

DANIELA TIEMI MYAMOTO

Caracterização e análise filogenética dos genes que codificam para os componentes C3 e fator B do Sistema Complemento das glândulas de veneno de aranhas *Loxosceles*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Imunologia

Orientadora: Prof. Dra. Denise V. Tambourgi

Versão original

São Paulo
2015

RESUMO

MYAMOTO, D. T. **Caracterização e análise filogenética dos genes que codificam para os componentes C3 e fator B do Sistema Complemento das glândulas de veneno de aranhas *Loxosceles***. 2015. 110 f. Tese (Doutorado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

O sistema complemento humano é composto por mais de 30 proteínas, sendo que muitas destas apresentam domínios conservados o que possibilita traçar a evolução filogenética dos componentes deste sistema. Tal sistema parece ter surgido com o aparecimento de C3 e fator B (FB), únicos componentes encontrados em alguns protostômios e cnidários, o que sugere que a via alternativa seja a mais primitiva. Recentemente, foram identificadas, no transcriptoma da glândula de veneno da aranha *Loxosceles laeta*, sequências gênicas similares as dos componentes C3 e FB de invertebrados das famílias Limulidae e Strongylocentrotidae, respectivamente. Tais achados sugerem que os componentes centrais do complemento possam estar presentes na glândula de veneno das aranhas marrom desempenhando, talvez, papel de defesa. Neste projeto, fragmentos de cDNA codificantes para os componentes fator B (Lox-FB) e C3 (Lox-C3) foram obtidos, a partir do RNA total isolado da glândula de veneno de *L. laeta*, que foram amplificados por técnicas de RACE-PCR, *primers* específicos e degenerados. As sequências de cDNA obtidas, e suas respectivas sequências deduzidas de aminoácidos, foram analisadas com ferramentas de bioinformática. Análises dos clones 5' e 3' de Lox-FB revelou um cDNA com 1953 pares de bases, codificante para uma proteína madura de 651 aminoácidos. Lox-FB apresenta uma organização de domínios clássica, com dois domínios CCP (*Complement Control Proteins*), um domínio vWFA (*von Willebrand factor domain type A*) e um domínio de serino protease (SP). Os aminoácidos envolvidos na ligação ao C3b, dependente de íons Mg^{+2} (MIDAS), foram bem conservados, no entanto, a tríade catalítica composta pelos aminoácidos histidina, ácido aspártico e serina não foi encontrada no domínio SP. Para Lox-C3, foi identificado um cDNA com 5178 pares de bases, codificante para uma proteína de 1726 aminoácidos, com uma configuração de domínios similar àquela da sequência primária do C3 humano. O alinhamento múltiplo entre as proteínas C3-like revelaram a presença de um sítio de processamento entre as cadeias α e γ , além do sítio de processamento entre as cadeias α e β , indicando que Lox-C3 seja composto por três cadeias. Para melhor entender a história evolutiva dos componentes Lox-C3 e Lox-FB de *L. laeta*, foi realizada uma análise filogenética que indicou que Lox-C3 pertence ao grupo em que estão também presentes duas isoformas de C3 da aranha *Hasarius adansoni* (Família Salcítidae), com a qual obteve maior similaridade (53%). Com relação às proteínas pertencentes à família C2/FB, Lox-FB foi incluído no grupo em que estão presentes componentes FB-like de anêmonas, anfioxos, moluscos e outras três espécies do Filo Arthropoda, com as quais apresentou uma maior similaridade (43%) e uma relação evolutiva mais próxima com a terceira isoforma da aranha *Hasarius adansoni*, aparentemente inativa. Este trabalho representa a primeira caracterização de dois genes que compõem o sistema complemento das aranhas *Loxosceles* que poderá contribuir para melhor entendimento do sistema imune inato dessas aranhas.

Palavras-chave: *Loxosceles laeta*. Sistema complemento C3. FB. Filogenia. Clonagem.

ABSTRACT

MYAMOTO, D. T. **Characterization and phylogenetic analysis of genes coding for the components C3 and factor B of Complement System from *Loxosceles* spiders venom glands.** 2015. 110 p. Ph.D. Thesis (Immunology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

The human complement system is composed by more than 30 proteins and many of them have conserved domains that allow tracing the phylogenetic evolution. The complement system seems to be initiated with the appearance of C3 and factor B (FB), the only components found in some protostomes and cnidarians, suggesting that the alternative pathway is more ancient. Recently, they have been identified, in the transcriptome of *Loxosceles laeta* spiders venom glands, C3- and FB-like genes of invertebrates of Limulidae and Strongylocentrotidae Family, respectively. These findings suggest that the central components of the complement system can be expressed on the venom gland from the brown spiders, maybe playing a role in the defense mechanisms. In this project, cDNA fragments coding for the complement factor B (Lox-FB) and C3 (Lox-C3) were synthesized from total RNA *L. laeta* spiders venom gland and amplified using RACE-PCR techniques, specific and degenerate primers. The resulting cDNA sequences and their respective protein sequences were analyzed using bioinformatics tools. Analyses of 5' and 3' clones of Lox-FB allowed identifying a cDNA composed by 1953 base pairs that coding for a mature protein of 651 amino acids. Lox-FB has a classical domain organization in mosaic, composed by two CCPs (Control Complement Proteins), a vWFA domain (von Willebrand Factor domain) and a SP domain (Serine Protease). The amino acids involved in binding to C3b dependent of Mg²⁺ metal ion (MIDAS) are well conserved, however, the catalytic triad composed of amino acids histidine (H), aspartic acid (D) and serine (S) were not found in SP domain. For Lox-C3, it was identified a cDNA composed by 5178 base pairs that coding for a protein of 1726 amino acids with a configuration of domains similar to those primary sequence of Human C3. The multiple alignment between C3-like proteins revealed the presence of a processing site between the α and β chains, indicating that Lox-C3 is composed by three chains. To better understand the evolutionary history of Lox-C3 and Lox-FB components, the phylogenetic analysis was performed. Lox-C3 placed inside the group where others two isoforms of C3 from spider *Hasarius adansoni* (Família Salcitrae), with which obtained major similarity (53%). With respect to proteins belonging to C2/FB Family, Lox-FB grouped inside the clade that FB-like from anemones, amphioxus, mollusks and others three species from Arthropoda Phylum are present, obtaining a major similarity (43%) and a evolutionary close relationship with the third isoform of spider *H. adansoni*, apparently inactive. This work represents the first characterization of genes coding for two components that comprise the *Loxosceles* spiders complement system that can contribute for best understanding of innate immune system of these spiders.

Keywords: *Loxosceles laeta*. Complement system. C3. FB. Phylogeny. Cloning.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aranhas *Loxosceles* sp

1.1.1 Biologia e distribuição geográfica do gênero *Loxosceles* (Heinecken e Lowe, 1835)

Aranhas do gênero *Loxosceles* (Aranae, Sicariidae) são animais de pequeno porte; medem de 8 a 15 mm de corpo e suas pernas de 8 a 30 mm. Apresentam coloração que varia do marrom claro (*L. laeta*) ao escuro (*L. gaucho*) sendo, por isso, vulgarmente conhecidas como aranhas marrons (**FIGURA 1A**). Uma estrutura característica das aranhas desse gênero é o cefalotórax que se assemelha a um violino e possuem seis olhos arranjados em três pares (**FIGURA 1B**). Constroem teias irregulares que lembram chumaços de algodão, possuindo hábitos sedentários e noturnos (FUTRELL, 1992; GONÇALVES-DE-ANDRADE et al., 1999). Aranhas *Loxosceles* não são agressivas ao homem; os acidentes ocorrem apenas quando a aranha é comprimida contra o corpo. Seu habitat natural são as frestas e cascas soltas de árvores, folhas secas e cavidades do solo e de pedras, tendo se adaptado, no entanto, aos domicílios, onde se abrigam atrás de móveis, nos sapatos e em roupas penduradas (BÜCHERL, 1969).

FIGURA 1 - Aranhas *Loxosceles*

A



B



Loxosceles laeta coletadas no município do Rio de Janeiro. Fonte: Silveira, Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2009 [A]. Visão anterior do cefalotórax de *Loxosceles reclusa* mostrando o padrão de seis olhos arranjados em três pares. Fonte: Swanson e Vetter, Clinics in Dermatology, 2006 [B].

O habitat e o substrato ocupado por essas aranhas favorecem sua dispersão passiva, resultando em transporte de algumas espécies para outras regiões do mundo (FISCHER; VASCONCELOS NETO, 2005). O sucesso na ocupação de novos ambientes é favorecido por fatores como alta longevidade e resistência a longos períodos sem alimentação e água (LOWRIE, 1980).

