

MARA ADRIANA CORRÊA

**MECANISMOS DE AÇÃO DE METALOPROTEASES
ENDÓGENAS NA INJÚRIA DE QUERATINÓCITOS
HUMANOS INDUZIDA PELO VENENO DE
Loxosceles laeta E A SMASE I**

Dissertação apresentada ao Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Imunologia

Orientadora: Profa. Dra. Denise Vilarinho Tambourgi

São Paulo

2009

RESUMO

CORRÊA, M. A. **Mecanismos de ação de metaloproteases endógenas na injúria de queratinócitos humanos induzida pelo veneno de *Loxosceles laeta* e a SMase I.** 2009. 88 f. Tese de Mestrado (Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

O envenenamento por aranhas *Loxosceles* é caracterizado pelo desenvolvimento de dermonecrose. As esfingomielinases D (SMases D) são consideradas os principais componentes tóxicos presentes no veneno da aranha *Loxosceles*. A expressão de metaloproteases induzidas pelas esfingomielinases do veneno pode estar envolvida na gênese do loxoscelismo cutâneo. Os resultados obtidos mostraram que o veneno de *Loxosceles laeta* e a proteína recombinante SMase I foram capazes de induzir a expressão de metaloproteases (MMP-2, MMP-7 e MMP-9); diminuir a expressão de alguns marcadores de superfície e causar morte celular. A indução da expressão de MMP-7, como produto da ação do veneno e da SMase I de *L. laeta*, não foi reportada em outras espécies do gênero. O uso de inibidores de metaloproteases, como a tetraciclina, impediu a morte celular e reduziu a expressão de MMPs; já a galardina, um composto que inibe metaloproteases da família das adamolisinas e das MMPs, evitou a clivagem dos marcadores MCP, β 2-microglobulina, MHCI, EPCR na superfície dos queratinócitos humanos tratados. Os resultados revelam que a inibição das metaloproteases de matriz extracelular e da família das adamolisinas pode ser uma alternativa eficaz no tratamento do loxoscelismo cutâneo.

Palavras-chave: *Loxosceles laeta*. Esfingomielinases. Queratinócitos. Metaloproteases. Inibidores.

ABSTRACT

CORRÊA, M. A. **Action mechanisms of endogenous metalloproteinases in human keratinocytes injury induced by *Loxosceles laeta* spider venom and SMase I.** 2009. 88 p. Mastercourse Thesis (Immunology) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

The envenomation by *Loxosceles* spider is characterized by the development of dermonecrosis. Sphingomyelinases D (SMases D) are considered the main toxic component present in *Loxosceles* spider venom. Metalloproteinases expression, induced by venom sphingomyelinases, may be involved in cutaneous loxoscelism. The results showed that *Loxosceles laeta* venom and the recombinant protein SMase I were able to: induce the expression of matrix metalloproteinases (MMP-2, MMP-7 e MMP-9); reduce the expression of some surface markers and cause cell death. The induction of MMP-7, as a product of venom and SMase I action, has not been reported for other genus species. The use of metalloproteinase inhibitors, such as tetracycline, prevented cell death and reduced MMPs expression. Galardin, a compound that inhibits metalloproteinases from the adamalysins family and MMPs, avoided the cleavage of MCP, β 2-microglobulin, MHCI and EPCR on the surface of the treated human keratinocytes. These data indicate that inhibition of metalloproteinases can be an effective alternative on the cutaneous loxoscelism treatment.

Keywords: *Loxosceles laeta*. Sphingomyelinases. Keratinocytes. Metalloproteinases. Inhibitors.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Biologia de aranhas do gênero *Loxosceles*

Os Aracnídeos são quase que exclusivamente animais terrestres, compreendendo mais de 98% das espécies atuais dos quelicerados. Não possuem segmentos no abdômen sendo este conectado ao cefalotórax por um estreito pedicelo. As aranhas possuem quelíceras providas de glândulas de venenos que auxiliam na caça (exclusivas entre os aracnídeos). A alimentação está voltada a pequenos artrópodes (BARNES et al., 1995). No Brasil são encontrados três gêneros de importância médica: *Phoneutria* sp, *Loxosceles* sp e *Latrodectus* sp.

O gênero *Loxosceles* pertence à família Sicariidae (Araneomorphae). As aranhas *Loxosceles* medem de 1 a 1,5 cm de corpo e 3 a 4 cm de envergadura apresentando um desenho característico no cefalotórax que se assemelha a um violino ou estrela (FUTRELL, 1992). Este gênero é cosmopolita e possui mais de cem espécies. Destas, vinte são endêmicas da África, cinquenta da América do Norte e Central e trinta da América do Sul. No Brasil, são descritas dez espécies de *Loxosceles* (PLATNICK, 2009). As principais espécies causadoras de acidentes são: *L. intermedia*, predominante nas áreas urbanas do Paraná e Santa Catarina; *L. laeta*, ocorrendo em focos isolados em várias regiões do país, principalmente no Estado de Santa Catarina; e *L. gaucho*, predominante no Estado de São Paulo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001; TAVARES, 2004).

Em geral, as aranhas *Loxosceles* possuem hábito noturno. No ambiente natural são encontradas sobre rochas, fendas ou em tocas de outros animais construindo teias de seda em seu retiro. No ambiente antrópico, são encontradas algumas vezes atrás da mobília, em porões, sótão, armários de madeira e materiais de construção (GONÇALVES-DE-ANDRADE et al., 2003; FISHER et al., 2005; SWANSON e VETTER, 2006).

Dentre as espécies presentes na América do Sul, a *Loxosceles laeta* (Figura 1) é possivelmente a mais tóxica. Apresenta ampla distribuição geográfica por ser resistente a ausência de água e comida. Esta característica contribui para a sobrevivência desta aranha quando transportada para lugares distantes (LOWRIE, 1980; GONÇALVES-DE-ANDRADE et al., 2003).



macho



fêmea

Figura 1- Aranhas *Loxosceles laeta*, uma das espécies de importância médica no Brasil. Fotos gentilmente cedidas por Rogério Bertani – Instituto Butantan.

1.2 Loxoscelismo

No território brasileiro, *Loxosceles gaucho*, *Loxosceles intermedia* e *Loxosceles laeta* são considerados os principais agentes etiológicos do loxoscelismo. Este termo foi usado pela primeira vez nos Estados Unidos para descrever lesões e manifestações clínicas causadas pelas picadas de *Loxosceles* (CAVENESE, 1872). Atualmente, é reconhecida como uma das formas mais severas de araneísmo necrótico, sendo um problema de saúde pública em alguns países da América do Sul (PAULI et al., 2006).

