio extracelular. Como conseqüência ocorre a hiperpolarização da membrana celular, que direciona o efluxo de cloreto e, em seguida, a perda de água, resultando na redução do volume celular. Uma vez que a célula diminui seu volume celular, ocorre a ativação da enzima escramblase, que impede a manutenção da assimetria da membrana celular. Essa assimetria é garantida pela enzima flipase e consiste na conservação dos fosfolípidos de membrana - fosfatidilserina e

fosfatidiletanolamida na face interna e fosfatidilcolina e esfingomielina na externa. A exposição de fosfatidilserina na face externa da membrana permite a ligação de receptores presentes em macrófagos, responsáveis por retirar essas células de circulação (FOLLER et al., 2008).

1.1.5 Terapia

A terapia adequada nos casos de loxoscelismo ainda é controversa. O tratamento específico mais comumente utilizado no Brasil é a soroterapia, que visa neutralizar as toxinas presentes no veneno. O soro anti-aracnídico é produzido pelo Instituto Butantan por hiperimunização de cavalos com os venenos das aranhas *Loxosceles gaucha*, *Phoneutria nigriventer* e do escorpião *Tityus serrulatus*. Apesar de ser mencionado como tendo o maior potencial terapêutico contra o veneno quando administrado durante a fase aguda do envenenamento, ainda há divergências quanto à sua eficácia na neutralização dos efeitos locais (dermonecrose) e ao período ideal da sua administração (DA SILVA et al., 2004; HOGAN et al., 2004; PAULI et al., 2006).

Tendo em vista que as espécies *Loxosceles intermedia* e *Loxosceles laeta* são os principais agentes do loxoscelismo no Brasil e na América do Sul, respectivamente, de Almeida et al. (2008) desenvolveram um novo soro, produzido contra uma mistura das esfingomielinases recombinantes P1, P2 e SMase I das mesmas aranhas. Ensaio de neutralização das atividades hemolítica e dermonecrótica dos venenos de *L. gaucha*, *L. intermedia* e *L. laeta* demonstraram que esse soro anti-SMases D foi mais eficaz contra os venenos de *L. intermedia* e *L. laeta* e com atividade similar ou um pouco mais fraca contra os efeitos tóxicos do veneno de *L. gaucha*, quando comparado ao soro anti-aracnídico. Experimentos de neutralização da capacidade dos venenos em clivar esfingomielina mostraram menor eficácia do soro anti-aracnídico em neutralizar os venenos de *L. intermedia* e *L. laeta* quando comparado ao soro anti-SMase D. Entretanto, como esperado, o soro anti-aracnídico demonstrou um melhor potencial de neutralização para o veneno de *L. gaucha*, uma vez que esse veneno é o utilizado para a produção do soro. Assim, as SMases D mostraram-se capazes de substituir o veneno das aranhas *Loxosceles* para a produção do antiveneno.

Paixão-Cavalcante et al. (2006, 2007), por outro lado, demonstraram que o uso da tetraciclina pode ser uma alternativa eficaz no tratamento das lesões dermonecróticas

provocadas pelo envenenamento por aranhas *Loxosceles*, uma vez que esta previne o aumento da expressão de metaloproteinases de matriz MMP-2 e MMP-9 e a morte de queratinócitos por apoptose.

Outros tratamentos incluem a administração de corticosteróides como moduladores da resposta inflamatória (HOGAN et al., 2004). Embora dapsona seja empregada para evitar a migração e infiltração de neutrófilos (KING; REES, 1983), existem poucas evidências clínicas de que haja prevenção da destruição tecidual (BRYANT; PITTMAN, 2003). A hemodiálise é indicada em casos de insuficiência renal (RIBEIRO et al., 1993) e a terapia com oxigênio hiperbárico para a melhoria da vascularização das áreas lesionadas (SVENDSEN, 1986). Intervenções cirúrgicas, especialmente nas mãos, não são recomendadas, pois podem aumentar os efeitos do veneno e a inflamação local, prolongando a injúria tecidual e promovendo a expansão da lesão (DA SILVA et al., 2004; PAULI et al., 2006). Em casos muito severos de lesão tecidual, a excisão é indicada, entretanto, somente após 6 ou 8 semanas, pois até esse período o próprio organismo pode promover a cura tecidual (ANDERSON, 1998).

1.2 Sistema Complemento

Descoberto em 1896 por Bordet, o sistema complemento foi descrito como um componente sérico termo-estável capaz de aumentar a opsonização de bactérias por anticorpos, facilitando a morte dos microrganismos (BORDET; GENGOU, 1901¹ apud MARKIEWSKI; LAMBRIS, 2007). É uma rede complexa formada por mais de 30 proteínas séricas ou associadas a membranas celulares que interagem com células e mediadores do sistema imune, representando um dos principais mecanismos efetores da resposta imune inata contra bactérias, células infectadas por vírus e parasitas, e sem afetar células normais do hospedeiro (FRANK; FRIES, 1991).

O sistema complemento participa de quatro atividades fisiológicas essenciais:

- 1) Defesa contra infecções virais por promover a geração do MAC na superfície dos patógenos (MORGAN, 1989) e de opsoninas que interagem com os receptores de superfície levando à fagocitose de partículas e microrganismos (FRANK; FRIES, 1991);
- 2) Geração de anafilatoxinas solúveis que interferem com a resposta pró-inflamatória local por suas atividades quimiotática (BJORK; HUGLI; SMEDEGARD, 1985;

EHRENGRUBER; GEISER, DERANLEAU, 1994) e ativadora de leucócitos (ADLER et al., 1986) e pela capacidade de induzir degranulação dos mastócitos e basófilos com liberação de histamina (BÜRGI; BRUNNER; DAHIDEN, 1994; HARTMANN et al., 1997);

¹BORDET, J.; GENGOU, O. Sur l'existence de substance sensibilisatrices dans la plupart des serum antimicrobiens. French. **Ann. Inst. Pasteur**, 1901, v. 15, p. 289–302.

- 3) Ponte entre a imunidade inata e a adaptativa, pela ativação e regulação da resposta de linfócitos B e T (MORGAN et al., 2005);
- 4) Retirada de complexos imunes e produtos da injúria inflamatória, como corpos apoptóticos e debris celulares tóxicos, assegurando proteção e cura ao hospedeiro (KORB; AHEARN, 1997; OGDEN et al., 2001).

Para que o sistema complemento exerça seu papel no combate ao desequilíbrio da homeostase do hospedeiro causado pela entrada de microrganismos ele deve ser ativado, originando, assim, uma série de fragmentos com distintas características e funções específicas. A ativação se dá por três vias, cada uma sendo desencadeada por fatores distintos, mas que convergem a uma via comum a partir da clivagem de C3 (EHRENGRUBER; GEISER; DERANLEAU, 1994; FRANK, 1989; ITURRI-YAMAMOTO, 2001).