Essas aranhas possuem uma ampla distribuição mundial em regiões temperadas e tropicais, com diferentes espécies registradas na América do Sul, América Central, América do Norte, Europa, África, Oriente Médio, Oceania e Ásia (FUTRELL, 1992). Na América do Norte, *L. reclusa* e *L. deserta* são endêmicas e responsáveis pela maioria dos acidentes documentados. Dentre as espécies da América do Sul, *L. laeta* é, possivelmente, a que possui o veneno mais tóxico, possuindo uma ampla distribuição geográfica (FUTRELL, 1992). É endêmica no Chile e Peru, mas também tem sido encontrada na Austrália, Finlândia, Rússia, Mediterrâneo e nos Estados Unidos (HOGAN; BARBARO; WINKEL, 2004). Além disso, *L. laeta* apresenta um grande potencial reprodutivo: cada fêmea pode produzir 15 ootecas durante toda a sua vida (GONÇALVES-DE-ANDRADE; LOURENÇO; TAMBOURGI, 2000) e cada uma delas pode conter até 138 ovos (GALIANO; HALL, 1973).

No Brasil, esta espécie ocupa ecótopos urbanos e sua presença já foi registrada desde o estado da Paraíba até o Rio Grande do Sul e, foram também encontradas na cidade de São Paulo (GONÇALVES-DE-ANDRADE; TAMBOURGI, 2003).

1.1.2 *Loxoscelismo e veneno*

Pelo menos três diferentes espécies de *Loxosceles*, de importância para a saúde pública, são conhecidas no Brasil (*L. intermedia*, *L. gaucho*, *L. laeta*) e mais de 7000 casos de envenenamento por estas aranhas foram registrados no ano de 2014 (SINAN - Ministério da Saúde). O estado do Paraná, em especial o município de Curitiba, apresenta uma situação atípica em termos mundiais, quanto ao número de acidentes loxoscélicos (MARQUES-DASILVA; FISCHER, 2005) e com relação ao tamanho da população dessas aranhas.

O envenenamento em humanos pode resultar em duas variantes clínicas: o loxoscelismo cutâneo e o loxoscelismo viscero-cutâneo. O primeiro é mais comum e é caracterizado por uma lesão eritematosa acompanhada de queimação, que se desenvolve no

intervalo de 2 a 8 horas (FUTRELL, 1992). Subsequentemente, uma vesícula com conteúdo soro-hemorrágico aparece e evolui para uma extensa área de dermonecrose (SEZERINO et al., 1998).

O loxoscelismo viscerocutâneo ou sistêmico é a forma mais grave do envenenamento e, além da lesão necrótica, os indivíduos podem apresentar febre, icterícia, trombocitopenia, coagulação intravascular, hemólise e falência renal (FUTRELL, 1992). Embora seja menos comum, o loxoscelismo sistêmico é a principal causa de morte associada ao envenenamento por *Loxosceles*. Muitos dos casos graves, relatados em crianças, na América do Sul, estão relacionados às espécies *L. laeta* (FUTRELL, 1992).

O grau de severidade do envenenamento parece estar relacionado a diversos fatores associados, por um lado, às aranhas, como as variações intra- e interespecíficas dos venenos (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) e a quantidade de veneno injetada (BERNSTEIN; EHRlich, 1986), quanto por características do próprio paciente, como idade, constituição genética (BARRETO et al., 1990; NANCE, 1961; TAMBOURGI et al., 1998) e região do corpo aonde ocorreu a picada (FUTRELL, 1992).

Várias intervenções têm sido propostas e testadas para o tratamento do loxoscelismo, no entanto, não existe uma terapia definitiva e ainda há muitas divergências quanto à eficácia das drogas, do antiveneno ou de suas combinações (PAULI et al., 2006). Considerando todas as intervenções avaliadas, o antiveneno específico foi o mais indicado devido ao seu grande potencial quando administrado nas primeiras horas após o envenenamento, durante a fase aguda (FUTRELL, 1992). Contudo, ainda existem divergências quanto à efetividade do soro em neutralizar efeitos locais (dermonecrose) e o período ideal para sua administração (HOGAN; BARBARO; WINKEL, 2004; PAULI et al., 2006).

Assim como os venenos de serpentes e escorpiões, os de aranhas são misturas complexas de substâncias biologicamente ativas e inativas. As atividades dermonecrotica e letal dos venenos de *Loxosceles* foram relacionadas a componentes com peso molecular entre 32 e 35 kDa, com atividade esfingomielinásica e, por isso, denominados como esfingomielinases D (SMases D). As SMases D são capazes de hidrolisar esfingomielina e lisofosfatidilcolina, induzir dermonecrose em coelhos e tornar eritrócitos humanos suscetíveis à lise por complemento (TAMBOURGI et al., 1995, 1998, 2000, 2002, 2005; VAN

MEETEREN et al., 2004). Foi proposto que a suscetibilidade à ação lítica do complemento autólogo esteja relacionada à atividade esfingomielinásica e à ativação de metaloproteases endógenas, responsáveis pela clivagem das glicoforinas presentes na membrana dos eritrócitos, com consequente remoção de ácido siálico, permitindo a deposição de componentes do complemento, principalmente, da via alternativa (TAMBOURGI et al., 1995, 1998, 2000).

Chonn, Cullis e Devine (1991), demonstraram que a carga dos fosfolipídios expostos na superfície celular pode direcionar a ativação do complemento para uma determinada via. A via alternativa é ativada por fosfolipídios carregados positivamente, enquanto a via clássica é ativada por fosfolipídios aniônicos como a fosfatidilserina. Considerando estes dados, Tambourgi et al. (2002, 2007), demonstraram que em eritrócitos humanos tratados com as SMases de *L. intermedia* havia perda da assimetria da membrana, com consequente exposição de fosfatidilserina, permitindo assim a ligação de C1q e ativação da via clássica do complemento. Estas mesmas atividades foram também, posteriormente, confirmadas com SMases D isoladas da glândula de veneno de *L. laeta* (FERNANDES-PEDROSA et al., 2002; SANTI-FERRARA et al., 2009). O efeito da SMase D tem sido bem caracterizado em mamíferos, mas como não tem sido relatado qualquer registro que envolva a alimentação de vertebrados por essas aranhas da Família Sicariidae, acredita-se que esta toxina tenha evoluído primariamente para auxiliar na imobilização das presas (artrópodes) ou na sua pré-digestão e que as funções dermonecroticas ocasionadas em humanos sejam um resultado evolutivo acidental. Partindo desta hipótese, Zobel-Thropp, Kerins e Binford (2012), testaram o efeito da toxina SicTox (SMase D assim denominada pelo grupo) proveniente da aranha *L. arizonica* após injeção em grilos. A resposta dos grilos à injeção de doses paráliticas da toxina putificada foi quase imediata, levando à extensão das pernas dianteiras, elevação das pernas acima e para longe do corpo. Os animais continuavam paralisados na mesma posição com a observação de espasmos ocasionais até morrerem dentro de 24 horas.

1.2 Sistema Complemento

1.2.1 Vias de ativação

Durante a evolução, dois sistemas de imunidade emergiram: a imunidade inata ou natural e a imunidade adquirida. O sistema imune inato é filogeneticamente mais antigo e é encontrado em todos os organismos multicelulares, enquanto a resposta adquirida, que surgiu há cerca de 450 milhões de anos, é encontrada em todos os vertebrados, com exceção dos Agnatha (NONAKA; KIMURA, 2006; ZARKADIS; MASTELLOS; LAMBRIS, 2001). O sistema complemento em vertebrados superiores desempenha um importante papel efetor tanto na imunidade inata quanto na adquirida, além de participar de vários processos imunorregulatórios (ZARKADIS; MASTELLOS; LAMBRIS, 2001).

O sistema complemento de humanos é formado por mais de 30 proteínas que podem ser encontradas no plasma ou ligadas à superfície de células. Este sistema pode reconhecer patógenos e células tumorais, ser ativado e gerar moléculas que participam da resposta inflamatória, da opsonização de partículas, para posterior eliminação por meio da lise celular ou fagocitose e que podem, ainda, estimular linfócitos B e T (CAROLL, 2004; GROS; MILDNER; JANSSEN, 2008). A ativação do complemento pode ocorrer por três vias, ou seja, clássica, alternativa e das lectinas (**FIGURA 2**).

A ativação da via clássica pode ser iniciada pela ligação direta da subunidade C1q do componente C1 à superfície do patógeno. C1q é composto por seis unidades de três cadeias polipeptídicas (A, B e C) e, cada um dos trímeros, possui uma região CLR (*colagen-like region*) na região N-terminal e um domínio gC1q (domínio globular) na região C-terminal. Alguns ligantes, como as moléculas IgM e IgG, complexadas ao antígeno, interagem com o domínio globular de C1q e esse evento representa a ligação-chave entre os mecanismos da imunidade inata e adquirida. Outros ligantes, incluindo a proteína C-reativa (CRP), uma proteína de fase aguda do plasma humano e que se liga a polissacarídeos bacterianos (VOLANAKIS; KAPLAN, 1974), lipoproteínas de baixa densidade oxidadas (oxLDL) e células apoptóticas, interagem com a região CLR de C1q (KISHORE et al., 2004). Roumenina et al. (2008) demonstraram a interação do domínio globular do C1q humano com o lipopolissacarídeo de *Salmonella typhimurium*. A interação de C1q com diferentes ligantes gera uma mudança conformacional nas demais subunidades de C1 (C1r:C1s)₂, levando a ativação da ação autocatalítica de C1r e

este ativado pode agir hidroliticamente sobre C1s. C1s apresenta um sítio catalítico de serinoprotease que o capacita a atuar sobre os componentes C2 e C4, clivando-os, resultando na formação da C3 convertase C4b2a (ARLAUD et al., 2002).