O loxoscelismo representou 38% dos casos de acidentes com aranhas diagnosticados em 2008 e notificados ao Ministério da Saúde, notadamente na região sul do país. Apesar dos inúmeros acidentes causados, as aranhas do gênero *Loxosceles* não são agressivas e utilizam o veneno para capturar suas presas ou como um mecanismo de defesa. A picada, na maioria das vezes, ocorre em ambiente intradomiciliar em ocasiões onde a aranha é comprimida contra o corpo do indivíduo, tais como no ato de vestir ou dormir. Tal aracnídeo elimina pela picada, apenas alguns microlitros de um potente veneno, contendo não mais que 30 µg de proteína (TAMBOURGI et al., 2000).

De acordo com a literatura, a maioria dos casos de loxoscelismo (entre 84 a 97%) caracteriza-se por um quadro de necrose no local da picada, sendo este denominado forma

cutânea. Entretanto, alguns casos (de 3 a 16%) podem evoluir para a forma sistêmica ou visceral, na qual hemólise e coagulação intravascular podem ocorrer (FUTREL, 1992; BEY, 1997).

Segundo estudos clínicos, os acidentados com aranhas do gênero *Loxosceles* apresentam sintomas que se iniciam algumas horas após a picada e aumentam no período de 24-72 horas. Esses pacientes apresentam, principalmente, dor no local da picada, edema com endurecimento, eritema, equimose e isquemia, podendo ou não evoluir para necrose tecidual e úlcera. Nos casos que evoluem para a forma sistêmica, os pacientes podem apresentar hemólise, coagulação intravascular, trombocitopenia, hematúria, hemaglobinúria, choque e falência renal aguda. E ainda, em aproximadamente 50% dos pacientes com loxoscelismo cutâneo e em grande parte daqueles com loxoscelismo sistêmico, foram observados sintomas como náuseas, vômitos, diarreia, sudorese, prurido, visão turva, febre, irritabilidade e distúrbios de consciência (FUTREL, 1992; PAULI et al., 2006).

O envenenamento por *Loxosceles* caracteriza-se principalmente pelo desenvolvimento de dermonecrose (FUTRELL, 1992). A lesão inicia-se com o aparecimento de edema, nas primeiras 3 horas após o acidente, progride para níveis máximos em 24 horas com hemorragia cutânea e a seguir para uma lesão necrosada (Figura 2). O sistema complemento e o acúmulo de polimorfonucleares (PMN) no local são necessários para a formação da lesão, uma vez que esta não foi observada em coelhos descomplementados pelo tratamento com *cobra venom factor*, animais com leucopenia induzida ou animais C6-deficientes (SMITH e MICKS, 1970; TAMBOURGI et al., 2005).

Alterações teciduais foram observadas em coelhos inoculados subcutaneamente com veneno de *Loxosceles*, que incluíam edema, espessamento do endotélio e degeneração das paredes dos vasos sanguíneos, compilação de células inflamatórias, vasodilatação, coagulação intravascular, hemorragia subcutânea e intradérmica. O acúmulo de leucócitos PMN estava bem pronunciado e, a formação de abscesso e necrose ocorreu no período de 3 a 5 dias. Ao redor das vênulas pode ser observado o acúmulo de leucócitos e eritrócitos 3 horas após o envenenamento, sugerindo perda de integridade vascular contribuindo para o quadro dermonecrótico (FUTRELL, 1992).



Figura 2- Loxoscelismo cutâneo: lesão dermonecrotica.

1.3 Caracterização do veneno de *Loxosceles*

Tambourgi et al. (1995 e 1998a) isolaram e caracterizaram os componentes tóxicos do veneno de *L. intermedia*. Duas proteínas altamente homólogas com peso molecular de 35 kDa (F35) foram purificadas por meio de cromatografia de fase reversa e apresentaram atividade esfingomielinásica, sendo denominadas P1 e P2. Experimentalmente, tais toxinas, assim como o veneno, induziram dermonecrose em animais e tornaram eritrócitos humanos susceptíveis à lise mediada pelo complemento, como analisado em experimentos *in vitro*; em camundongos, induziram hemólise intravascular, configurando um quadro clínico de intensa gravidade (TAMBOURGI et al., 1998b). A atividade esfingomielinásica dessas enzimas pode ser inibida por EDTA, sugerindo que a ação de P1 e P2 seja dependente de íons (TAMBOURGI et al., 1998a). Posteriormente, os genes codificantes para esfingomielinases D (SMase D) foram clonados a partir do RNAm extraído das glândulas de venenos das aranhas *L. laeta* e *L. intermedia*, sendo as proteínas recombinantes capazes de reproduzir os efeitos locais e sistêmicos (FERNANDES-PEDROSA et al., 2002; TAMBOURGI et al., 2004).

Vários estudos descrevem que o veneno loxoscélico é rico em proteases, hidrolases, lipases, peptidases, collagenases, fosfatase alcalina, 5-ribonucleotidase, fosfohidrolases e outros componentes (FUTRELL, 1992; DA SILVEIRA et al., 2002; CARDOSO et al., 2003). Segundo Futrell (1992) a hialuronidase é, provavelmente, um dos fatores responsáveis pela difusão do veneno fazendo com que a reação dermonecrotica “escorra” pela pele em sentido gravitacional.

Por outro lado, a autora descreve que a esfingomielinase D é considerada, uma das frações do veneno mais importantes para o estabelecimento da lesão dermonecrótica, por interagir com a membrana celular e desencadear reações envolvendo componentes do sistema complemento, migração de polimorfonucleares, plaquetas e células endoteliais.

De acordo com Oliveira et al. (1999 e 2005), diferenças intraespecíficas e interespecíficas dos venenos de *Loxosceles* podem colaborar para a gravidade do envenenamento. O veneno das fêmeas apresenta maior concentração de SMase D e tal característica foi também associada à grande produção de veneno (a fêmea é maior do que o macho) o que pode contribuir para a severidade do envenenamento.