A via alternativa é a mais antiga delas e envolve C3, fator B, fator D e properdina. Sua ativação não depende da presença de complexos imunes, mas da sua interação com partículas pobres em ácido siálico na sua superfície, como parede de bactérias e leveduras, além do fator de veneno de cobra. Tal interação levará à deposição de C3 nas células alvos, iniciando a via alternativa (FARRIES et al., 1988). A via clássica – envolvendo os componentes C1q, C1r, C1s, C4, C2 e C3, é ativada primariamente pela ligação do componente C1q a complexos imunes, mas este também pode reagir com moléculas não imunes como poliânions – lipopolissacarídeos bacterianos, DNA e RNA – proteína C reativa (PCR), componente amilóide P sérico (SAP) e alguns componentes da membrana de bactérias, fungos e vírus (GEWURZ et al., 1993). A terceira via de ativação do complemento é dependente da ação de uma lecitina ligadora de manose (MBL), membro das colectinas – família de lecitinas dependentes de cálcio, que tem estrutura similar a de C1q (JACK; KLEIN; TURNER, 2001; PETERSEN; THIEL; JENSENIUS, 2001). A atividade proteolítica da MBL foi descoberta pela sua capacidade em causar lise de eritrócitos de carneiro recobertos por manose (IKEDA et al., 1987). A MBL ativa o complemento pela sua interação com duas proteases,

denominadas serinoproteases associadas a MBL (MASP) MASP-1 e MASP-2, homólogas a C1r e C1s, respectivamente. MASP-2 cliva tanto C2 quanto C4, enquanto MASP-1 cliva C2, mas não C4, e também pode clivar C3H₂O, mas não C3 (AMBRUS et al., 2003; ROSSI et al., 1998).

O resultado final da ativação das três vias é o acionamento da via terminal, que promove a união dos componentes C5, C6, C7, C8 e C9, levando à geração do MAC, também denominado complexo C5b-9, responsável por formar poros na membrana que permitirão a passagem de água, íons e outros constituintes, levando à lise celular por desequilíbrio osmótico (MORGAN, 1989).

1.3 Eritrócitos

Eritrócitos maduros são células originadas da medula óssea desprovidas de núcleo, ribossomos e mitocôndrias, incapazes de sofrer divisão celular e realizar reações oxidativas baseadas em mitocôndrias e síntese protéica (BUNN, 1991; VOLPE, 1993). Elas representam 25% das células totais de um indivíduo humano adulto e possuem vida média de aproximadamente 120 dias.

As principais funções destas células são o transporte de nutrientes e oxigênio e a mediação da produção de dióxido de carbono. Tais papéis são realizados pela hemoglobina, uma proteína de 64 kDa cuja abundância representa mais de 95% das proteínas citoplasmáticas dos eritrócitos. Por causa dessa função, os eritrócitos estão em constante contato com células e tecidos de todo o organismo. Estas interações com o meio extracelular são mediadas pela membrana plasmática, que consiste de uma bicamada lipídica composta por 50% de proteínas, 40% de lipídeos e 10% de carboidratos (TELEN; KAUFMAN, 1999² apud ÇIMEN, 2007).

Dentre as proteínas, estão incluídas proteínas reguladoras do Sistema Complemento como DAF, CD59 e CR1. DAF está associada à membrana por uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) na porção C-terminal e inibe a ativação do complemento autólogo por dissociar as enzimas C3 e C5 convertases (MOLD et al., 1990). Da mesma forma, CD59 também possui âncora de GPI, na sua extremidade C-terminal, e protege as células da formação do MAC por associar-se à molécula C8, na membrana, e impedir, assim, a polimerização das moléculas de C9 (MERI, 1990, 1991). CR1 é receptor para os fragmentos C3b e C4b do complemento, com importante função na remoção de imunocomplexos da

circulação sanguínea. Além disso, CR1 é co-fator para o fator I na clivagem de C3b a iC3b, e na clivagem de C4b a iC4b e, dessa forma, impedir a formação das C5 convertases.

A família das glicoforinas (GP) consiste em dois pares de proteínas altamente glicosiladas, GPA/GPB e GPC/GPD. GPA (36 kDa) é a mais abundante, com cerca de 1 milhão de cópias por célula, enquanto GPB (20 kDa) está expressa em aproximadamente 200

² TELEN, M.J.; KAUFMAN, R.E. The mature erythrocyte. Em: LEE, G.R. et al. **Wintrobe's clinical hematology**. Baltimore : Williams & Wilkins, 1999. cap. 10, p. 193-227.

mil cópias.

Por outro lado, o segundo par é bem menos expresso, sendo 135.000 cópias de GPC (32 kDa) e somente 50.000 cópias de GPD (23 kDa) (DENOMME, 2004). GPA/GPB expressam antígenos do sistema MNS e, aparentemente, não provêm estrutura aos eritrócitos, porém funcionam como chaperonas para a expressão de banda 3 na superfície celular (TANNER, 1993). Seus resíduos de carboidratos possuem uma grande quantidade de ácido siálico (DUK et al., 1994), agindo como principal fonte de carga negativa da membrana plasmática dos eritrócitos. Essa característica exerce papel essencial na manutenção dessas células na circulação sanguínea prevenindo a aglutinação espontânea das hemácias, uma vez que as mantêm separadas umas das outras. Durante o envelhecimento celular, ocorre perda de 10 a 15% do conteúdo de ácido siálico da membrana dos eritrócitos. Essa perda, resultante da ação de sialidases ou redução do pH, diminui a repulsão entre eles e os macrófagos, propiciando a fagocitose, uma vez que o número de IgG ligadas é bem maior nos eritrócitos senescentes que nos jovens (TRINGALLI et al., 2001; ENSINCK et al., 2006). Além disso, o par GPA/GPB é o principal contribuinte do glicocálice, o que pode funcionar para proteger as células do dano mecânico (DENOMME, 2004). O outro par de glicoforinas, GPC/GPD, possui função estrutural nas hemácias. Seu domínio citoplasmático interage com proteínas do citoesqueleto – actina, espectrina, fosfoproteína 55 e proteína 4.1, proporcionando estabilidade ao complexo (MARFATIA et al., 1994).

Estas moléculas também têm sido consideradas importantes na regulação do sistema complemento. Estudos demonstraram que a presença de ácido siálico aumenta a afinidade do fator H pelo fragmento C3b. O fator H acelera a dissociação das C3 convertases e atua como cofator para ação do fator I na clivagem de C3b (MOLD et al., 1990). Além disso, o tratamento de hemácias de carneiro (FEARON, 1978) e de humanos com neuraminidase promove aumento na deposição de fragmentos C3b na membrana destas células (KARNCHANAPHANURACH et al., 2009; TAMBOURGI et al., 2000).