A via das lectinas é ativada pelo reconhecimento de resíduos de carboidratos, presentes em microrganismos, pelas lectinas ligantes de manose (MBL) e ficolinas, que se encontram associadas às serinoproteases, denominadas MASPs (MASP-1, MASP-2 e MASP-3). As MBL e ficolinas apresentam uma estrutura semelhante à de C1q, apresentando os mesmos domínios colágeno-*like* e globular, o que indica origem evolutiva comum (FUJITA; ENDO; NONAKA, 2004). Quando a MBL reconhece motivos de carboidratos presentes em certos microrganismos, ocorre uma ativação das serino proteases associadas à MBL: MASP-1 e MASP-2, sendo que esta última, assim como o componente C1s da via clássica, cliva os componentes C2 e C4, formando a C3 convertase C4b2a. MASP-1 não é capaz de clivar C4 diretamente, somente C2 e C3, sendo que para este último, a hidrólise ocorre em uma razão muito baixa, tornando questionável seu papel essencial em ativar o sistema complemento. No entanto, experimentos utilizando inibidores específicos para MASP-1 demonstraram a não clivagem de C4 mediada por MASP-2 e que a ativação das vias das lectinas era completa e permanentemente bloqueada; o mesmo ocorria quando foram usados inibidores específicos para MASP-2, revelando o papel essencial de ambas serino proteases (DOBÓ et al., 2014).

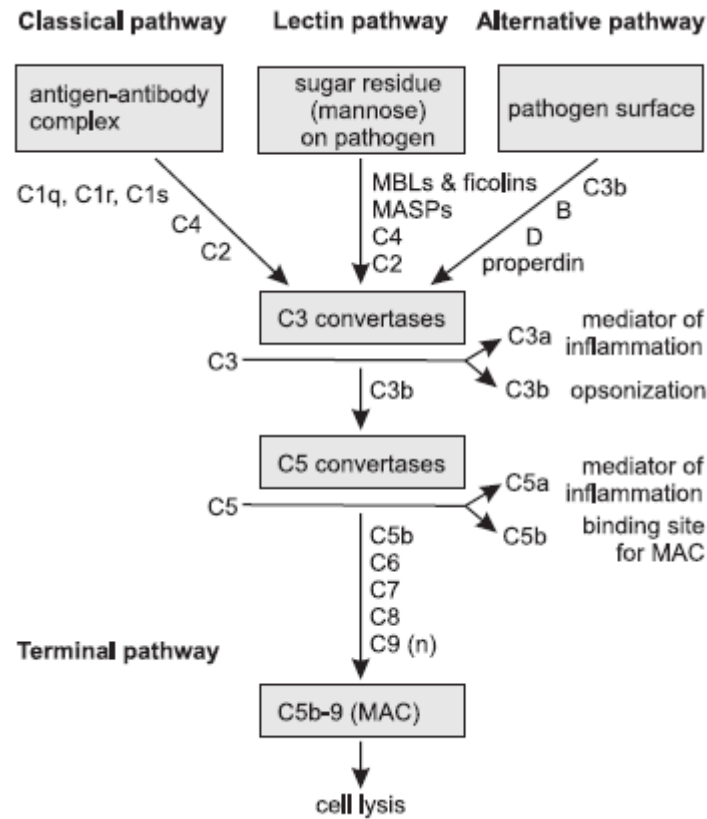
A via alternativa pode ser ativada lentamente por hidrólise espontânea da ligação tioéster, presente nas moléculas de C3 (mecanismo de *tickover*), resultando em um componente C3 modificado (C3H₂O) (BEXBORN et al., 2008) que, por sua vez, pode se ligar ao fator B (componente homólogo ao componente C2 da via clássica e das lectinas), formando o complexo C3(H₂O)B. Nesta condição, o fator B pode ser proteoliticamente ativado por uma serinoprotease, o fator D, originando fragmentos Ba e Bb. O fragmento Ba se dissocia do complexo, enquanto Bb permanece ligado ao C3(H₂O)B, formando a C3 convertase iniciadora da via alternativa C3(H₂O)Bb. O fragmento C3b, assim como C3(H₂O), pode se associar ao fator B e, posteriormente, ser clivado pelo fator D gerando a C3 convertase C3bBb (HOURCADE, 2006). O complexo C3bBb é relativamente instável com uma meia vida de 90 segundos sob condições fisiológicas, mas quando este se associa à properdina (P), sua estabilidade na superfície de patógenos e de imunocomplexos aumenta em pelo menos 10 vezes (FEARON; AUSTEN, 1975).

A ativação de cada uma dessas três vias converge para a formação da C3 convertase que cliva C3, gerando o fragmento C3a, um pequeno peptídeo também conhecido como anafilatoxina, capaz de recrutar células inflamatórias para os sítios de infecção. A clivagem de C3 gera um outro fragmento maior, o C3b, que se liga covalentemente à superfície de patógenos por meio da região tioéster e, dessa forma, opsoniza o microrganismo, promovendo a fagocitose dependente de receptores para C3b presentes em leucócitos (LAMBRIS, 1988; RICKLIN et al., 2010).

Além de opsonizar microrganismos, o C3b pode interagir com muitas outras proteínas como os reguladores do complemento, o que leva à dissociação das convertases, facilitando a sua clivagem pelo fator I. As primeiras duas clivagens geram iC3b, que ao contrário de C3b não se liga ao fator B e não forma convertases, mas pode mediar a fagocitose por meio da ligação a CR1, CR3 e CR4, receptores presentes nos leucócitos. A terceira clivagem libera o fragmento C3c, deixando o fragmento C3dg ligado à superfície. C3dg não induz fagocitose, mas, assim como iC3b, é capaz de estimular células B por meio dos receptores CR2 (GROS; MILDNER; JANSSEN, 2008). O fragmento C3dg pode, ainda, ser clivado pela tripsina (LACHMANN; MÜLLER-EBERHARD, 1968), gerando C3d e C3g. O C3d pode se ligar aos receptores CR2, presentes em linfócitos B e esta interação funciona como um sinal co-estimulatório (*co-signal 1*) para ativação destas células em conjunção com a interação do antígeno ao receptor BCR (DEMPSEY et al., 1996), apresentando, portanto, uma propriedade adjuvante.

Quando C3b se liga à C3 convertase forma outra serinoprotease, a C5 convertase (C4b2a3b, na via clássica e das lectinas, e C3bBb3b, na via alternativa) que cliva moléculas de C5, gerando C5a. C5a é uma potente anafilatoxina, responsável por muitas das reações inflamatórias induzidas pela ativação inicial, por meio da interação com receptores para C5a (C5aR) presentes em células, como por exemplo, endoteliais e mastócitos (HARBOE; MOLLNES, 2008). Há formação também de um fragmento maior, C5b, que se liga aos componentes finais da cascata do complemento (C6-9) formando o complexo de ataque à membrana (MAC), C5b-9, responsável pela lise celular (WALPORT, 2001).

FIGURA 2 - Esquema das três vias de ativação do sistema complemento



Fonte: Dzik, *Acta Biochimica Polonica*, 2010

1.2.2 Aspectos evolutivos do Sistema Complemento

O sistema complemento tem sido extensivamente estudado do ponto de vista evolutivo. Há mais de 30 anos, acreditava-se que o complemento estava presente somente em vertebrados, uma vez que todas as tentativas de identificar elementos deste sistema em invertebrados haviam falhado (NONAKA; KIMURA, 2006). Com o surgimento de técnicas moleculares mais sofisticadas, incluindo-se as análises genômicas e transcriptômicas, foi possível a identificação de genes homólogos a C3 e fator B de mamíferos em invertebrados deuterostômios como o SpC3 (AL SHARIF et al., 1998) e SpFB (SMITH; SHIH; DACHENHAUSEN, 1998) no ouriço-do-mar *Strongylocentrotus purpuratus* e CiC3 (MARINO et al., 2002) e CiFB (YOSHIZAKI et al., 2005) na ascidia *Ciona intestinalis*.