Fernandes Pedrosa et al. (2002) clonaram esfingomielinases D do veneno de *L. laeta*. Três clones (H10, H13 e H17) apresentaram similaridade com as SMases do veneno de *L. intermedia*. A proteína recombinante H17 apresentou 59% de similaridade com as esfingomielinases P1 e P2 de *L. intermedia* (TAMBOURGI et al., 2004). Ensaios de determinação da atividade esfingomielinásica revelaram que a toxina recombinante H17 era capaz de hidrolisar o substrato esfingomielina, de forma dose dependente, e com a mesma intensidade promovida pelo veneno total de *L. laeta*. A toxina recombinante expressa pelo clone H17 de *L. laeta* foi denominada “SMase I”. Esta apresentou todas as atividades tóxicas (atividade dermonecrótica, capacidade de induzir hemólise dependente de complemento e de hidrolisar esfingomielina) descritas para o veneno total (FERNANDES PEDROSA et al., 2002) e em maior intensidade do que a SMase II expressa pelo clone H10 (DE SANTI-FERRARA et al., 2009).

Fernandes Pedrosa et al. (2008) descreveram o repertório de transcritos expressos nas glândulas de veneno de *L. laeta*, por meio da análise de ESTs (*Express Sequences Tags*) presentes na biblioteca de cDNA. Aproximadamente, 16,4% do total de ESTs correspondiam a sequências de toxinas já conhecidas e, nesta categoria, as SMases D foram os transcritos mais abundantes. Do total de ESTs, 14,5% foram incluídas na classe de “possíveis toxinas”, cujos transcritos correspondiam a metaloproteases, serinoproteases, hialuronidases, lipases, lectinas, cisteíno-peptidases e inibidores. Cerca de 33% do total de ESTs foram colocadas na classe de “transcritos celulares”, sendo a maior parte destes representada por moléculas envolvidas na expressão de genes e proteínas, evidenciando, assim, a especialização desse tecido na síntese protéica.

Em recente estudo, Almeida et al. (2008) mostraram que o soro anti-esfingomielinas D (produzido em cavalos contra as SMases P1, P2 e SMase I) foi capaz de neutralizar *in vivo* e de forma eficaz os venenos de *L. intermedia* e *L. laeta*, quando comparado com o soro anti-aracnídico, usado no tratamento do loxoscelismo humano. Os autores sugerem que SMases D recombinantes possam substituir o veneno, nas imunizações dos cavalos para a produção dos soros, e que isto seria uma alternativa para regiões em que se conhecem as espécies predominantes de *Loxosceles*.

1.4 Epiderme

A epiderme é a camada mais superficial da pele sendo a primeira linha de defesa contra o ambiente externo. Os queratinócitos apresentam-se como o tipo celular predominante na pele de humanos (BIKLE et al., 2001; DRANSFIELD et al., 2001). Estas células possuem um papel fundamental na resolução de lesões, não só pela capacidade de proliferar e migrar, o que promove reparo do local, como também, por produzirem vários mediadores, tais como citocinas (IL-1, IL-10, IL-15, IL-17, IL-18, IL-20), quimiocinas (RANTES, TARC, MIP-3a), fatores de crescimento (GM-CSF) (STEINHOFF et al., 2001), neuropeptídeos (SLOMINSKI et al., 2000) e MMPs (PIVARCSI et al., 2004; GABRILOVAC et al., 2004). As células de Langerhans participam da resposta imune da pele; estas atuam como células apresentadoras de antígenos profissionais e migram para os linfonodos na presença de citocinas e fatores de crescimento liberados pelos queratinócitos. Tais mediadores solúveis também favorecem o crescimento e a diferenciação das células vizinhas. As quimiocinas liberadas auxiliam o acúmulo de linfócitos T e granulócitos no sítio inflamatório (UCHI et al., 2000). Os queratinócitos são ainda capazes de regular positivamente moléculas de membranas, necessárias para a interação célula-célula, como CD11a e CD11c (HUNYADI et al., 1992), CD14 (HUNYADI et al., 1993), CD36 (HUNYADI et al., 1986), CD54 (HUNYADI et al., 1992) e CD68 (HUNYADI et al., 1993).

Os queratinócitos expressam, em sua superfície e de forma constitutiva, ectopeptidases tais como a *dipeptidyl peptidase IV* (DP IV, CD26) e a *membrane alanyl aminopeptidase* (mAAP; CD13) que estão relacionadas com a proliferação e diferenciação celular (REINHOLD et al., 1998; GABRILOVAC et al., 2004; THIELITZ et al., 2004).

1.5 Metaloproteases

As metaloproteases são endopeptidases que contêm zinco (prefixo *metallo*) no sítio ativo. Estas endopeptidases são divididas de acordo com a proximidade evolutiva e a estrutura do domínio catalítico. A família Metzincinas de metaloproteases é caracterizada por três histidinas ligadas a um motivo de zinco e uma metionina conservada próxima ao sítio ativo. Os membros da família Metzincinas são as Reprolisinas ou ADAMs (*A Disintegrin And Metalloproteinase*), Serralisinas, Astacinas e Matrixinas (metaloproteases de matriz extracelular, MMPs) (BODE et al., 1993; RA e PARKS, 2007).

As MMPs podem apresentar-se ancoradas na superfície da célula ou serem secretadas na forma de zimógenos (RA e PARKS, 2007). Segundo Massova et al. (1998), as MMPs são capazes de clivar um ou vários componentes da matriz extracelular. A maioria das MMPs apresenta em sua estrutura domínios bem distintos e conservados: um pró-peptídeo aminoterminal, um domínio catalítico e um domínio carboxiterminal ligado a hemopexina. O pró-peptídeo apresenta entre 80-90 aminoácidos e uma sequência altamente conservada (PRCGXPD). O domínio catalítico contém três histidinas com a sequência HEXXHXXGXXH conservada, a qual se liga ao zinco que está envolvido com o processo proteolítico das MMPs. A interação cisteína-tiol e o íon Zn^{++2} confere as pró-MMPs o estado de latência. O rompimento dessa interação, via proteólise (desencadeada por furinas, MMPs e plasminas) gera a remoção do pró-peptídeo e, conseqüentemente, a ativação das MMPs. A ativação do zimógeno também pode ocorrer de forma não proteolítica, por alteração alostérica, promovida por *reactive oxygen species* (ROS) e *sodium dodecyl sulfate* (SDS), ou seja, apenas com a ruptura da interação Tiol-Zn, sem propriamente a perda do pró-domínio (RA e PARKS, 2007).