1.4 Enzimas Proteolíticas

A clivagem proteolítica nas ligações peptídicas é uma das mais importantes modificações químicas ocorridas em uma proteína em seu processo de maturação. Nos organismos vivos essa reação de hidrólise é catalisada por proteases, responsáveis pela regulação de diversos processos vitais. Enzimas proteolíticas encontram-se amplamente distribuídas em todos os tecidos e fluídos biológicos dos seres vivos e desenvolvem uma importante função no ciclo de vida das proteínas e peptídeos. Em virtude da ampla diversidade de enzimas conhecidas, as proteases foram agrupadas de acordo com a origem evolutiva, divididas em famílias e clãs; pelo tipo de reação catalisada, hidrolisando as extremidades (exopeptidases) ou ligações internas (endopeptidases) da cadeia polipeptídica; ou pela natureza química do centro ativo (NEURATH, 1989). Os resíduos de aminoácidos presentes no centro-ativo estabelecem a base para a classificação das peptidases. Desta forma, as peptidases estão divididas em sete classes: aspartilpeptidases (dois resíduos de ácido aspártico), cisteinopeptidases (resíduo de cisteína), glutamilpeptidases (resíduo de ácido glutâmico), metalopeptidases (íon metálico), serinopeptidases (resíduo de serina), treonilpeptidases (resíduo de treonina) e peptidases de mecanismo catalítico desconhecido.

A análise do proteoma de eritrócitos humanos, realizada por Goodman et al. (2007), relatou a existência de 751 proteínas, distribuídas no citosol e na membrana plasmática. Dentre as proteases identificadas, encontram-se as pertencentes à classe das metaloproteínases – precursor de Aminopeptidase N (CD13), Dipeptidilpeptidase III, Alanil aminopeptidase citosólica, glicoproteína Kell, Timet Oligopeptidase e à das serinoproteínases: precursor de catepsina G, prolil endopeptidase e tripeptidilpeptidase II. Ainda, em 2004, Iwata et al. purificaram e caracterizaram uma elastase na membrana de eritrócitos capaz de ativar o fator IX da cascata de coagulação.

Metaloproteínases são membros da superfamília de zinco proteases, capazes de ligar, no seu sítio ativo, íons metálicos como zinco, cobre, níquel e cobalto, essenciais para a atividade catalítica da enzima. Estes cátions divalentes se ligam efetivamente ao sítio ativo da enzima, interagindo com a molécula de água e aumentando sua reatividade para promover a hidrólise. O cálcio é importante para manter a conformação da molécula. As enzimas desta classe geralmente apresentam a sequência consenso (**H-E-X-X-H**) em sua sequência primária de aminoácidos, na qual a letra X indica qualquer resíduo de aminoácido. Os resíduos de

aminoácidos ligantes ao íon metálico são His (histidina), Glu (ácido glutâmico), Asp (ácido aspártico) e Lys (lisina) (MOCK; STANDFORD, 1996).

Serinoproteinases são enzimas cujo mecanismo de catálise é baseado no ataque nucleofílico das ligações peptídicas alvo por um resíduo de serina. Este mecanismo foi originalmente distinguido pela presença da tríade catalítica Asp–His–Ser no centro ativo destas proteases (BLOW, 1997). Esta tríade pode ser encontrada em, pelo menos, quatro contextos estruturais, indicando que a maquinaria enzimática evoluiu em quatro ocasiões (DODSON; WLODAWR, 1998), denominando os clãs das serinoproteinases em quimotripsinas, subtilisinas, carboxipeptidase Y e protease C1p (MEROPS DATABASE).

6 CONCLUSÃO

Em suma, os dados apresentados no presente estudo sugerem que a esfingomielinase D P2 do veneno das aranhas *Loxosceles intermedia* é capaz de ativar metaloproteinases da membrana de eritrócitos humanos, envolvidas no fenômeno de hemólise dependente da ativação das vias alternativa e clássica do sistema complemento. Por outro lado, os ensaios realizados com as membranas de eritrócitos tratadas com P2 evidenciam a participação de serinoproteinases na hidrólise do substrato fluorescente utilizado nos experimentos de atividade proteolítica.

De fato, a existência de proteases de classes distintas na membrana destas células sugere a cooperação entre elas na tentativa de manter a integridade da célula. Em condições não fisiológicas, como em casos de envenenamento por aranhas *Loxosceles*, os efeitos produzidos pelo veneno no ambiente extracelular levariam ao desequilíbrio da regulação da atividade proteolítica destas, iniciando uma cascata de ativação de proteases de diversas classes, que agiriam em diferentes alvos, mas que o resultado final seria a perda da integridade da membrana da célula afetada.

REFERÊNCIAS

ACHARYA M. R.; VENITZ J.; FIGG W. D.; SPARREBOOM A. Chemically modified tetracyclines as inhibitors of matrix metalloproteinases. **Drug Resist. Updat.**, v. 7, n. 3, p. 195-208, 2004.

ADLER, S.; BAKER, P. J.; JONHSON, R. J.; OCHI, R. F.; PRITZL, P.; COUSER, W. G. Complement membrane attack complex stimulates production of reactive oxygen metabolites by cultured rat mesangial cells. **J. Clin. Invest.**, v. 77, p. 762-767, 1986.

AMBRUS, G.; GÁL, P.; KOJIMA, M.; SZILÁGYI, K.; BALCZER, J.; ANTAL, J.; GRÁF, L.; LAICH, A.; MOFFATT, B.; SCHWAEBLE, W.; SIM, R.B.; ZÁVODSZKY, P. Natural substrates and inhibitors of mannan-binding lectin-associated serine protease-1 and -2: a study on recombinant catalytic fragments. **J. Immunol.**, v. 170, p. 1374–1382, 2003.

ANDERSON, P. C. Missouri brown recluse spider: a review and update. **Mo. Med.**, v. 95, p. 318-322, 1998.

ANDRADE, R. M. G.; GALATI, E. A. B.; TAMBOURGI, D. V. Presença de *Loxosceles similis* Moenkhaus, 1898 (*Araneae, Sicariidae*) na Serra da Bodoquena, Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 34, n. 3, p. 275-277, 2001.

ANTCZAK, C.; DE MEESTER, I.; BAUVOIS, B. Ecto-peptidases in pathophysiology. **Bioessays**, v. 23, n. 3, p. 251–260, 2001.

ARAÚJO, M. C.; MELO, R. L.; CESARI, M. H.; JULIANO, M. A.; JULIANO, L.; CARMONA, A. K. Peptidase specificity characterization of C- and N-terminal catalytic sites of angiotensin I-converting enzyme. **Biochemistry**, v. 39, n. 29, p. 8519–8525, 2000.

BARBARO, K. C.; SOUSA, M. C.; MORTHY, L.; von EICKSTEDT, V. R.; MOTA, I. Compared chemical properties of dermonecrotic and lethal toxins from spiders of the genus *Loxosceles* (Aranaeae). **J. Protein Chem.**, v. 15, n. 4, p. 337-343, 1996.

BARRETO, O.C.O.; CARDOSO, J.L.C.; DE CILLO, D. Viscerocutaneous form of loxoscelism and erythrocyte glucose-6-phosphate deficiency. **Rev. Int. Med. Trop.**, v. 27, p. 264-267, 1985.