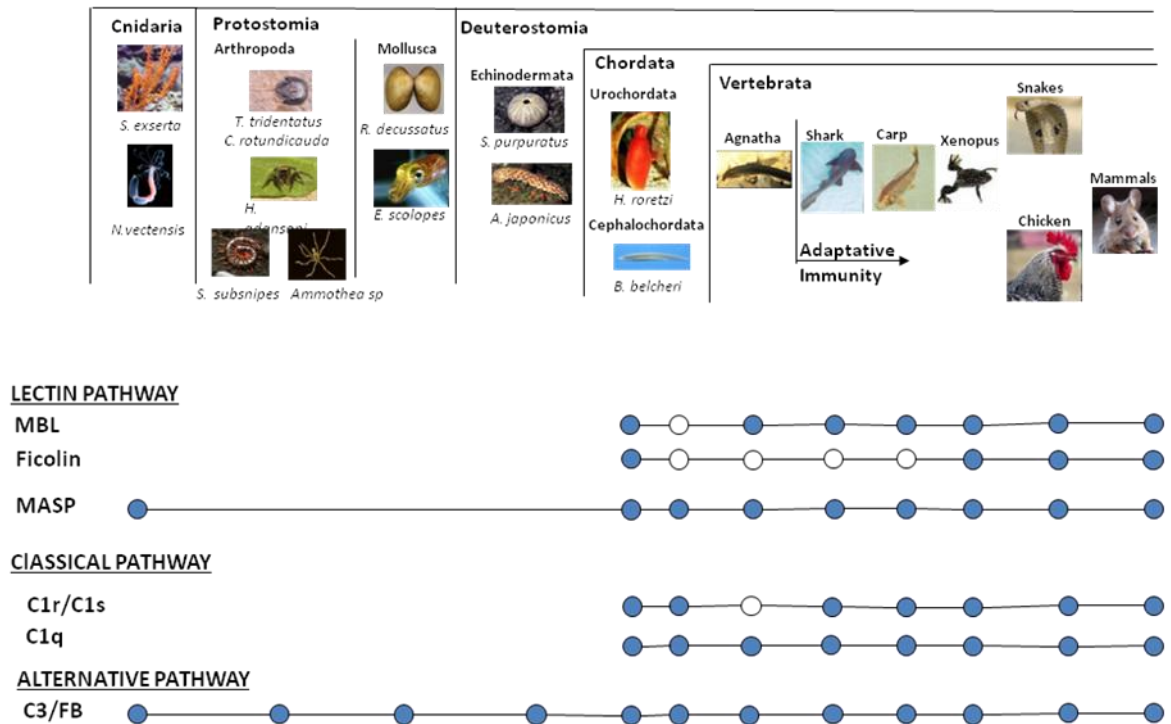
Estudos com *Drosophila melanogaster* (ADAMS et al., 2000) e *Caenorhabditis elegans* (The *C. elegans* sequencing Consortium, 1998) revelaram a ausência desses genes nesses

organismos, sugerindo que o sistema complemento tenha sido estabelecido a partir dos deuterostômios. Contudo, com o isolamento de homólogos funcionais dos componentes C3 e fator B de vertebrados nos límulos *Carcinoscorpius rotundicauda* (CrC3 e CrC2/FB) (ZHU et al., 2005) e *Tachypleus tridentatus* (TtC3) (ARIK et al., 2008), na aranha *Hasarius adansoni* (Had-C3-1 e Had-C3-2) (SEKIGUCHI; FUJITO; NONAKA, 2011), no molusco da Classe Cephalopoda *Euprymna scolopes* (Es-C3) (CASTILLO; GOODSON; MCFALL-NGAI, 2009), no bivalve *Ruditapes decussatus* (Rd-C3 e Rd-FB) (PRADO-ALVAREZ et al., 2009), no coral *Swiftia exserta* (SeC3) (DISHAW; SMITH; BIGGER, 2005) foi possível demonstrar que os componentes centrais do complemento já existiam nos protostômios primitivos, antes mesmo da divergência das linhagens dos protostômios e deuterostômios. Portanto, a ausência de genes relacionados ao sistema complemento em *Drosophila melanogaster* e *C. elegans* pode ser devida a uma perda secundária (NONAKA; KIMURA, 2006).

Como sugerido por Nonaka e Kimura (2006), o sistema complemento teria se originado a partir dos componentes C3 e fator B, os únicos encontrados em cnidários e em alguns protostômios. Estes componentes permitiriam o funcionamento de uma via, semelhante à alternativa dos mamíferos, que se originou a partir de um ancestral comum de Cnidaria e Bilateralia, há mais de um bilhão e 300 milhões de anos. Enquanto os genes C3 e FB foram mantidos nos deuterostômios, estes foram perdidos, muitas vezes e independentemente, na linhagem dos protostômios. Como os genes da MASP, MBL e ficolinas não tinham sido identificados em protostômios e nos equinodermos, foi sugerido que estes componentes teriam sido recrutados para o sistema complemento após a emergência dos Cordados, cerca de 900 milhões de anos atrás. No entanto, Kimura, Sakaguchi e Nonaka (2009), posteriormente, conseguiram identificar genes *MASP-like* na anêmona-do-mar *Nematostela vectensis*, além dos genes que codificam para C3 e FB. Esta descoberta indica que a origem da via das lectinas do sistema complemento possa ser traçada antes da emergência dos cordados, possivelmente antes da divergência dos Cnidaria e Bilateralia na era Pré-Cambriana. Os ágnatos, que são animais desprovidos de mandíbula e os mais primitivos entre os organismos pertencentes ao Subfilo Vertebrata, parecem ter desenvolvido somente as vias alternativa e das lectinas do sistema complemento, provavelmente devido à ausência de imunoglobulinas nesses animais (SUNYER; LAMBRIS, 1998).

Finalmente, os eventos de duplicação gênica que aconteceram entre C3/C4/C5, entre FB/C2 e MASPs/C1r/s, antes da emergência dos peixes cartilaginosos, cerca de 600 milhões de anos atrás, contribuíram para o estabelecimento da terceira via de ativação, a clássica. Esta última via parece ter se estabelecido, simultaneamente, com o aparecimento do sistema imune adquirido, baseado em linfócitos e MHC (NONAKA; KIMURA, 2006). A identificação de proteínas relacionadas ao complemento em organismos filogeneticamente distintos está ilustrada na **FIGURA 3**.

FIGURA 3 - Perspectiva evolutiva para as moléculas de reconhecimento e de serino proteases envolvidas na ativação da cascata do sistema complemento



Circulos abertos e fechados representam a ausência e a presença do componente nas espécies correspondentes, respectivamente.

1.2.3 Componentes FB/C2

O componente C2 participa da formação das C3 convertases das vias clássica e das lectinas, enquanto o fator B é uma serinoprotease equivalente, atuante na via alternativa. Fator B e C2 são muito similares e, possivelmente, divergiram na linhagem dos vertebrados mandibulados sendo, frequentemente, denominados como C2/FB. O ancestral de C2/FB desempenhava, provavelmente, funções tanto de C2 como de FB de mamíferos (ZARKADIS; MASTELLOS; LAMBRIS, 2001).

C2 e fator B são serinoproteases codificadas por *loci* presentes em uma região próxima ao complexo principal de histocompatibilidade, no cromossomo seis em humanos. Estas duas proteínas compartilham cerca de 40% de similaridade. Seus sítios catalíticos, C2a (509 resíduos) e Bb (505 resíduos), apresentam similaridade com as porções catalíticas de outras serinoproteases. Os sítios não catalíticos, C2b (223 resíduos) e Ba (234 resíduos), contêm três motivos de repetição de aproximadamente 60 aminoácidos cada (BENTLEY; CAMPBELL, 1986).

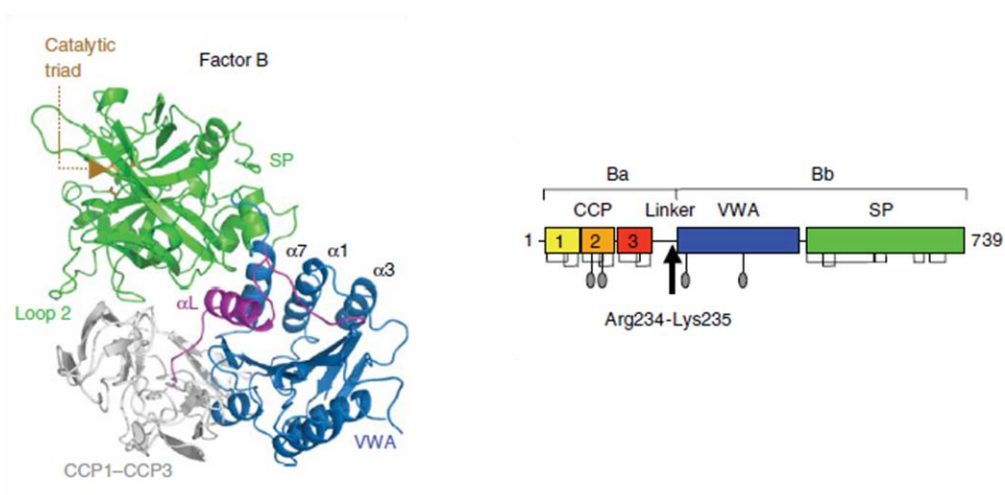
O fator B, em humanos, é uma molécula única contendo cinco domínios: três CCPs (proteínas de controle do complemento) na região N-terminal, que estão conectados ao domínio VWA (fator de *von Willebrand* do tipo A) por um resíduo *linker* (α L) e um domínio serinoprotease na região C-terminal (SP) que apresenta o sítio catalítico (**FIGURA 4**). Os domínios VWA e SP formam o fragmento Bb e os domínios CCP1-3 e o *linker* formam o fragmento Ba. A ligação do fator B ao C3b depende de elementos estruturais do fragmento Ba e de um sítio de adesão dependente do íon Mg^{+2} (MIDAS), encontrado no domínio VWA (MILDER et al., 2007).