O domínio *hemopexin-like* apresenta um papel funcional relacionado à ligação aos substratos e/ou interação com os TIMPS (inibidores de metaloproteases de tecido) (BORDEN et al., 1997; GOMIS-RUTH et al., 1997). Além dos domínios básicos, há subgrupos de MMPs que podem incorporar ou deletar estruturas e domínios funcionais, como é o caso das gelatinases MMP-2 e MMP-9. Estas apresentam três unidades repetidas e homólogas a fibronectina tipo II, no domínio catalítico. Tais unidades são exclusivas das gelatinases e estão relacionadas à desnaturação do colágeno e da gelatina, após a ligação (MURPHY et al., 1994; RA e PARKS, 2007).

Segundo Varghese (2006), as metaloproteases de matriz extracelular medeiam diferentes processos fisiológicos por meio da digestão dos componentes da matriz extracelular. As MMPs podem atuar sobre várias proteínas, que não são de matriz, incluindo: citocinas, quimiocinas, receptores e peptídeos antimicrobianos. Além disso, após a proteólise, as MMPs liberam fragmentos de proteínas de matriz que podem atuar como quimioatraentes para células presentes em outros sítios (PARKS et al., 2001). Em condições normais, os níveis basais de MMPs produzidos são muito pequenos. No entanto, a superexpressão de MMPs está relacionada à gênese de várias doenças, tais como neuroinflamação, arteriosclerose, câncer, artrites, doenças periodontais e outras (VARGHESE et al., 2006).

Trabalhos do grupo associam a expressão de MMPs induzidas pelas esfingomielinases do veneno com o desencadeamento do loxoscelismo cutâneo (TAMBOURGI et al., 2000; VAN DEN BERG et al., 2002; TAMBOURGI et al., 2005; PAIXÃO-CAVALCANTE et al., 2006, 2007). Para Nagaoka e Hirota (2000), a MMP-9 tem um papel importante no extravasamento de neutrófilos e migração destes para os tecidos graças a sua habilidade em degradar os componentes da membrana basal.

Segundo van den Berg et al. (2002), metaloproteases endógenas podem estar associadas à remoção do regulador de complemento, *Membrane Cofactor Protein* (MCP) e do *Major Histocompatibility Complex, Class I* (MHCI) da superfície das células endoteliais (ECV 304) tratadas com as SMases D do veneno de *Loxosceles intermedia*, uma vez que o uso de galardina, um inibidor específico de metaloproteases da família adamolisina, causou inibição da clivagem.

Ensaio *in vitro*, com queratinócitos humanos da linhagem HaCaT incubados com veneno ou esfingomielinase P2 de *Loxosceles intermedia*, revelaram um aumento na expressão das metaloproteases de matriz extracelular, MMP-2 e MMP-9, e diminuição da viabilidade celular por apoptose. O uso de inibidores de metaloproteases de matriz extracelular, como a tetraciclina, doxiciclina e monociclina causou não só inibição da expressão das gelatinases MMP-2 e MMP-9, como também da morte celular. Com relação à superfície celular do queratinócito foi observada uma redução na expressão dos marcadores MCP, MHCI, β 2-microglobulina e *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR); entretanto, a tetraciclina não foi capaz de prevenir a clivagem dessas proteínas da superfície celular das HaCaT (PAIXÃO-CAVALCANTE et al., 2006).

Assim, dois grupos de metaloproteases podem ser induzidas/ativadas pelas SMases D do veneno de *Loxosceles*: as MMPs que são secretadas e que podem ser inibidas pelo tratamento

com a tetraciclina e outras, associadas à membrana, pertencentes à família das adamolisinas (PAIXÃO-CAVALVANTE et al., 2006).

A família das adamolisinas (ADAMs) é composta por mais de 30 membros identificados em várias espécies (BOHM et al., 2005) e caracterizados como glicoproteínas, ancoradas à membrana, com funções proteolíticas associadas a um domínio metaloprotease. Este é regulado por um pró-domínio que bloqueia o acesso do íon zinco. A remoção desse pró-domínio (ou a inativação) do grupo conservado tiol-cisteína resulta no ganho de atividade proteolítica (LU et al., 2007).

Tambourgi et al. (1998a) verificaram em camundongos, após injeções com veneno de *Loxosceles*, um aumento de *Tumor Necrosis Factor* (TNF- α). Segundo Killar et al. (1999), o TNF- α é uma das citocinas liberada pela adamolisina TACE (*TNF- α -converting enzyme*). A expressão dessa ADAM pode ser estimulada por fatores de crescimento, citocinas, estresse celular e *phorbol 12 myristate-13 acetate* (PMA) (HIGASHIYAMA e NANBA, 2005). ADAM 10, 12 e 17 são ativadas em resposta aos reativos de oxigênio que podem ativar pró-formas latentes de metaloproteases, bem como induzir apoptose (SAARI et al., 1990; FU et al., 2001; FISHER et al., 2004). Hakulinen e Keski-Oja (2006) demonstraram que a ADAM 10 é responsável pela solubilização do ectodomínio do CD46 (MCP) na membrana de células HaCaT, durante a apoptose, regulando assim os níveis dessa proteína na superfície celular.

A trombomodulina (TM) e o *Endothelial Protein C Receptor* (EPCR) são proteínas transmembrânicas que atuam como co-fatores para a ativação da proteína C, assistida pela trombina (ESMON et al., 1982; STEARNS-KUROSAWA et al., 1996). Recentemente, foi demonstrado que SMases D do veneno de *L. intermedia* são capazes de induzir a clivagem das porções extracelulares da TM e do EPCR. Tais eventos impedem a ativação da PC, diminuindo a produção desta (VAN DEN BERG et al., 2007), o que pode contribuir para a coagulação intravascular presente nos casos graves de loxoscelismo sistêmico. As clivagens de TM e do EPCR parecem decorrer da ativação de proteases endógenas da família das adamolisinas, uma vez que o uso de inibidores específicos foi capaz de prevenir tal proteólise (VAN DEN BERG et al., 2007).

1.6 Terapia

O tratamento mais adequado/eficiente para o loxoscelismo permanece controverso. Algumas terapias descrevem o uso de oxigênio hiperbárico, dapsona (GOMEZ et al., 2002), anti-histamínicos, antibióticos, dextran, corticosteróides (AUER et al., 1974), vasodilatadores (FARDON et al., 1967), heparina, aspirina, fentolamina, analgésicos, excisões cirúrgicas em áreas com necrose (GOMEZ et al., 2002) e a soroterapia. Cerca de 90% dos acidentados por aranhas *Loxosceles* manifestam reações que se concentram no local da picada (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001). No Brasil, são produzidos os soros anti-loxoscélico e anti-aracnídico, porém não se conhece a real capacidade desses em neutralizar os efeitos locais e o período ideal para a sua administração em humanos. Assim, não há uma terapia efetiva descrita para o loxoscelismo (CARDOSO et al., 2003; PAULI et al., 2006). Paixão-Cavalcante et al. (2007) observaram que o uso tópico de tetraciclina reduziu significativamente a progressão da lesão dermonecrótica, em coelhos inoculados com veneno de *L. intermedia* ou SMase D recombinante.