BARRETO, O. C.; DE CILLO, D. M.; NONOYAMA, K.; ANTONIO, L. C.; MORENA, P.; CARDOSO, J. L. Methemoglobinemia associated with loxoscelism. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 32, n. 1, p. 1-5, 1990.

BAUVOIS, B.; DAUZONNE, D. Aminopeptidase-N/CD13 (EC 3.4.11.2) Inhibitors: Chemistry, Biological Evaluations and Therapeutic Prospects. **Med. Res. Rev.**, v. 26, n. 1, p. 88-130, 2006.

BERNSTEIN, B.; EHRLICH, F. Brown recluse spider bites. **J. Emerg. Med.**, v. 4, n. 6, p. 457-462, 1986.

BJORK, J.; HUGLI, T. E.; SMEDEGARD, G. Microvascular effects of anaphylatoxins C3a and C5a. **J. Immunol.**, v. 134, p. 1115-1119, 1994.

BLOY, C.; HERMAND, P.; BLANCHARD, D.; CHERIF-ZAHAR, B.; GOOSSEN, D.; CARTRON, J. Surface Orientation and Antigen Properties of Rh and LW Polypeptides of the Human Erythrocyte Membrane. **J. Biol. Chem.**, v. 265, n. 35, p. 21482-21487, 1990.

BLOW, D. M. The tortuous story of Asp...His...Ser: structural analysis of alpha-chymotrypsin. **Trends Biochem. Sci.**, v. 22, p. 405-408, 1997.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos**. Brasília: Fundação Nacional da Saúde, 1998.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN)**. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/index.php>. Acesso em: 20 Abr. 2010.

BUNN, H. F. Pathophysiology of the anemias. In: WILSON, J. D., BRAUNWALD, E., ISSELBACHER, K. J. (ed.). **Harrison's principle of internal medicine**. New York: McGraw-Hill. 1991. p. 1514-1518.

BÜRGI, B.; BRUNNER, T.; DAHIDEN, C. A. The degradation product of the C5a anaphylatoxin C5adesarg retains basophil-activating properties. **Eur. J. Immunol.**, v. 24, p. 1593-1589, 1994.

BURLEY, S. K.; DAVID, P. R.; LIPSCOMB, W. N. Leucine aminopeptidase: Bestatin inhibition and a model for enzyme-catalyzed peptide hydrolysis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 88, n. 16, p. 6916–6920, 1991.

BYKOWSKA, K.; DUK, M.; KUSNIERZ-ALEJSKA, G.; KOPEC, M.; LISOWSKA, E. Degradation of human erythrocyte surface components by human neutrophil elastase and cathepsin G: preferential digestion of glycophorins. **Brit. J. Haemat.**, v. 84, p. 736-742, 1993.

CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MALAQUE, C. M. S.; JUNIOR, V. H. Animais peçonhentos no Brasil. **Sarvier FAPESP**, p. 160-174, 2003.

CHAGAS, J. R.; PORTARO, F. C. V.; HIRATA, I. Y.; ALMEIDA, P. C.; JULIANO, M. A.; JULIANO, L.; PRADO, E. S. Determinants of the unusual cleavage specificity of lysyl-bradykinin-releasing kallikreins. **Biochem. J.**, v. 306, p. 63-69, 1995.

CRISTIANO, M. P.; CARDOSO, D. C.; RAYMUNDO, M. S. Contextual analysis and epidemiology of spider bite in southern Santa Catarina State, Brazil. **Royal Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 103, p. 943-948, 2009.

ÇİMEN, M. Y. B. Free radical metabolism in human erythrocytes. **Clin. Chim. Acta**, v. 390, p. 1-11, 2007.

DA SILVA, P. H.; DA SILVEIRA, R. B.; APPEL, M. H.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W.; VEIGA, S. S. Brown spiders and loxoscelism. **Toxicon**, v. 44, n. 7, p. 693-709, 2004.

DA SILVEIRA, R. B.; DOS SANTOS FILHO, J. F.; MANGILINI, O. C.; VEIGA, S. S.; GREMSKI, W.; NADER, H. B.; von DIETRICH, C. P. Identification of proteases in the extract of venom glands from brown spiders. **Toxicon**, v. 40, p. 815-822, 2002.

DE ALMEIDA, D. M.; FERNANDES-PEDROSA, M. F.; GONÇALVES-DE-ANDRADE, R. M.; MARCELINO, J. R.; GONDO-HIGASHI, H.; DE AZEVEDO, I. L. M. J.; HO, P. L.; VAN DEN BERG, C. W.; TAMBOURGI, D. V. A new anti-loxoscelisc serum produced against recombinant sphingomyelinase D: Results of preclinical trials. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 79, n. 3, p. 463-470, 2008.

DE ROODT A.; SALOMÓN O.; ORDUNA T. Envenenamiento por arañas del género *Loxosceles*. **Medicina**, v. 62, p. 83-94, 2002.

DENOMME, G. A. The structure and function of the molecules that carry human red blood cell and platelet antigens. **Transf. Med. Rev.**, v. 18, n. 3, p. 203-231, 2004.

DODSON, G.; WLODAWR, A. Catalytic triads and their relatives. **Trends Biochem. Sci.**, v. 23, p. 347-352, 1998.

DUK, M.; STICHER, U.; BROSSMER, R.; LISOWSKA, E.. The differences in significance of alpha 2,3Gal-linked and alpha 2,6GalNAc linked sialic acid residues in blood group M- and N-related epitopes recognized by various monoclonal antibodies. **Glycobiology**, v. 4, p. 175-181, 1994.

EINSINCK, A.; BIONDI, C. S.; MARINI, A.; GARCIA BORRÁS, S.; RACCA, L. L.; COTORRUELO, C. M.; RACCA, A. L. Effect of membrane-bound IgG and desialylation in the interaction of monocytes with senescent erythrocytes. **Clin. Exp. Med.**, v. 6, p. 138-142, 2006.

EHRENGRUBER, U. M.; GEISER, T.; DERANLEAU, D. A. Activation of human neutrophils by C3a and C5a. Comparison of the effects on shape changes, chemotaxis, secretion, and respiratory burst. **FEBS Lett.**, v. 346, p. 181-184, 1994.

FARRIES, T. C.; LACHMANN, P. J.; HARRISON, R. A. Analysis of the interactions between properdin, the third component of complement (C3), and its physiological activation products. **Biochem. J.**, v. 252, p. 47-54, 1998.

FEITOSA, L.; GREMSKI, W.; VEIGA, S. S. Detection and characterization of metalloproteinases with gelatinolytic, fibronectinolytic and fibrinogenolytic activities in brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. **Toxicon**, v. 36, p. 1039-1051, 1998.

FEARON, D. T. Regulation by membrane sialic acid of β 1H dissociation of amplification C3 convertase of the alternative C pathway. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 75, n. 4, p. 1971-1975, 1978.