Os domínios CCP em componentes do complemento estão envolvidos na interação entre proteínas. As análises da estrutura tridimensional e por microscopia eletrônica dos CCPs indicaram a existência de pequenos domínios globulares e que os “bolsões de ligação” são formados entre dois CCPs. Dentre todos os CCPs presentes no FB humano, o terceiro contém elementos essenciais que proporcionam a interação com o fragmento C3b e o primeiro, aparentemente, é o menos imprescindível, de acordo com as análises de mutação sítio dirigida para esta região (HOURCADE; WAGNER; OGLESBY, 1995).

Genes que codificam para proteínas *FB-like* têm sido caracterizados em diferentes organismos que pertencem à linhagem anterior a dos cordados. Sequências *FB-like* do límulo

C. rotundicauda (CrC2/FB) (ZHU et al., 2005) e do ouriço-do-mar *S. purpuratus* (SpFB) (SMITH et al., 2001) apresentam algumas particularidades, tais como a presença de 5 domínios CCP, ao invés dos 3 domínios encontrados na sequência do FB humano, sugerindo que a presença de domínios CCP adicionais seja uma característica primitiva do gene C2/FB. Em contraste, Kimura et al. (2009) caracterizaram duas isoformas para os genes *FB-like* da anêmona-do-mar *N. vectensis* (Nv-FB-1 e Nv-FB-2), sendo que a primeira é constituída por 3 domínios CCP, enquanto a segunda apresenta dois domínios CCP adicionais como no *FB-like* encontrados em *C. rotundicauda* e *S. purpuratus*. Portanto, o Nv-FB-1 é o primeiro gene *FB-like* identificado em invertebrados que apresenta a mesma composição de domínios presente no FB de vertebrados. Recentemente, algumas sequências *FB-like* dos organismos que pertencem ao Filo Arthropoda foram identificados e todos eles apresentam mais de uma isoforma que variam entre dois a sete CCPs (SEKIGUCHI; NONAKA, 2015). É possível que a presença de somente três domínios CCP, na porção N-terminal, seja um fator ancestral e que esta região, no fator B de invertebrados, tenha sofrido duplicação gênica ou deleção. De qualquer forma, parece provável que genes com os mesmos domínios estruturais, encontrados em límulos e na anêmona-do-mar, sejam ortólogos dos genes FB e C2 dos mamíferos, o que sugere que estes tenham aparecido antes da divergência dos Cnidaria/Bilateria (NONAKA; KIMURA, 2006).

FIGURA 4 - Componente Fator B humano



Representação esquemática da estrutura tridimensional do fator B humano e sua sequência de domínios. Fonte: Milder et al., *Nature Structural & Molecular Biology* 2007.

1.2.4 Componentes C3/C4/C5

Os componentes C3 e C4 humanos possuem estruturas e funções similares. Ambos desempenham papéis análogos nas vias alternativa e clássica da cascata do complemento e são sintetizados como polipeptídeos compostos por uma única cadeia de aproximadamente 185 kDa. O processamento das pró-moléculas é similar e, neste, incluem a remoção do peptídeo sinal, glicosilação e clivagem proteolítica. Seus níveis séricos são mantidos primariamente pelo fígado, mas outros estudos identificaram sítios extrahepáticos relacionados à síntese de proteínas do complemento. Dentre estes sítios, estão incluídos os fagócitos mononucleares, fibroblastos, células mesangiais glomerulares, células mielóides, células epiteliais do pulmão, intestino e rim (MITCHELL et al., 1996).

A similaridade entre as estruturas primárias de C3, C4 e C5 é baixa, no entanto, é significativa quando comparada às do inibidor α -2 macroglobulina (A2M) e do CD109 (SOLOMON et al., 2004). Além disso, os componentes C3 e C4 compartilham uma estrutura única, *i.e.*, uma região tioéster intramolecular, ausente em C5, o que pode ser explicado pela perda secundária de bases que codificam para esta região (NONAKA; KIMURA, 2006). A superfamília que apresenta essa região é chamada de TEP (proteínas que contêm tioéster). A superfamília TEP é subdividida em duas famílias: (1) família C3 que compreende os componentes C3/C4/C5 de vários eumetazoários e a (2) família α -2 Macroglobulina (A2M), composta por α 2M, proteína de zona de gravidez (PZP), CD109, CPDAM8 de humanos e seus ortólogos como também iTEPs presentes em insetos (NONAKA, 2014; SEKIGUCHI et al., 2011).

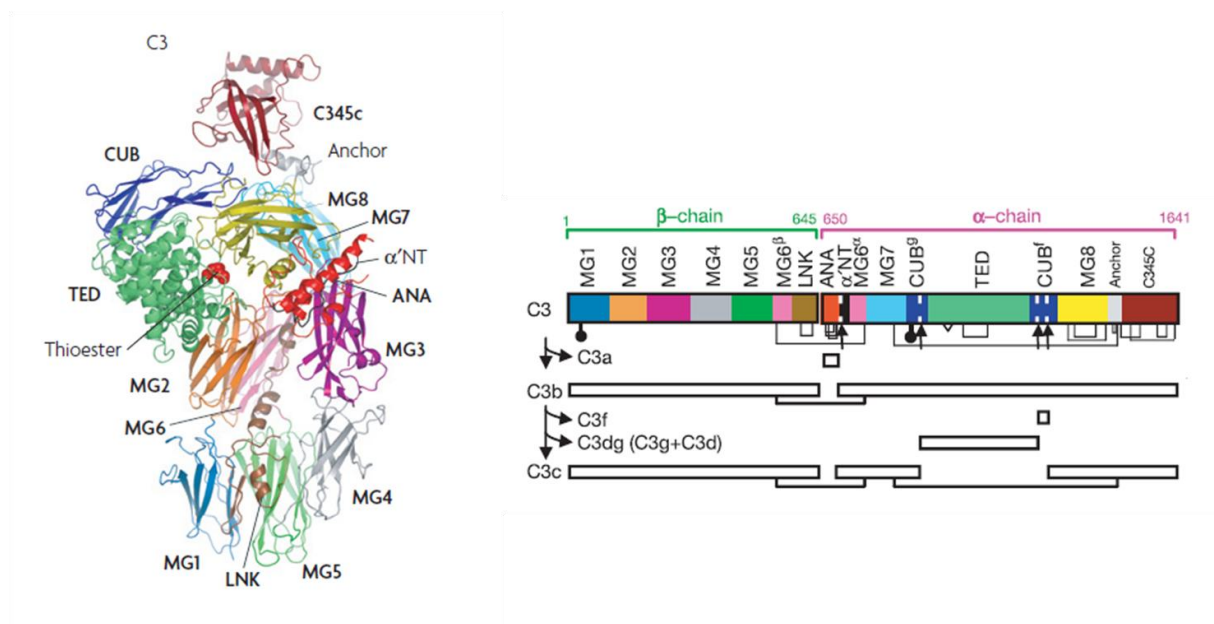
A molécula madura do C3 humano (**FIGURA 5**) é composta por duas cadeias – α (resíduos 1-645) e β (resíduos 650-1641), que juntas formam 13 domínios, isto é, oito domínios macroglobulina (MG1-8), um domínio linker (LNK), um domínio anafilatoxina (ANATO), um domínio CUB, um domínio contendo tioéster (TED) e um domínio C345c. Os membros da família A2M apresentam a mesma estrutura básica de domínios encontrada no componente C3, no entanto, os domínios ANATO e C345c estão ausentes (BAXTER et al., 2007; JANSSEN et al., 2005).

No C3 nativo, o domínio ANATO estabiliza a interface TED-MG8, mas quando este é clivado e o domínio ANATO é removido, ocorrem mudanças conformacionais na estrutura da molécula. Com a remoção do domínio ANATO, há o deslocamento dos domínios MG7 e MG8,

o domínio α -NT assume uma nova posição e os domínios CUB e TED giram em direção à região exterior, expondo a ligação tioéster. Devido a ausência do domínio ANATO, as moléculas TEP1r dos insetos são mais estáveis e, portanto, estão mais estruturalmente relacionadas ao pro-C3 (GROS; MILDER; JANSSEN, 2008).