6 CONCLUSÃO

Com base nas observações obtidas até o momento sugerimos que o mecanismo de ação inicia-se com a ligação das esfingomielinases do veneno de *L. laeta* à superfície dos queratinócitos humanos. Esta ligação induz a secreção proteases endógenas como as MMP-2, MMP-7 e MMP-9 que agem no colágeno e estão associadas à perda de viabilidade dos queratinócitos humanos. Além das MMPs, há ativação das ADAMs (metaloproteases de membrana), que clivam os marcadores de superfície como MCP, MHCI, β 2M, EGFR e EPCR tornando essas células alvo do sistema inune inato e intensificando o quadro loxoscélico.

A utilização de inibidores específicos para essas metaloproteases, como a tetraciclina e a galardina impede a morte dos queratinócitos e pode ser uma alternativa eficaz no tratamento do loxoscelismo cutâneo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

de ALMEIDA, D. M.; FERNANDES-PEDROSA, M. D. E. F.; DE ANDRADE, R. M.; MARCELINO, J. R.; GONDO-HIGASHI, H.; DE AZEVEDO IDE L.; HO, P. L.; van den BERG, C.; TAMBOURGI, D. V. A new anti-loxoscelic serum produced against recombinant sphingomyelinase D: results of preclinical trials. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 79, n. 3, p. 463-470, 2008.

AUER, A.I.; HERSHEY, F.B. Surgery for necrotic bites of the brown spider. **Arch. Surg.**, n. 108, p. 612–618, 1974.

BARNES, R.S.K.; CALOW, P.; OLIVE, P.J.W. **Os Invertebrados: uma nova síntese.** São Paulo: Atheneu, 1995, p. 208.

BEY, T.A.; WALTER, F.G.; LOBER, W.; SCHIMIDT, J.; SPARK, R.; SCHLIEVERT, P.M. *Loxosceles arizonica* bite with shock. **Ann. Emerg. Med.**, v. 30, p. 701-703, 1997.

BIKLE, D.D.; NG, D.; TU, C.L.; ODA, Y.; XIE, Z . Calcium- and vitamin D-regulated keratinocyte differentiation. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 177, p. 161–171, 2001.

BODE, W.; GOMIS-RÜTH, F.X.; STOCKLER, W. Astacins, serralysins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the ‘metzincins’. **FEBS Lett.**, v. 331, p. 134–140, 1993.

BOHM, B.B.; AIGNER, T.; ROY, B.; BRODIE, T.A.; BLOBEL, C.P.; BURKHARDT, H. Homeostatic effects of the metalloproteinase disintegrin ADAM15 in degenerative cartilage remodeling. **Arthritis Rheum.**, v. 52, n. 4, p. 1100-1109, 2005.

¹ *De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023:** Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002

BORDEN, P.; HELLER, R.A. Transcriptional control of matrix metalloproteinases and the tissue inhibitors of matrix metalloproteinases. **Crit. Rev. Eukaryot. Gen. Expr.**, v. 7, p. 159–178, 1997.

BUCHERL, W. Biology and venoms of the most important South American spiders of the genera *Phoneutria*, *Loxosceles*, *Lycosa* and *Latrodectus*. **Am. Zool.**, v. 9, p. 157-159, 1969.

BUSIEK, D.F.; ROSS, F.P.; MCDONNELL, S.; MURPHY, G.; MATRISIAN, L.M.; WELGUS, H.G. The matrix metalloprotease matrilysin (PUMP) is expressed in developing human mononuclear phagocytes. **J. Biol. Chem.**, v. 13, p. 9087–9092, 1992.

BUSIEK, D.F.; BARAGI, V.; NEHRING, L.C.; PARKS, W.C.; WELGUS, H.G. Matrilysin expression by human mononuclear phagocytes and its regulation by cytokines and hormones. **J. Immunol.**, v. 154, p. 6484–6491, 1995.

CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.S.; WEN, F.H.; MÁLAQUE, C.M.S.; HADDAD, J.R.V. **Animais Peçonhentos no Brasil**. São Paulo: Sarvier, 2003, p.162.

CAVENESS, W.A. Insect bite, complicated with fever. Nashville **J. Med. Surg.**, v.10, p. 333, 1872.

CHAKRABORTI, S.; MANDAL, M.; DAS, S.; MANDAL, A.; CHAKRABORTI, T. Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 253, n. 1, p. 269-285, 2003.

CORDIALI-FEI, P.; TRENTO, E.; D'AGOSTO, G.; BORDIGNON, V.; MUSSI, A.; ARDIGO', M.; MASTROIANNI, A.; VENTO, A.; SOLIVETTI, F.; BERARDESCA, E.; ENSOLI, F. Decreased levels of metalloproteinase-9 and angiogenic factors in sin lesions of patients with

psoriatic arthrititis after therapy with anti-TNF-alpha. **J. Autoimmune. Dis.**, v. 3, n. 5, p. 1-7, 2006.

DRANSFIELD, D.T.; GRINER, R.D.; RAY, S.; KESKINTEPE, M.; BOLLAG, W.B. 8-CLADENOSINE induces growth arrest without differentiation of primary mouse epidermal keratinocytes. **J. Invest. Dermatol.**, v. 117, p.1588–1593, 2001.

ESMON, N.L.; OWEN, W.G.; ESMON, C.T. Isolation of a membrane-bound cofactor for thrombin-catalyzed activation of protein C. **J. Biol. Chem.**, v. 257, p. 859–864, 1982.

FARDON, D.W.; WINGO, C.W.; ROBINSON, D.W.; MASTERS, F.W. The treatment of brown spider bite. **Plast. Reconstr. Surg.**, v. 40, p. 482–488, 1967.