FEARON, D. T.; AUSTEN, K. F. Properdin: binding to C3b and stabilization of the C3b-dependent C3 convertase. **J. Exp. Med.**, v. 142, p. 856-863, 1975.

FISCHER, M. L. Levantamento das espécies de *Loxosceles* Heineken & Lowe, 1832 no município de Curitiba, Paraná, Brasil. **Biol. Stud.**, v. 3, p. 63-88, 1994.

FISCHER M. L.; VASCONCELLOS-NETO J. Microhabitats occupied by *Loxosceles intermedia* and *Loxosceles laeta* (Araneae: Sicariidae) in Curitiba, Paraná, Brazil. v. 42, n. 5, p. 756-765, 2005.

FOLLER, M.; HUBER, S. M.; LANG, F. Erythrocyte programmed cell death. **Life**, v. 60, n. 10, p. 661-668, 2008.

FORRESTER, L. F.; BARRET, J. T.; CAMPBELL, B. J. Red blood cell lysis induced by the venom of the brown recluse spider. The role of sphingomyelinase D. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 87, p. 355-356, 1978.

FUTRELL, J. M. Loxoscelism. **Am. J. Med. Sci.**, v. 304, n. 4, p. 261-267, 1992.

FUTRELL, J. M.; MORGAN, B. B.; MORGAN, P. N. An *in vitro* model for studying hemolysis associated with venom from the brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*). **Toxicon**, v. 17, n. 4, p. 355-362, 1979.

FRANK, M. M. Complement: a brief review. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 84, p. 411-420, 1989.

FRANK, M. M., FRIES, L. F. The role of complement in inflammation and phagocytosis. **Immunol. Today**, v. 12, p. 322-326, 1991.

GERSTSH, W. J. The spider genus *Loxosceles* in South America (Araneae: Scytodidae). **Bull. Am. Mus. Nat. Hist.**, v. 136, p. 119-182, 1967.

GERSTSH, W. J., ENNIK, F. The spider genus *Loxosceles* in North America, Central America and the West Indies (Araneae Loxoscelidae). **Bull. Am. Mus. Nat. Hist.**, v. 175, p. 264-360, 1983.

GEWURZ, H.; YING, S. C.; JIANG, H.; LINT, T. F. Nonimmune activation of the classical complement pathway. **Behring Inst. Mitt.**, v. 93, p. 138-174, 1993.

GOODMAN, S. R.; KURDIA, A.; AMMANN, L.; KAKHNIASHVILI, D.; DAESCU, O. Minireview: The human red blood cell proteome and interactome. **Exp. Biol. Med.**, v. 232, p. 1391-1408, 2008.

GONÇALVES-DE-ANDRADE, R. M.; DE OLIVEIRA K. C.; GIUSTI A. L.; DA SILVA W. D.; TAMBOURGI D. V. Ontogenetic development of *Loxosceles intermedia* spider venom. **Toxicon**, v. 37, n. 4, p. 627-632, 1999.

HARTMANN, K.; HENZ, B. M.; KRÜGER-KRASAGAKES, S.; KÖHL, J.; BUERGER, R.; GUHL, S. et al. C3a and C5a stimulate chemotaxis of human mast cells. **Blood**, v. 89, p. 2863-2870, 1997.

HEAD, D. J.; LEE, Z. E.; POOLE, J.; NEIL, D. A. Expression of phosphatidylserine (PS) on wild-type and Gerbich variant erythrocytes following glycophorin-C (GPC) ligation. **Brit. J. Haem.**, v. 129, p. 130-137, 2005.

HIRATA, I. Y.; CEZARI, M. H. S.; NAKAIE, C. R.; BOSCHCOV, P.; ITO, A. S.; JULIANO, M. A.; JULIANO, L. Internally quenched fluorogenic protease substrates: Solid-phase synthesis and fluorescence spectroscopy of peptides containing ortho-aminobenzoyl/dinitrophenyl groups as donor-acceptor pairs. **Lett. Pep. Sci.**, v.1, n. 6, p. 299-308, 1994.

HOGAN, C. J.; BARBARO, K. C.; WINKEL, K. Loxoscelism: old obstacles, new directions. **Ann. Emerg. Med.**, v. 44, p. 608-624, 2004.

HOURLCADE, D. E. The role of properdin in the assembly of the alternative pathway c3 convertases of complement. **J. Biol. Chem.**, v. 281, n. 4, p. 2128-2132, 2006.

IKEDA, K.; SANNOH, T.; KAWASAKI, N.; KAWASAKI, T.; YAMASHINA, I. Serum lectin with known structure activates complement through the classical pathway. **J. Biol. Chem.**, v. 262, p. 7451-7454, 1987.

IKEJIRI, M.; Bernardo, M. M.; BONFIL, R. D.; TOTH, M.; CHANG, M.; FRIDMAN, R.; MOBASHERY, S. Potent mechanism-based inhibitors for matrix metalloproteinases. **J. Biol. Chem.**, v. 280, n. 33992-34002, 2005.

ITURRI-YAMAMOTO, G. R.; PORTINHO, C. P. Sistema Complemento: ativação, regulação e deficiências congênitas e adquiridas. **Rev. Ass. Med. Brasil**, v. 47, n. 1, p. 41-51, 2001.

IWATA, H.; KAIBARA, M.; DOHMAE, N.; TAKIO, K.; HIMENO, R.; KAWAKAMI, S. Purification, identification and characterization of elastase on erythrocyte membrane as factor IX-activating enzyme. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 316, p. 65-70, 2004.

JACK, D. L.; KLEIN, N. J.; TURNER, M. W. Mannose-binding lectin: targeting the microbial world for complement attack and opsonophagocytosis. **Immunol. Rev.**, v. 180, p. 86-99, 2001.

KARNCHANAPHANURACH, P.; MIRCHEV, R.; GHIRAN, I.; ASARA, J. M.; PAPAHAADJOPOULOS-STERMBERG, B.; NICHOLSON-WELLER, A.; GOLAN, D. E. C3b deposition on human erythrocytes induces the formation of a membrane skeleton-linked protein complex. **J. Clin. Invest.**, v. 119, n. 4, p. 788-801, 2009.

KORB, L. C.; AHEARN, J. M. C1q binds directly and specifically to surface blebs of apoptotic human keratinocytes: complement deficiency and systemic lupus erythematosus revisited. **J. Immunol.**, v. 158, p. 4525-4528, 1997.

KING, L. E.; REES, R. S. Dapsone treatment of a brown recluse bite. **JAMA**, p. 250-368, 1983.

KURPIEWSKI, G.; FORRESTER, L. J.; BARRET, J. T.; CAMPBELL, B. J. Platelet aggregation and sphingomyelinase D activity of a purified toxin from the venom of *Loxosceles reclusa*. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 678, p. 467-476, 1981.

LAW, S. K. A.; REID, K. B. M. **Complement**. Oxford: Ilpress, 1988.