O componente denominado *Cobra Venom Factor* (CVF), isolado do veneno da serpente *Naja naja kouthia*, é um análogo funcional do C3b humano. Similarmente ao C3b dos mamíferos, o CVF se liga ao fator B que é, então, clivado pelo fator D, resultando no complexo CVFBb, uma eficiente C3 convertase e C5 convertase. Diferente das convertases C3bBb e C4bC2a, CVFBb é um complexo mais estável, já que sua estrutura, um intermediário entre C3b e C3, não é constituída pelo domínio TED e apresenta um domínio CUB numa posição idêntica àquela identificada no C3b (KRISHNAN et al., 2009).

FIGURA 5 - Componente C3 Humano



Representação esquemática da estrutura tridimensional do C3 humano. Sequências de domínios de C3 e seus respectivos produtos de clivagem após ativação do sistema complemento. Fonte: *Janssen et al., Nature 2005*.

Com relação aos genes *C3-like*, que foram recentemente caracterizados em organismos da linhagem dos protostômios como, por exemplo, CrC3 (*C. rotundicauda*), Rd-C3 (*R. decussatus*) e Haad-C3 (*Hasarius adansoni*), e comparando suas sequências de aminoácidos com as do C3 humano, foram encontradas, pelo menos, 4 regiões conservadas: a região de ligação da cadeia α e β , as pontes de dissulfeto formadas entre as cadeias α e β , o resíduo catalítico caracterizado pela presença do aminoácido histidina e, finalmente, o sítio tioéster (NONAKA, 2011; PRADO-ALVAREZ et al., 2009; SEKIGUCHI; FUJITO; NONAKA, 2011; ZHU et al., 2005). Portanto, apesar de algumas diferenças, a presença de domínios conservados sugere que elementos estruturais de C3, essenciais à sua ação, foram mantidos ao longo da evolução. Além disso, foi detectado um domínio de junção das cadeias α e γ composto por quatro aminoácidos RKKR (*R. decussatus*) (PRADO-ALVAREZ et al., 2009), RQKR (*H. adansoni*) (SEKIGUCHI; FUJITO; NONAKA, 2011), RVKR (*C. rotundicauda*) (ZHU et al., 2005) que se alinham próximo à região do motivo RRRR presente no C4 humano, sugerindo que a estrutura das proteínas *C3-like*, de organismos da linhagem dos protostômios, seja composta por 3 cadeias.

1.2.5 Sistema complemento em aranhas *Loxosceles*

Um dos métodos utilizados para o estudo da diversidade molecular e da expressão gênica de uma célula ou tecido específico é a caracterização do transcriptoma, por meio da determinação randômica de sequências expressas (ESTs – *expressed sequence tags*). A análise do transcriptoma da glândula de veneno de *L. laeta* (Araneae, Sicariidae) possibilitou a identificação de sequências similares às de C3 (LLAE0374S – GenBank: EY188746.1) de *Carcinoscorpius rotundicauda* e fator B (LLAE0899S – GenBank: EY189271.1) de *Strongylocentrotus purpurartus* (FERNANDES-PEDROSA et al., 2008). Tal achado abriu portas para que novos estudos fossem conduzidos, com objetivo de caracterizar as sequências gênicas e de aminoácidos desses componentes, o que certamente poderá contribuir para uma melhor compreensão da evolução do complemento e do papel desse sistema na glândula de veneno de *Loxosceles*.

6 CONCLUSÕES

- Este trabalho representa a primeira caracterização de dois genes que compõem o sistema complemento das aranhas *Loxosceles*, Lox-C3 e Lox-FB, similares aos componentes C3 e Fator B de outros organismos;
- Em contraste às proteínas C2/FB que contêm três módulos de CCP, Lox-FB contém somente dois CCPs.
- A maioria das regiões funcionais é conservada em Lox-FB comparado com outras proteínas FB-like, como por exemplo, o sítio MIDAS localizado no domínio vWFA. No entanto, aqueles aminoácidos que compõem a tríade catalítica, presentes no domínio serino protease, aparentemente, foram substituídos por aminoácidos diferentes.
- Na análise filogenética, Lox-FB foi incluído no grupo dos invertebrados, sendo a isoforma 3 do fator B-like da aranha *Hasarius adansoni*, a mais relacionada, com uma identidade de 43%.
- Uma estrutura de três cadeias para o Lox-C3 maduro é prevista, baseada na presença de sítios de clivagem entre as cadeias α e γ , assim como é observado nas proteínas C3-like de invertebrados.
- Todos os domínios funcionais conhecidos no C3 humano como o domínio ANATO e domínio que contém o motivo tioéster encontram-se conservados em Lox-C3.
- A análise filogenética do componente C3 do sistema complemento permitiu inferir que Lox-C3 está localizado dentro do grupo das proteínas existentes em invertebrados e possui uma maior similaridade (53%) com o C3 da aranha *H. adansoni* da Família Salcitrae, cuja função primitiva de opsonização do componente C3 possa, talvez, ter sido mantida nas aranhas *Loxosceles*.
- As análises preditivas com relação à estrutura e filogenia de ambos os componentes, contribuirão para novos estudos direcionados a entender a natureza de Lox-C3 e Lox-FB e investigar como estes interagem entre si e com outros possíveis componentes presentes na glândula de veneno ou na hemolinfa.

REFERÊNCIAS*

ADAMS, M. D.; CELNIKER, S. E.; HOLT, R. A.; EVANUS, C. A.; GOCAYNEJ, D.; AMANATIDES, P. G.; SCHERER, S. E.; LI, P. W.; HOSKINS, R. A.; GALLE, R. F. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. **Science**, v. 287, p. 85-95, 2000

AL-SHARIF, W. Z.; SUNYER, J. O.; LAMBRIS, J. D.; SMITH, L. C. Sea urchin coelomocytes specifically express a homologue of the complement component C3. **Journal of Immunology**, v. 160, p. 2983-2997, 1998

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 3389-3402, 1997

ARIKI, S.; TAKAHARA, S.; SHIBATA, T.; FUKUOKA, T.; OZAKI, A.; ENDO, Y.; FUJITA, T.; KOSHIBA, T.; KAWABATA, S. Factor C acts a lipopolysaccharide-responsive C3 convertase in horseshoe crab complement activation. **Journal of Immunology**, v. 181, p. 7994-8001, 2008

ARLAUD, G. J.; GABORIAUD, C.; THIELENS, N. M.; ROSSI, M. Structural biology of C1. **Biochemical Society Transactions**, v. 30, p. 1001-1006, 2002

AUSUBEL, F. A; **Current protocols in molecular biology**. New York: John Wiley and Sons, 1995. v.2

BARBARO, K. C.; SOUSA, M. V.; MORHY, L.; EICKSTEDT, V. R.; MOTA, I. Compared chemical properties of dermonecrotic and lethal toxins from spiders of the genus *Loxosceles* (Araneae). **Journal of Protein Chemistry**, v. 15, p. 337-343, 1996

BARRETO, O. C.; DE CILLO, D. M.; NONOYAMA, K.; ANTONIO, L. C.; MORENA, P.; CARDOSO, J.L. Methemoglobinemia associated with loxoscelism. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 32, p. 1-5, 1990

BAXTER, R. H. G.; CHANG, C.; CHELLIAH, Y.; BLANDIN, S.; LEVASHINA, E. A.; DEISENHOFER, J. Structural basis for conserved complement factor-like function in the antimalarial protein TEP1. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, p. 11615-11620, 2007

BENTLEY, D. R.; CAMPBELL, R. D. C2 and Factor B: structure and genetics. **Biochemical Society Symposium**, v. 51, p. 7-18, 1986

BERNSTEIN B.; EHRLICH, F. Brown recluse spider bites. **Journal of Emergency Medicine**, v.4, p. 457-462, 1986

BEXBORN, F.; ANDERSSON, P. O.; CHEN, H.; NILSSON, B.; EKDAHL, K. N. The tick-over theory revisited: formation and regulation of the soluble alternative complement C3 convertase (C3(H₂O)Bb). **Molecular Immunology**, v. 45, p. 2370–2379, 2008

* De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002

BORDOLI, L.; KIEFER, F.; ARNOLD, K.; BENKERT, P.; BATTEY, J.; SCHWEDE, T. Protein Structure homology modeling using SWISS-MODEL workspace. **Nature Protocols**, v. 4, p. 1-13.