FERNANDES-PEDROSA, M.F.; JUNQUEIRA DE AZEVEDO, I.L.; GONÇALVES DE ANDRADE, R.M.; van den BERG, C.W.; RAMOS, C.R.; HO, P.L.; TAMBOURGI, D.V. Molecular cloning and expression of a functional dermonecrotic and haemolytic factor from *Loxosceles laeta* venom. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 298, p. 638-645, 2002.

FERNANDES-PEDROSA, M.D.E.F.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I.D.E.L.; GONÇALVES-DE-ANDRADE, R.M.; KOBASHI, L.S.; ALMEIDA, D.D.; HO, P.L.; 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. Levantamento das Espécies do gênero *Loxosceles*. HEINECKEN E LOWE, 1832 no Município de Curitiba, Paraná, Brasil. **Estudos de Biologia**, v. 38, p. 63-88, 1994.

FISCHER, O. M.; HART, S.; GSCHWIND, A.; PRENZEL, N.; ULLRICH, A. Oxidative and osmotic stress signaling in tumor cells is mediated by ADAM proteases and heparin-binding epidermal growth factor. **Mol. Cell. Biol.**, v. 24, n. 12, p. 5172–5183, 2004.

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

FU, X.; KASSIM, S.Y.; PARKS, W.C.; HEINECKE, J.W. Hypochlorous acid oxygenates the cysteine switch domain of pro-matrilysin (MMP-7). A mechanism for matrix metalloproteinase activation and atherosclerotic plaque rupture by myeloperoxidase. **J. Biol. Chem.**, v. 276, 41279–41287, 2001.

FUKUDOME, K.; ESMON, C.T. Identification, cloning, and regulation of a novel endothelial cell protein C/activated protein C receptor. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 26486–26491, 1994.

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

GABRILOVAC, J.; CUPIC, B.; BRELJAK, D.; ZEKUSIC, M.; BORANIC, M. Expression of CD13/aminopeptidase N and CD10/neutral endopeptidase on cultured human keratinocytes. **Immunol. Lett.**, v. 91, p. 39–47, 2004.

GERTSCH, W.J. The spider genus *Loxosceles* in South America (Araneae: Scytodidae). **Bulletin of American Museum of Natural History**, v. 136, p. 119-183, 1967.

GOLUB, L.M.; RAMAMURTHY, N.; MCNAMARA, T.F.; GOMES, B.; WOLFF, M.; CASINO, A.; KAPOOR, A.; ZAMBON, J.; CIANCIO, S.; SCHNEIR, M. Tetracyclines inhibit tissue collagenase activity. A new mechanism in the treatment of periodontal disease. **J. Periodont. Res.**, v. 19, n. 6, p. 651-655, 1984.

GOMEZ, H.F.; KRYWKO, D.M.; STOECKER, W.V. A new assay for the detection of *Loxosceles* species (brown recluse) spider venom. **Ann. Emerg. Med.**, v. 39, p. 469- 474, 2002.

GOMIS-RUTH, F.X.; MASKOS, K.; BETZ, M.; BERGNER, A.; HUBER, R.; SUZUKI, K.; YOSHIDA, N.; NAGASE, H.; BREW, K.; BOURENKOV, G.P.; BARTUNIK, H.; BODE, W. Mechanism of inhibition of the human matrix metalloproteinase stromelysin-1 by TIMP-1. **Nature**, v. 389, p. 77–81, 1997.

GONÇALVES DE ANDRADE, R.M.; TAMBOURGI, D.V. First Record on *Loxosceles laeta* (Nicolet, 1849) (Aranae, Sicariidae) in the west zone of São Paulo city, São Paulo, Brazil, and considerations regarding its geographic distribution. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 36, n. 3, p. 425-426, 2003.

HAKULINEN, J.; KESKI-OJA, J. ADAM10-mediated release of complement membrane cofactor protein during apoptosis of epithelial cells. **J. Biol. Chem.**, v. 281, n. 30, p. 21369-21376, 2006.

HALPERT, I.; ROBY, J.D.; SIRES, U.I.; POTTER-PERIGO, S.; WIGHT, T.N.; WELGUS, H.G.; SHAPIRO, S.D.; WICKLINE, S.A.; PARKS, W.C. Matrilysin is expressed by lipid-laden macrophages at sites of potential rupture in atherosclerotic lesions and localizes to areas of versican deposition, a proteoglycan substrate for the enzyme. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 93, p. 9748–9753, 1996.

HIGASHIYAMA, S.; NANBA, D. ADAM-mediated ectodomain shedding of HB-EGF in receptor cross-talk. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 175, n. 1, p. 110-117, 2005.

HUNYADI, J.; SIMON, J.R.M. Expression of OKM5 antigen on human keratinocytes *in vitro* upon stimulation with gamma-interferon. **Acta Derm. Veneoreol.**, v. 66, p. 527–530, 1986.

HUNYADI, J.; SIMON, J.R.M.; DOBOZY, A. Immune-associated surface markers of human keratinocytes. **Immunol. Lett.**, v. 31, p. 209–216, 1992.

HUNYADI, J.; SIMON, J.R.M.; KENDERESSY, A.S.; DOBOZY, A. Expression of monocyte/macrophage markers (CD13, CD14, CD68) on human keratinocytes in healthy and diseased skin. **J. Dermatol.**, v. 20, p. 341–345, 1993.

II, M.; YAMAMOTO, H.; ADACHI, Y.; MARUYAMA, Y.; SHINOMURA, Y. Role of matrix metalloproteinase-7 (matrilysin) in human cancer invasion, apoptosis, growth, and angiogenesis. **Exp. Biol. Med.**, v. 231, n. 1, p. 20-27, 2006.

KARELINA, T.V.; GOLDBERG, G.I.; EISEN, A.Z. Matrilysin (PUMP) correlates with dermal invasion during appendageal development and cutaneous neoplasia. **J. Invest. Dermatol.**, v. 103, p. 482–487, 1994.

KERKEL, A.E; SAARIALHO-KERE, U. Matrix metalloproteinases in tumor progression: focus on basal and squamous cell skin cancer. **Exp. Dermatol.**, v.12, p. 109–125, 2003.

KILLAR, L.; WHITE, J.; BLACK, R., PESCHON, J. Adamalysins. A family of metzincins including TNF-alpha converting enzyme (TACE). **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 878, p. 442–452, 1999.

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

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

LU, X.; LU, D.; SCULLY, M.F.; KAKKAR, V.V. Structure activity relationship studies on ADAM protein integrin interactions. **Cardiovasc. Hematol. Agents Med. Chem.**, v. 5, n. 1, p. 29-42, 2007.