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

LUCAS, S. Spiders in Brazil. **Toxicon**, v. 26, n. 9, p. 759-775, 1988.

MACHADO, E. O.; ÁLVARES, E. S. S.; DE MARIA, M.; KALAPOTHALIS, E. Sobre a presença de três espécies de *Loxosceles* Heineken & Lowe (Araneae: Sicariidae) no município de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. **Lundiana**, v. 6, n. 2, p.113-115, 2005.

MALAUQUE, C. M. S.; CASTRO-VALENCIA, J. E.; CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; BÁRBARO, K. C.; FAN, H. W. Clinical and epidemiological features of definitive and presumed loxoscelism in São Paulo, Brazil. **Rev. Int. Med. trop. S. Paulo**, v. 44, n. 3, p. 139-143, 2002.

MARCHENKO G. N.; RATNIKOV B. I.; ROZANOV D. V.; GODZIK A.; DERYUGINA E. I.; STRONGIN A. Y. Characterization of matrix metalloproteinase-26, a novel metalloproteinase widely expressed in cancer cells of epithelial origin. **Biochem. J.**, v. 356, p. 705-718, 2001.

MARFATIA, S. M.; LUE, R. A.; BRANTON, D.; CHISHTI, A. H. In vitro binding studies suggest a membrane-associated complex between erythroid p55, protein 4.1, and glycophorin C. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 8631-8634, 1994.

MARIKOVSKY, Y.; MARIKOVSKY, M. Clearance of senescent erythrocytes: wheat germ agglutinin distribution on young and old human erythrocytes. **Glycoconj. J.**, v. 19, p. 1-4, 2002.

MARKIEWSKI, M.M.; LAMBRIS, J.D. The role of complement in inflammatory diseases from behind the scenes into the spotlight. **Am. J. Pathol.**, v. 171, n. 3, 2007.

MARQUES-DA-SILVA, E.; FISCHER, M. L. Distribuição das espécies do gênero *Loxosceles* Heineken & Lowe, 1835 (Araneae: Sicariidae) no Estado do Paraná. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 38, n. 4, p. 331-335, 2009.

MARTINS R.; KNYSAK I.; BERTANI R. A new species of *Loxosceles* of the *laeta* group from Brazil (Araneae; Sicariidae). **Zootaxa**, v. 94, p.1-6, 2002.

MEDZHITOV, R. E JANEWAY, C. A. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. **Science**, v. 296, p. 298-300, 2002.

MEDICUS, R. G.; GOTZE, O.; MULLER-EBERHARD, H. J. **J. Exp. Med.**, v. 144, p. 1076–1093, 1976.

MERI, S. Human protectin (CD59), a 18,000 – 20,000 MW complement lysis restricting factor, inhibits C5b-8 catalysed insertion of C9 into lipid bilayers. **Immunology**, v. 71, p. 1-9, 1990.

MERI, S. Distribution of protection (CD59), a complement membrane attack inhibitor, in normal human tissues. **Lab. Invest.**, v. 65, p. 532-537, 1991.

MOCK, W. L. e STANSFORD, D. J. Arazoformyl dipeptide substrates for thermolysin: confirmation of a reverse protonation catalytic mechanism. **Biochemistry**, v. 35, n. 23, p. 7369-7377, 1996.

MOLD, C.; WALTER, E. I.; MEDOF, E. The influence of membrane components on regulation of alternative pathway activation by decay-accelerating factor. **J. Immunol.**, v. 145, p. 3836—3841, 1990.

MORGAN, B. P. Complement membrane attack on nucleated cell-resistance, recovery and non-lethal effects. **Biochem. J.**, v. 264, p. 1-14, 1989.

MORGAN, B. P.; MARCHBANK, K. J., LONGHI, M. P.; HARRIS, C. L.; GALLIMORE, A. M. Complement: central to innate immunity and bridging to adaptive responses. **Immunol. Lett.**, v. 97, p. 171-179, 2005.

MORRISSEY, J. H. Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: A modified procedure with enhanced uniform sensitivity. **Analyt. Biochem.**, v. 117, n. 2, p. 307-310, 1981.

NANCE, W. E. Hemolytic anemia of necrotic arachinism. **Am. J. Med. Sci.**, v. 31, p. 801-807, 1961.

NEURATH, M. F. The diversity of proteolytic enzymes. In: BEYGON R. J., BOND J. S. **Proteolytic enzymes: a practical approach**. England: Oxford University Press. 1989, p 1-12.

OGDEN, D. A.; DECATHELINEAU, A.; HOFFMANN, P. R.; BRATTON, D.; GHEBREHIWET, B.; FADOK, V. A.; HENSON, P. M. C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells. **J. Exp. Med.**, v. 194, p. 781-795, 2001.

OLIVEIRA, K. C.; GONÇALVES-DE-ANDRADE, R. M.; GIUSTI, A. L.; SILVA, W. D.; TAMBOURGI, D. V. Sex-linked variation of *Loxosceles intermedia* spider venoms. **Toxicon**, v. 37, p. 217-221, 1999.

OLIVEIRA, K. C.; GONÇALVES-DE-ANDRADE, R. M.; PIAZZA, R. M. F.; FERREIRA JUNIOR, J. M. C.; VAN DEN BERG, C. W.; TAMBOURGI, D. V. Variations in *Loxosceles* spider venom composition and toxicity contribute to the severity of envenomation. **Toxicon**, v. 45, p. 421-429, 2005.

PAIXAO-CAVALCANTE, D.; VAN DEN BERG, C. W.; FERNANDES-PEDROSA, M. F.; GONÇALVES-DE-ANDRADE, R. M.; TAMBOURGI, D. V. Role of matrix metalloproteinases in HaCat keratinocytes apoptosis induced by *Loxosceles* venom sphingomyelinase D. **J. Invest. Dermatol.**, v. 126, n. 1, p. 61-68, 2006.

PANGBURN, M. K.; MULLER-EBERHARD, H. J. Complement C3 convertase: cell surface restriction of 1H control and generation of restriction on Neuraminidase-treated cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** v. 75, p. 2416–2420, 1978.

PARKER, C. J.; SOLDATO, C. M.; ROSSE, W. F. Abnormality of glycoporphin-alpha on paroxysmal nocturnal hemoglobinuria erythrocytes. **J. Clin. Invest.**, v. 73, p. 1130–1143, 1984.

PAULI, I.; PUKA, J.; GUBERT, I. C.; MINOZZO, J. C. The efficacy of antivenom in loxoscelism treatment. Review. **Toxicon**, v. 48, p. 123-137, 2006.

PETERSEN, S. V.; THIEL, S.; JENSENIUS, J. C. The mannan-binding lectin pathway of complement activation: biology and disease association. **Mol. Immunol.**, v. 38, p. 133-149, 2001.