BÜCHERL, W. Biology and venoms of the most important South American spiders of the genera *Phoneutria*, *Loxosceles*, *Lycosa*, and *Latrodectus*. **American Zoologist**, v. 9, p.157–159, 1969

CAROLL, M. C. The complement system in regulation of adaptive immunity. **Nature Immunology**, v. 5, p. 981-986, 2004

CASTILLO, M. G.; GOODSON, M. S.; MCFALL-NGAI, M. Identification and molecular characterization of a complement C3 molecule in a lophotrochozoan, the Hawaiian bobtail squid *Euprymna scolopes*. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 33, p. 69-76, 2009

CHONN, A.; CULLIS, P. R.; DEVINE, D. V. The role of surface charge in the activation of the classical and alternative pathways of complement by liposomes. **Journal of Immunology**, v. 146, p. 4234-4241, 1991

DEMPSEY, P. W.; ALLISON, M. E.; AKKARAJU, S.; GOODNOW, C. C.; FEARON, D. T. C3d of complement as a molecular adjuvant: Bridging innate and acquired immunity. **Science**, v. 271, p. 348–350, 1996

DISHAW, L. J.; SMITH, S. L.; BIGGER, C. H. Characterization of a C3-like cDNA in a coral: phylogenetic implications. **Immunogenetics**, v. 57, p. 535-548, 2005

DZIK, J. M. The ancestry and cumulative evolution of immune reactions. **Acta Biochimica Polonica**, v. 57, p. 443-466, 2010

DOBÓ, J.; SHROEDER, V.; JENNY, L.; CERVENAK, L.; ZÁVODSZKY, P.; GÁL, P. Multiple roles of complement MASP-1 at the interface of innate immune response and coagulation. **Molecular Immunology**, v. 61, n.2, p.69-78, 2014

DOODS, A. W. Which came first, the lectin/classical pathway or the alternative pathway of complement?. **Immunobiology**, v. 205, p. 340-354, 2002

FEARON, D. T.; AUSTEN, K. F. Properdin: binding to C3b and stabilization of the C3b-dependent C3 convertase. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 142, p. 856–863, 1975

FERNANDES-PEDROSA, M.; JUNQUEIRA DE AZEVEDO, I. L.; GONÇALVES-DE-ANDRADE, R. M.; VAN DER BERG, C. W.; RAMOS, C. R.; LEE HO, P.; TAMBOURGI, D. V. Molecular cloning and expression of a functional dermonecrotic and haemolytic factor from *Loxosceles laeta* venom. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 298, n. 5, p. 638–645, 2002

FERNANDES-PEDROSA, M.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L. M.; GONÇALVES-DE-ANDRADE, R. M.; KOBASHI, L. S.; ALMEIDA, D. D.; LEE HO, P.; TAMBOURGI, D. V. Transcriptome analysis of

Loxosceles laeta (Araneae, Sicariidae) spider venomous gland using expressed sequence tags. **BMC Genomics**, v. 9, n. 279, 2008

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

FUJITA, T.; ENDO, Y.; NONAKA, M. Primitive complement system recognition and activation. **Molecular Immunology**, v. 41, p. 103-111, 2004

FUTRELL, J. Loxoscelism. **The American Journal of the Medical Sciences**, v. 304, p. 261-26, 1992

GADJEVA, M., DODDS. A. W., TANIGUCHI-SIDLE, A., WILLIS, A. C., ISENMAN, D. E, LAW, S. K. A. The covalent Binding Reaction of Complement C3. **Journal of Immunology**, v.161, p. 985-990, 1998

GALIANO, M. E; HALL, M. Datos adicionales sobre el ciclo vital de *Loxosceles laeta* (Nicolet, 1849) (Araneae). **Physis**, v. 32, p. 277-288, 1973

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

GONÇALVES-DE-ANDRADE, R. M.; LOURENÇO, W. R.; TAMBOURGI, D. V. Comparison of the fertility between *Loxosceles intermedia* and *Loxosceles laeta* spiders (Araneae Sicariidae). **Journal of Arachnology**, v. 28, p. 245-247, 2000

GONÇALVES-DE-ANDRADE, R. M.; TAMBOURGI, D. V. First record on *Loxosceles laeta* (Nicolet, 1849) (Araneae, Sicariidae) in the west zone of Sao Paulo City , Sao Paulo, Brazil, and considerations regarding its geographic distribution. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, p. 425-426, 2003

GROS, P.; MILDER, F. J.; JANSSEN, B. J. C. Complement driven by conformational changes. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, p. 48-58, 2008

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999

HARBOE, M.; MOLLNES, T. E. The alternative complement pathway revisited. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 12, p. 1074-1084, 2008

HE, Y.; TANG, B.; ZHANG, S.; LIU, Z.; ZHAO, B.; CHEN, L. Molecular and immunochemical demonstration of a novel member of Bf/C2 homolog in amphioxus *Branchiostoma belcheri*: Implications for involvement of hepatic cecum in acute phase response. **Fish and Shellfish Immunology**, v.24, p. 768-778, 2008

HOLMES, D. S.; QUIGLEY, M. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. **Analytical Biochemistry**, v. 114, p. 193-197, 1981

HOURCADE, D. E.; WAGNER, L. M.; OGLESBY, T. J. Analysis of the short consensus repeats of human complement factor B by site-directed mutagenesis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, p. 19716-19722, 1995

HOURCADE, D. E. The role of properdin in the assembly of the alternative pathway C3 convertase of complement. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, p. 2128-2132, 2006

HOGAN, C. J. H.; BARBARO, K. C.; WINKEL, K. Loxoscelism: Old Obstacles, New Directions. **Annals of Emergency Medicine**, v. 44, p. 608-624, 2004

JANSSEN, B. J. C.; HUIZINGA, E. G.; RAAIJMAKERS, H. C. A.; ROOS, A.; DAHA, M. R.; NILSSON-EKDAHL, K.; NILSSON, B.; GROS, P. Structures of complement component C3 provides insights into the function and evolution of immunity. **Nature**, v. 437, p. 505-511, 2005

KIMURA, A.; SAKAGUCHI, E.; NONAKA, M. Multi-component complement system of Cnidaria: C3, Bf, and MASP genes expressed in the endodermal tissues of a sea anemone, *Nematostela vectensis*. **Immunobiology**, v. 214, p. 165-178, 2009

KRISHNAN, V.; PONNURAJ, K.; XU, Y.; MACON, K.; VOLANAKIS, J. E.; NARAYANA, S. V. L. The crystal structure of cobra venom factor, a cofactor for C3 and C5 convertase CVFBb. **Structure**, v. 17, p. 611-619, 2009

KISHORE, U.; GHAI, R.; GREENHOUH, T. J.; SHRIVE, A. K.; BONIFATI, D. M.; GADJEVA, M. G.; WATERS, P.; KOJOUHAROVA, M. S.; CHAKRABORTY, T.; AGRAWAL, A. Structural and functional anatomy of the globular domain of complement protein C1q. **Immunology Letters**, v. 95, p. 113-128, 2004

LACHMANN, P. J.; MIILLER-EBERHARD, H. J. The demonstration in human serum of "conglutinin activating factor" and its effect on the third component of complement. **Journal of Immunology**, v. 100, p. 691-698, 1968

LAMBRIS, J. D. The multifunctional role of C3, the third component of complement. **Immunology Today**, v. 9, p. 387-393, 1988

LE SAUX, A.; NG, P. M.; KOH, J. J.; LOW, D. H.; LEONG, G.; HO, B.; DING, J. L. The macromolecular assembly of pathogen-recognition receptors is impelled by serine proteases, via their complement control protein modules. **Journal of Molecular Biology**, v. 377, p. 902-913, 2008

LOKER, E.; Macroevolutionary immunology: a role for immunity in the diversification of animal life. **Frontiers in Immunology**, v. 3, p.1-21, 2012

LOWRIE, D. C. Starvation longevity of *Loxosceles laeta* (Nicolet) (Araneae). **Entomological News**, v. 91, p. 130-132, 1980

MARINO, R.; KIMURA, Y.; DE SANTIS, R.; LAMBRIS, J. D.; PINTO, M. R. Complement in urochordates: cloning and characterization of two C3-like genes in the ascidian *Ciona intestinalis*. **Immunogenetics**, v. 53, p. 1055-1064, 2002

MARQUES-DA-SILVA, E.; FICHER, M. L. Distribuição das espécies do gênero *Loxosceles* Heineken & Lowe, 1835 (Araneae; Sicariidae) no Estado do Paraná. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, p. 331-335, 2005

MILDER, F. J.; GOMES, L.; SCHOUTEN, A.; JANSSEN, B. J. C.; HUIZINGA, E. G.; ROMIJIN, R. A.; HEMRIKA, W.; ROOS, A.; DAHA, M. R.; GROS, P. Factor B structure provides insights into activation of the central protease of the complement system. **Nature Structural and Molecular Biology**, v. 14, p. 224-228, 2007

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Acidentes por animais peçonhentos**. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb>, 2015

MITCHELL, T. J.; NAUGHTON, M.; NORSWORTHY, P.; DAVIES, K. A.; WALPORT, M. J.; MORLEY, B. J. IFN-gamma up-regulates expression of the complement components C3 e C4 by stabilization of mRNA. **Journal of Immunology**, v. 156, p. 4429-4434, 1996