MASSOVA, I; KOTRA, L.P.; FRIDMAN, R.; MOBASHERY, S. Matrix metalloproteinases: structures, evolution, and diversification. **FASEB J.**, v. 12, n. 12, p. 1075-1095, 1998.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretária de Vigilância em Saúde. Aspectos epidemiológicos do loxoscelismo. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31482>. Acesso em: 03 ago. 2008.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de diagnósticos e acidentes por animais peçonhentos**. Brasília: Fundação Nacional da Saúde, 2001.

MORRISSEY, J. H. Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. **Anal. Biochem.**, v. 117, p. 307-310, 1980.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay to cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MURAKAMI, K.; OKAJIMA, K.; UCHIBA, M.; JOHNO, M., NAKAGAKI, T.; OKABE, H.; TAKATSUKI, K. Activated protein C prevents LPS-induced pulmonary vascular injury by inhibiting cytokine production. **Am. J. Physiol.**, v. 272, p. 197-202, 1997.

MURPHY, G.; COCKETT, M.I.; STEPHENS, P.E.; SMITH, B.J.; DOCHERTY, A.J. Stromelysin is an activator of procollagenase. A study with natural and recombinant enzymes. **Biochem. J.**, v. 248, p. 265–268, 1987.

MURPHY, G.; NGUYEN, Q.; COCKETT, M.I.; ATKINSON, S.J.; ALLAN, J.A.; KNIGHT, C.G.; WILLENBROCK, F.; DOCHERTY, A.J.P. Assessment of the role of the fibronectin-like domain of gelatinase A by analysis of a deletion mutant. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 6632–6636, 1994

NAGAOKA, I.; HIROTA, S. Increased expression of matrix metalloproteinase 9 in neutrophils in glycogen-induced peritoneal inflammation of guinea pigs. **Inflamm. Res.**, v. 79, p. 55-62, 2000.

OIKARINEN, A.; KYLMANIEMI, M.; AUTIO-HARMAINEN, H.; AUTIO, P.; SALO, T. Demonstration of 72-kDa and 92-kDa forms of type IV collagenase in human skin: variable expression in various blistering diseases, induction during re-epithelialization, and decrease by topical glucocorticoids. **J. Invest. Dermatol.**, v. 101, p. 205–210, 1993.

DE 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.

DE OLIVEIRA, K.C.; GONÇALVES de ANDRADE, R.M.; GIUSTI, A.L.; SILVA, W.D.; TAMBOURGI, D.V. Variations in *Loxosceles* spider venom composition and toxicity contribute to the severity of envenomation. **Toxicon**, v. 45, n. 4, p. 421-429, 2005.

PAIXÃO-CAVALCANTE, D.; van den BERG, C.W.; DE FREITAS FERNANDES-PEDROSA, M.; GONCALVES 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.

PAIXÃO-CAVALCANTE, D.; van den BERG, C.W.; GONCALVES DE ANDRADE, R.M.; FERNANDES-PEDROSA, M.; OKAMOTO, C.K.; TAMBOURGI, D.V. Tetracycline protects against dermonecrosis induced by *Loxosceles* spider venom. **J. Invest. Dermatol.**, v. 127, n. 6, p. 1410-1418, 2007.

PARKS, W.C.; LÓPEZ-BOADO, Y.S.; WILSON, C.L. Matrilysin in epithelial repair and defense. **Chest**, v. 120, n. 36S-41S, 2001. Suppl.

PAULI, I.; PUKA, J.; GUBERT, I.C.; MINOZZO, J.C. The efficacy of antivenom in loxoscelism treatment. **Toxicon**, v. 48, n. 2, p. 123-137, 2006.

PIVARCSI, A.; KEMENY, L.; DOBOZY, A. Innate immune functions of the keratinocytes. **Acta Microbiol. Immunol. Hung.**, v. 51, p. 303–310, 2004.

PLATNICK, N.I. The world spider catalog, version 7.5. American Museum of Natural History. Available from: <<http://research.amnh.org/entomology/spiders/catalog/index.html>>. Acesso em: 09 Nov. 2009.

RA, H.J.; PARKS, W.C. Control of matrix metalloproteinase catalytic activity. **Matrix Biol.**, v. 26, n. 8, p. 587-596, 2007.

RAYMENT, E.A.; UPTON, Z.; SHOOTER, G.K. Increased matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) activity observed in chronic wound fluid is related to the clinical severity of the ulcer. **Br. J. Dermatol.**, v. 158, p. 951-961, 2008.

REINHOLD, D.; VETTER, R.W.; MNICH, K.; BU HLING, F.; LENDECKEL, U.; BORN, I.; FAUST, J.; NEUBERT, K.; GOLLNICK, H.; ANSORGE, S. Dipeptidyl peptidase IV (DP IV, CD26) is involved in regulation of DNA synthesis in human keratinocytes. **FEBS Lett.**, v. 428, p. 100-104, 1998.

REZAIIE, A.R. Exosite-dependent regulation of the protein C anticoagulant pathway. **Trends Cardiovasc. Med.**, v. 13, p. 8-15, 2003.

RODGERS, W.H.; MATRISIAN, L.M.; GIUDICE, L.C.; DSUPIN, B.; CANNON, P.; SVITEK, C.; GORSTEIN, F.; OSTEEN, K.G. Patterns of matrix metalloproteinase expression in cycling endometrium imply differential functions and regulation by steroid hormones. **J. Clin. Invest.**, v. 94, p. 946-953, 1994.

SAARI, H.; SUOMALAINEN, K.; LINDY, O.; KONTTINEN, Y.; SORSA, T. Activation of latent human neutrophil collagenase by reactive oxygen species and serine proteases. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 171, n. 3, p. 979-987, 1990.

SAARIALHO-KERE, U.K.; CROUCH, E.C.; PARKS, W.C. Matrix metalloproteinase matrilysin is constitutively expressed in human exocrine epithelium. **J. Invest. Dermatol.**, v. 105, p. 190–196, 1995.

SANCHEZ, L.; MITJANS, M.; INFANTE, M.R.; VINARDELL, M.P. Potential irritation of lysine derivative surfactants by hemolysis and HaCaT cell viability. **Toxicol. Lett.**, v. 161, p. 53–60, 2006.

STEARNS-KUROSAWA, D.J.; KUROSAWA, S.; MOLLICA, J.S.; FERRELL, G.L.; ESMON, C.T. The endothelial cell protein C receptor augments protein C activation by the thrombin-thrombomodulin complex. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 93, p.10212–10216, 1996.