PLATNICK, N. I. **The world spider catalog**. Version 9.5. American Museum of Natural History. Disponível em: <http://research.amnh.org/entomology/spiders/catalog/index.html>. Acesso em: 10 Abr. 2010.

PRETEL, F.; GONÇALVES-DE-ANDRADE, R. M.; MAGNOLI, F. C.; DILVA, M. E. R.; FERREIRA JR, J. M. F.; VAN DEN BERG, C. W.; TAMBOURGI, D. V. Analysis of the toxic potential of venom from *Loxosceles adelaida*, a Brazilian Brown spider from karstic areas. **Toxicon**, v. 45, p. 449-458, 2005.

QIU W.; BAI, S. X.; ZHAO, M. R.; WU, X. Q.; ZHAO, Y. G.; SANG, Q. X. A.; WANG, Y. L. Spatio-temporal expression of matrix metalloproteinase-26 in human placental trophoblasts and fetal red cells during normal placentation. **Biol. Reprod.**, v. 72, p. 954–959, 2005.

RATAJCZAK, J.; MAJKA, M.; KIJOWSKI, J.; BAJ, M.; PAN, Z. K.; MARQUEZ, L. A.; JANOWSKA-WIECZOREK, A.; RATAJCZAK, M. Z. Biological significance of MAPK, AKT and JAK-STAT protein activation by various erythropoietic factors in normal human early erythroid cells. **Br. J. Haematol.**, v. 115, n.1, p. 195-204, 2001.

RAWLINGS, N. D., O'BRIEN, E. A.; BARRETT, A. J. **MEROPS: The Protease Database**. Disponível em: <http://merops.iapc.bbsrc.ac.uk/>. Acesso em: 26 Abr. 2010.

REES, R. S.; ALTENBERN, D. P.; LYNCH, J. B.; KING, L. E. Brown recluse spider bites: A comparison of early surgical excision versus dapsone and delayed surgical excision. **Ann. Surg.**, v. 20, p. 659-663, 1985.

RICH, D. H.; MOON, B. J.; HARBESON, S. Inhibition of aminopeptidases by amastatin and bestatin derivatives. Effect of inhibitor structure on slow-binding processes. **J. Med. Chem.**, v. 27, n.4, p.417–422, 1984.

RIBEIRO, L. A.; EICKSTEDT, V. R. D.; RÚBIO, G. B. G.; KONALSAISEN, J. F.; HANDAR, Z.; ENTRES, M.; CAMPOS, V. A. F. P.; JORGE, M. T. Epidemiologia do acidente por aranhas do gênero *Loxosceles Heinecken* and *Lowe* no estado do Paraná (Brasil). **Mem. Int. Butantan**, v. 55, n. 1, p. 19-26, 1993.

ROSSI, V.; BALLY, I.; THIELENS, N. M.; ESSER, A. F.; ARLAUD, G. J. Baculovirus mediated expression of truncated modular fragments from the catalytic region of human complement serine protease C1s. Evidence for the involvement of both complement control protein modules in the recognition of the C4 protein substrate. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 1232–1239, 1998.

SCHENONE, H. Cuadros tóxicos producidos por mordeduras de araña en Chile: latrodictismo y loxoscelismo. **Rev. Méd. Chile**, v. 131, p. 437- 444, 2003.

SCHULTZ, G. S.; STRELOW, S.; STERN, G. A.; CHEGINI, N.; GRANT, M. B.; GALARDY, R. E.; GROBELNY, E.; ROWSEY, J. J.; STONECIPHER, K.; PARMLEY, V. Treatment of alkali alkali-injured rabbit corneas with a synthetic inhibitor of matrix metalloproteinases. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 33, p. 3325–3331, 1992.

SCHWAEBLE, W. J.; REID, K. B. **Immunol. Today**, v. 20, p. 17–21, 1999.

SEALS, F. D.; COURTNEIDGE, S. A. The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. Review. **Genes Dev.**, v. 17, p. 7-30, 2003.

SEZERINO, U. M.; ZANNIN, M.; COELHO, L. K.; GONÇALVES JUNIOR, J.; GRANDO, M.; MATTOSINHO, S. G.; CARDOSO, J. L.; VON EICKSTEDT, V. R.; FRANÇA, F. O.; BARBARO, K. C.; FAN, H. W. A clinical and epidemiological study of *Loxosceles* spider envenoming in Santa Catarina, Brazil. **Trans. Rev. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 92, p. 546-548, 1998.

SMITH, C. V.; MICKS, D. W. The role of polymorphonuclear leukocytes in the lesion caused by the venom of the brown spider, *Loxosceles reclusa*. **Lab. Invest.**, v. 22, p. 141-144, 1970.

STOCKER, W.; GRAMS, F.; BAUMANN, U.; REINEMER, P.; GOMIS-RUTH, F. X.; MCKAY, D. B.; BODE, W. The metzincins topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases. **Protein Sci.**, v. 4, p. 823-840, 1995.

STONE, A. L.; KROEGER, M.; SANG, Q. X. Structure-function analysis of the ADAM family of disintegrin-like and metalloproteinase-containing proteins. Review. **J. Protein. Chem.**, v. 18, n. 4, p. 447-465, 1999.

SUNDERKÖTTER, C.; SEELIGER, S.; SCHONLAU, F.; ROTH, J.; HALLMANN, R.; LUGER, T. A.; SORG, C.; KOLDE, G. Different pathways leading to cutaneous leukocytoclastic vasculitis in mice. **Exp. Dermatol.**, v. 10, n. 6, p. 391-404, 2001.

SVENDSEN, F. J. Treatment of clinically diagnosed brown recluse spider bite with hyperbaric oxygen: a clinical observation. **J. Ark. Med. Soc.**, v. 83, p. 199-204, 1986.

SWANSON, D. L.; VETTER, R. S. Loxoscelism. **J. Clin. Dermatol.**, v. 24, p. 213-221, 2006.

TAMBOURGI, D. V.; MAGNOLI, F. C.; VON EICKSTEDT, V. R. D.; BENEDETTI, Z. C.; PETRICEVICH, V. L.; DA SILVA, W. D. Incorporation of a 35 kDa purified protein from *Loxosceles intermedia* spider venom transforms human erythrocytes into activators of autologous complement alternative pathway. **J. Immunol.**, v. 155, p. 4459-4466, 1995.

TAMBOURGI, D. V.; PETRICEVICH, V. L.; MAGNOLI, F. C.; ASSAF, S. L. M. R.; JANCAR, S.; DA SILVA, W. D. Endotoxemic- like shock induced by *Loxosceles* spider venoms: pathological changes and putative cytokine mediators. **Toxicon**, v. 36, n. 2, p. 391-403, 1998a.

TAMBOURGI, D. V.; MAGNOLI, F. C.; VAN DEN BERG, C. W.; MORGAN, B. P.; ARAÚJO, P. S.; ALVES, E. W.; DA SILVA, W. D. Sphingomyelinases in the venom of the spider *Loxosceles intermedia* are responsible for both dermonecrosis and complement-dependent hemolysis. **Biochem. and Biophys. Res. Comm.**, n. 251, p. 366-373, 1998b.