NANCE, W. E. Hemolytic anemia of necrotic arachnidism. **The American Journal of Medicine**, v. 31, p. 801-7, 1961

NONAKA, M.; TAKAHASHI, M. Complete complementary DNA sequence of the third complement of lamprey. Implication for the evolution of thioester containing-proteins. **Journal of Immunology**, v. 148, p. 3290-3295, 1992

NONAKA, M.; TAKAHASHI, M.; SASAKI, M. Molecular cloning of a lamprey homologue of the mammalian MHC class III gene, complement factor B. **Journal of Immunology**, v. 152, p. 2263-2269, 1994

NONAKA, M.; AZUMI, K. Opsonic complement system of the solitary ascidian, *Halocynthia roretzi*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 23, p. 421-427, 1999

NONAKA, M.; KIMURA, A. Genomic view of the evolution of the complement system. **Immunogenetics**, v. 58, p. 701-713, 2006

NONAKA, M. The complement C3 protein family in invertebrates. **Invertebrate Survival Journal**, v. 8, p. 21-32, 2011

NONAKA, M. Evolution of the Complement System. **Subcell Biochemistry**, v. 80, p. 31-43, 2014

OLIVEIRA, K. C.; GONÇALVES-DE-ANDRADE, R. M.; GIUSTI, A. L.; DIAS DA SILVA, W.; 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, J. M. C.; VAN DER 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

PAGE, M. J.; CERA, E. D. Serine peptidases: Classification, structure and function. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, p. 1220-1236, 2008

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

PRADO-ALVAREZ, M.; ROTLANT J.; GESTAL, C.; NOVOA, B.; FIGUERAS A. Characterization of an C3 and a factor B-like in the carpet-shell clam, *Ruditapes decussates*. **Fish Shellfish Immunology**, v. 26, p. 305-315, 2009

PRETEL, F.; GONÇALVES-DE-ANDRADE, R. M.; MAGNOLI, F. C.; DA SILVA, M. E.; FERREIRA, J. M.; 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. 449-58, 2005

RICKLIN, D.; HAJISHENGALLIS, G.; YANG, K.; LAMBRIS, J. D. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. **Nature Immunology**, v. 11, p. 785-797, 2010

ROUMENINA, L. T.; POPOV, K. T.; BUREEVA, S. V.; KOJOUHAROVA, M.; GADJEVA, M.; RABHERU, S.; THAKRAR, R.; KAPLUN, A.; KISHORE, U. Interaction of the globular domain of human C1q with *Salmonella typhimurium* lipopolysaccharide. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1784, p. 1271-1276, 2008

SANTI-FERRARA, G. I.; FERNANDES-PEDROSA, M.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I.; GONÇALVES-DE-ANDRADE, R. M.; PORTARO, F. C. V.; MANZONI-DE-ALMEIDA, D.; MURAKAMI, M. T.; ARNI, R. K.; VAN DER BERG, C. W.; LEE HO, P.; TAMBOURGI, D. V. SMase II, a new sphingomyelinase D from *Loxosceles laeta* venom gland: Molecular cloning, expression, function and structural analysis. **Toxicon**, v. 53, p. 743-753, 2009

SEKIGUCHI, R.; FUJITO, N.; NONAKA, M. Evolution of the thioester-containing proteins (TEPs) of the arthropoda, revealed by molecular cloning of TEPs genes from a spider, *Hasarius adansoni*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 36, p. 483-489, 2012

SEKIGUCHI, R.; NONAKA, M. Evolution of the complement system in protostomes revealed by de novo transcriptome analysis of six species of Arthropoda. **Developmental and Comparative Immunology**, v.50. p. 58-67, 2015

SEZERINO, U. M.; ZANNIN, M.; COELHO, L. K.; GONÇALVES, J.; GRANDO, M.; MATTOSINHO, S. G.; CARDOSO, J. L. C.; EICKSTEDT, V. R.; FRANÇA, F. O. S.; BARBARO, K. C.; FAN, H. W. A clinical and epidemiological study of *Loxosceles* spider envenoming in Santa Catarina, Brazil. **Transactions of Royal Society of Tropical Medicine Hygiene**, v. 92, p. 546–548, 1998

SILVEIRA, A. L. Primeiro registro sinantrópico de *Loxosceles laeta* (Nicolet, 1849) (Aranae, Sicariidae) no município do Rio de Janeiro, estado do Rio de Janeiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, p. 723-726, 2009

SMITH, L. C.; SHIH, C.; DACHENHAUSEN, S. G. Coelomocytes express SpBf, a homologue of factor B, the second component in the sea urchin complement system. **Journal of Immunology**, v. 161, p. 6784-6793, 1998

SOLOMON, K. R.; SHARMA, P.; CHAN, M.; MORRISON, P. T.; FINBERG, R. W. CD109 represents a novel branch of the alpha2-macroglobulin complement gene family. **Gene**, v. 327, p. 171-183, 2004

SUNYER, J. O.; LAMBRIS, J. D. Evolution and diversity of the complement system of poikilothermic vertebrates. **Immunological Reviews**, v. 27, p. 549-564, 1998

SWANSON, D. V.; VETTER, R. S. Loxoscelism. **Clinics in Dermatology**, v. 24, p. 213-221, 2006

TAGAWA, K.; YOSHIHARA, T.; SHIBATA, T.; KITAZAKI, K.; ENDO, Y.; FUJITA, T.; KOSHIBA, T.; KAWABATA, S. Microbe-specific C3b deposition in the horseshoe crab complement system in a C2/Factor B-dependent or -independent manner. **Plos one**, v. 7, e36873, 2012

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

TAMBOURGI, D. V.; MAGNOLI, F. C.; VAN DER BERG, C. W.; MORGAN, B. P.; DE ARAUJO, 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. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 251, p. 366-373, 1998

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 erythrocyte surface and facilitating complement-mediated lysis. **Blood**, v. 95, p. 683-691, 2000

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

TAMBOURGI, D. V.; PAIXÃO-CALVACANTE, D.; GONÇALVES-DE-ANDRADE, R. M.; FERNANDES-PEDROSA, M.; MAGNOLI, F. C.; MORGAN, B. P.; VAN DER BERG, C. W. *Loxosceles* sphingomyelinase induces complement-dependent dermonecrosis, neutrophil infiltration, and endogenous gelatinase expression. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 124, p. 725-731, 2005

TAMBOURGI, D. V.; FERNANDES-PEDROSA, M.; GONÇALVES-DE-ANDRADE R. M.; BILLINGTON, S. J.; GRIFFITHS, M.; VAN DER BERG, C. W. Sphingomyelinases D induce direct association of C1q to the erythrocyte membrane causing complement mediated autologous haemolysis. **Molecular Immunology**, v. 44, p. 576-582, 2007

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v.30, p. 2725-2729, 2013

The *C. elegans* Sequencing Consortium. Genome Sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. **Science**, v. 282, p. 2012-2018, 1998

VAN MEETEREN, L. A.; FREDERIKS, F.; GIEPMANS, B. N.; FERNANDES-PEDROSA, M.; BILLINGTON, S. J.; JOST, B.H.; TAMBOURGI, D. V.; MOOLENAAR, W. H. Spider and bacterial sphingomyelinases D target cellular lysophosphatidic acid receptors by hydrolyzing lysophosphatidylcholine. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 10833-10836, 2004

VOLANAKIS, J. E.; KAPLAN, M. H. Interaction of C-reactive protein complexes with the complement system. II. Consumption of the guinea pig complement by CRP complexes: requirement for human C1q. **Journal of Immunology**, v. 113, p. 9-17, 1974

WALPORT, M. J. Complement. First of two parts. **The New England Journal of Medicine**, v. 344, p. 1058–1066, 2001

YOSHIZAKI, F. Y.; IKAWA, S.; SATAKE, M.; SATOH, N.; NONAKA, M. Structure and the evolutionary implication of the triplicated complement factor B genes of a urochordate ascidian, *Ciona intestinalis*. **Immunogenetics**, v. 56, p. 930-942, 2005

ZARKADIS, I. K.; MASTELLOS, D.; LAMBRIS, J. Phylogenetic aspects of the complement system. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 25, p. 745-762, 2001

ZHONG, L.; ZHANG, F.; CHANG, Y. Gene cloning and function analysis of complement B factor -2 of *Apostichopus japonicus*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 33, p. 504-513, 2012

ZHU, Y.; THANGAMANI, S.; HO, B.; DING, L.D. The ancient origin of the complement system. **The EMBO Journal**, v. 24, p. 382-394, 2005

ZOBEL-THROPP, P., KERINS, A. E., BINFORD, G. J., Sphingomyelinase D in sicariid spider venom is a potent insecticidal toxin. **Toxicon**, v. 60, p.265-271, 2012