DE SANTI FERRARA, G.I.; FERNANDES-PEDROSA, M. D.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. D.; GONÇALVES-DE-ANDRADE, R. M.; PORTARO, F. C.; MANZONI-DE-ALMEIDA, D.; MURAKAMI, M. T.; ARNI, R. K.; van den BERG, C. W.; HO, P. L.; TAMBOURGI, D. V. SMase II, a new sphingomyelinase D from *Loxosceles laeta* venom gland: Molecular cloning, expression, function and structural analysis. **Toxicon**, v. 53, n. 7-8, p. 743-753, 2009.

DA SILVEIRA, R.B.; 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.

SLOMINSKI, A.; WORTSMAN, J. Neuroendocrinology of the skin. **Endocr. Rev.**, v. 21, p. 457–487, 2000.

SMITH, C.W.; MICKS, D.W. The role of polymorphonuclear leukocytes in the venom of the brown recluse spiders, *Loxosceles reclusa*. **Lab. Invest.**, v. 22, p. 90-93, 1970.

STEINHOFF, M.; BRZOSKA, T.; LUGER, T.A. Keratinocytes in epidermal immune responses. **Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.**, v. 1, p. 469–476, 2001.

SWANSON, D.L.; VETTER, R.S. Loxoscelism. **Clin. Dermatol.**, v. 24, n. 3, 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.; DIAS da SILVA, W. 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.; SILVA, W.D. Sphingomyelinases in the venom of the spider *Loxosceles intermedia* are responsible for both dermonecrosis and complement- dependent hemolysis. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 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 the erythrocyte surface and facilitating complement-mediated lysis. **Blood**, v. 95, p. 683-691, 2000.

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.

TAVARES, F.L.; SOUSA-E-SILVA, M.C.C.; SANTORO, M.L.; BARBARO, K.C.; REBECCHI, I.M.M.; SANO-MARTINS, I.S. Changes in hematological, hemostatic and biochemical parameters induced experimentally in rabbits by *Loxosceles gaucho* venom. **Hum. Exp. Toxicol.**, v. 23, p. 477-486, 2004.

THIELITZ, A.; BUKOWSKA, A.; WOLKE, C.; VETTER, R.; LENDECKEL, U.; WRENGER, S.; HASHIMOTO, Y.; ANSORGE, S.; GOLLNICK, H.; REINHOLD, D. Identification of extra- and intracellular alanyl aminopeptidases as new targets to modulate keratinocyte growth and differentiation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 321, n. 4, p. 795-801, 2004.

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

UCHI, H.; TERAOKA, H.; KOGA, T.; FURUE, M.M. Cytokines and chemokines in the epidermis. **J. Dermatol. Sci.**, v. 24, p. S29–38, 2000. Suppl 1.

UMEZAWA, H.; AOYAGI, T.; SUDA, H.; HAMADA, M.; TAKEUCHI, T.J. Bestatin, an inhibitor of aminopeptidase B, produced by actinomycetes, **J. Antibiot.**, v. 29, p. 97–99, 1976.

VAN DEN BERG, C.W.; de ANDRADE, R.M.G.; 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.; de ANDRADE, R.M.G.; MAGNOLI, F.C.; TAMBOURGI, D.V. *Loxosceles* spider venom induces the release of thrombomodulin and Endothelial Protein C Receptor: implications for the pathogenesis of intravascular coagulation as observed in loxoscelism. **J. Thromb. Haemost.**, v. 5, n. 5, p. 989-995, 2007.

VARGHESE, S. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in bone: an overview of regulation and functions. **Front. Biosci.**, v. 1, n. 11, p. 2949-2966, 2006.

VETTER, R.; REINHOLD, D.; BÜHLING, F.; LENDECKEL, U.; BORN, I.; FAUST, J.; NEUBERT, K.; ANSORGE, S.; GOLLNICK, H. DNA synthesis in cultured human keratinocytes and HaCaT keratinocytes is reduced by specific inhibition of dipeptidyl peptidase IV (CD26) enzymatic activity, **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 477, p. 167–171, 2000.

VILLOUTREIX, B.O.; BLOM, A.M.; DAHLBACK, B. Structural prediction and analysis of endothelial cell protein C/activated protein C receptor. **Protein Eng.**, v. 12, p. 833-840, 1999.

WILSON, M.J.; GARCIA, B.; WOODSON, M.; SINHA, A.A. Metalloproteinase activities expressed during development and maturation of the rat prostatic complex and seminal vesicles. **Biol. Reprod.**, v. 47, p. 683–691, 1992.

WILSON, C.L.; HEPPNER, K.J.; RUDOLPH, L.A.; MATRISIAN, L.M. The metalloproteinase matrilysin is preferentially expressed by epithelial cells in a tissue-restricted pattern in the mouse. **Mol. Biol. Cell.**, v. 6, p. 851–869, 1995.

XUE, M.; THOMPSON, P.; KELSO, I.; JACKSON, C. Activated protein C stimulates proliferation, migration and wound closure, inhibits apoptosis and upregulates MMP-2 activity in cultured human keratinocytes. **Exp. Cell Res.**, v. 299, p. 119-127, 2004.

XUE, M.; CAMPBELL, D.; SAMBROOK, P.; FUKUDOME, K.; JACKSON, C. Endothelial Protein C Receptor and Protease-Activated Receptor-1 mediate induction of a wound-healing phenotype in human keratinocytes by activated protein C. **J. Invest. Dermatol.**, v. 125, p. 1279-1285, 2005.

XUE, M.; CAMPBELL, D.; JACKSON, C.J. Protein C is an autocrine growth factor for human skin keratinocytes. **J. Biol. Chem.**, v. 282, n. 18, p. 13610-13616, 2007.

XUE, M.; JACKSON, C.J. Autocrine Actions of Matrix Metalloproteinase (MMP)-2 Counter the Effects of MMP-9 to Promote Survival and Prevent Terminal Differentiation of Cultured Human Keratinocytes. **J. Invest. Dermatol.**, v. 128, n. 11, p. 2676-85, 2008.

YUKSEL, M.; OKAJIMA, K.; UCHIBA, M.; HORIUCHI, S.; OKABE, H. Activated protein C inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha production by inhibiting activation of both nuclear factor-kappa B and activator protein-1 in human monocytes. **Thromb. Haemost.**, v. 88, p. 267-273, 2002.