TAMBOURGI, D. V.; MORGAN, B. P.; GONÇALVES-DE-ANDRADE, R. M.; MAGNOLI, F. C.; VAN DEN BERG, C. W. *Loxosceles intermedia* spider envenomation induces activation of an endogenous metalloproteinase, resulting in cleavage of glycophorins from de erythrocyte surface facilitating complement-mediated lysis. **Blood**, v. 95, n. 2, p. 683-691, 2000.

TAMBOURGI, D. V.; DA SILVA, M. S.; BILLINGTON, S. J.; GONCALVES-DE-ANDRADE, R. M.; MAGNOLI, F. C.; SONGER, J. G.; VAN DEN BERG, C. W. Mechanism of induction of complement susceptibility of erythrocytes by spider and bacterial sphingomyelinases. **Immunology**, v. 107, n. 1, p. 93-101, 2002.

TAMBOURGI, D. V.; FERNANDES-PEDROSA, M. F.; VAN DEN BERG, C. W.; GONÇALVES-DE-ANDRADE, R. M.; FERRACINI, M.; PAIXÃO-CAVALCANTE, D.; MORGAN, B. P.; RUSHMERE, N. K. Molecular Cloning, expression, function and immunoreactivities of members of a gene family of sphingomyelinases from *Loxosceles* venom glands. **Mol. Immunol.**, v. 41, p. 831-840, 2004.

TAMBOURGI, D. V.; PAIXÃO-CAVALCANTE, D.; GONÇALVES-DE-ANDRADE, R. M.; FERNANDES PEDROSA, M. F.; MAGNOLI, F. C.; MORGAN, B. P.; VAN DEN BERG, C. W. *Loxosceles* sphingomyelinase induces Complement- dependent dermonecrosis, neutrophil infiltration and endogenous gelatinase expression. **J. Invest. Dermatol.**, v. 124, p. 725-731, 2005.

TANNER, M. J. The major integral proteins of the human red cell. **Baillieres Clin. Haematol.**, v. 6, p. 333, 1993.

TOKUMURA, A.; MAJIMA, E.; KARIYA, Y.; TOMINAGUA, K.; KOGUNE, K.; YASUDA, K.; FUKUZAWA, K. Increased production of bioactive lysophosphatidic acid by serum lysophospholipase D in human pregnancy. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 39436-39442, 2002.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Eletrophoretic transfer of proteins from acrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc. Natl Acad. USA**, v. 76, p. 4350-4354, 1979.

TRINGALI, C.; FIORILLI, A.; VENERANDO, B.; TETTAMANTI, G. Different behavior of ghost-linked acidic and neutral sialidases during human E aging. **Glycoconj. J.**, v. 18, p. 407-418, 2001.

TURNER, N. A.; O'REGAN, D. J.; BALL, S. G.; PORTER, K. E. Simvastatin inhibits MMP-9 secretion from human saphenous vein smooth muscle cells by inhibiting the RhoA/ROCK pathway and reducing MMP-9 mRNA levels. **FASEB J.**, v. 19, n. 7, p. 804-806, 2005.

VAN DEN BERG, C. W.; GONÇALVES-DE-ANDRADE, R. M.; MAGNOLI, F. C.; MARCHBANK, K. J.; TAMBOURGI, D. V. *Loxosceles* spider venom induces metalloproteinase mediated cleavage of MCP/ CD46 and MHCI and induces protection against C- mediated lysis. **Immunology**, v. 107, p. 102-110, 2002.

VAN DEN BERG, C. W.; GONÇALVES-DE-ANDRADE, R. M.; MAGNOLI, F. C.; TAMBOURGI, D. V. *Loxosceles* spider venom induces the release of trombospondin and endothelial protein C receptor: implications for the pathogenesis of intravascular coagulation as observed in loxoscelism. **J. Thromb. Haemost.**, v. 5, p. 989-995, 2007.

VOLPE, E. P. Blood and circulation. In: DUBUQUE, W.C., (ed.). **Biology and human concerns**. Dubuque: W. C. Brown Publishers. 1993. p. 253-265.

WANG, S.; LEE, S. R.; GUO, S. Z.; KIM, W. J.; MONTANER, J.; WANG, X.; LO, E. H. Reduction of tissue plasminogen activator-induced matrix metalloproteinase-9 by simvastatin in astrocytes. **Stroke**, v. 37, n. 7, p. 1910-1912, 2006.

WASSERMAN, G. S.; ANDERSON, D. O. Loxoscelism and necrotic arachnidism. **J. Toxicol. Clin. Toxicol.**, v. 21, p. 451-455, 1983-1984.

WEISS, D. J.; MCCLAY, C. B. Studies on the pathogenesis of the erythrocyte destruction associated with the anemia of inflammatory disease. **Vet. Clin. Pathol.**, v. 17, p. 90, 1988.

WOLFSBERG, T. G.; STRAIGHT P. D.; GERENA R. L.; HUOVILA A. P.; PRIMAKOFF, P.; MYLES D. G.; WHITE J. M. ADAM, a widely distributed and developmentally regulated gene family encoding membrane proteins with a disintegrin and metalloprotease domain. **Dev. Biol.**, v. 169, n. 1, p. 378-383, 1995.

WRIGHT, R. P.; ELGERT, K. D.; CAMPBELL, B. J.; BARRETT, J. T. Hyaluronidase and esterase activities of the venom of the poisonous brown recluse spider. **Arch. Biochem. Biophys.**, n. 159, p. 415-426, 1973.

XU, Y.; WELLNER, D.; SCHEINBERG, D. Substance P and Bradykinin are natural inhibitors of CD13/Aminopeptidase N. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 208, n. 2, p. 664-674, 1995.

YARON, A.; CARMEL, A.; KATCHALSKI-KATZIR, E. Intramolecularly quenched fluorogenic substrates for hydrolytic enzymes. **Anal. Biochem.**, v. 95, n. 1, p. 228-235, 1979.

ZHAO, Y. G.; XIAO, A. Z.; NEWCOMER, R. G.; PARK, H. I.; KANG, T.; CHUNG, L. W.; SWANSON, M. G.; ZHAU, H. E.; KURHANEWICZ, J.; SANG, Q. X. A. Activation of progelatinase B by endometase/matrilysin-2 promotes invasion of human prostate cancer cells. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p.15056–15064, 2003.

ZHAO, Y. G.; XIAO, A. Z.; PARK, H. I.; NEWCOMER, R. G.; YAN, M.; MAN, Y. G.; HEFFELFINGER, S. C.; SANG, Q. X. A. Endometase/matrilysin-2 in human breast ductal carcinoma in situ and its inhibition by tissue inhibitors of metalloproteinases- 2 and -4: a putative role in the initiation of breast cancer invasion. **Cancer Res.**, v. 64, p. 590–598, 2004.