

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

**ISOLAMENTO DE INIBIDOR DE TRIPSINA E
PROTEÍNA ANTICOAGULANTE DA HEMOLINFA
DE *Lasiadora* sp (ARANHA CARANGUEJEIRA)**

Felipe Roberto Borba Ferreira

Orientadora: Prof^a Dr^a Russolina B. Zingali

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Patrícia Maria Guedes Paiva

Recife, 2009

FELIPE ROBERTO BORBA FERREIRA

“Isolamento de inibidor de Tripsina e Proteína Anticoagulante da Hemolinfa de *Lasiadora* sp (aranha caranguejeira)”

Dissertação apresentada para o cumprimento parcial das exigências para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Fisiologia pela Universidade Federal de Pernambuco

Ferreira, Felipe Roberto Borba

Isolamento de inibidor de tripsina e proteína anticoagulante da hemolinfa de Lasiodora sp (aranha caranguejeira) / Felipe Roberto Borba Ferreira. – Recife: O Autor, 2009.

56 folhas: fig.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Departamento de Bioquímica e Fisiologia, 2009.

Inclui bibliografia e anexo.

1. Proteases 2. Hemolinfa 3. Aranha caranguejeira 4. Lasiodora | Título.

577.15

CDU (2.ed.)

UFPE

572.76

CDD (22.ed.)

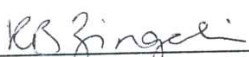
CCB – 2009- 62

FELIPE ROBERTO BORBA FERREIRA

“Isolamento de inibidor de Tripsina e Proteína Anticoagulante da Hemolinfa de *Lasiodora sp* (aranha caranguejeira)”

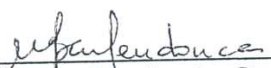
Dissertação apresentada para o cumprimento parcial das exigências para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Fisiologia pela Universidade Federal de Pernambuco

Aprovado por:


Prof.ª. Dra. Russolina Benedeta Zingali (Presidente)


Prof.ª. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia (Examinador interno)


Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra (Examinador interno)


Prof.ª. Dra. Maria do Socorro de Mendonça Cavalcanti (Examinador externo)

*“Não deixe que a saudade sufoque, que a rotina acomode, que o medo impeça de tentar.
Desconfie do destino e acredite em você. Gaste mais horas realizando que sonhando,
fazendo que planejando, vivendo que esperando, porque, embora quem quase morre
esteja vivo, quem quase vive já morreu”.*

Luiz Fernando Veríssimo

ÍNDICE ANALÍTICO

AGRADECIMENTOS	VI
LISTA DE ABREVIATURAS	VIII
LISTA DE FIGURAS	IX
RESUMO	X
ABSTRACT	XI
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Artrópodes	1
1.1.1 Aranhas	2
1.1.2 Gênero <i>Lasiodora</i>	4
1.1.3 Hemolinfa	5
1.2 Inibidores de protease	10
1.2.1 Classificação dos inibidores de protease	12
1.2.1.1 Inibidores do tipo Serpina	13
1.2.1.2 Inibidores do tipo Kazal	13
1.2.1.3 Inibidores do tipo Kunitz	14
1.3 Potencial biotecnológico dos inibidores	15
2. OBJETIVOS	17
2.1 Geral	17
2.2 Específico	17
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	18
4. ARTIGO: “Isolation of protease inhibitor and anti-coagulant protein from hemolymph of tarantula spider <i>Lasiodora sp</i>”	28

5. CONCLUSÕES	50
6. ANEXO: <i>Instructions to Authors Insect Biochemistry and Molecular Biology</i>	51

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por ter me possibilitado estar concluindo mais essa importantíssima etapa na minha vida.

Aos meus pais, Roberto e Marineide pelos conselhos e apoio que recebi, fazendo com que eu tivesse força para vencer mais esta fase de minha formação.

Aos meus irmãos Carlos e Jéssica e toda a família querida que são muito importantes para mim.

A Professora Lina, por todo apoio dado no Rio de Janeiro. Pela grandiosa orientação e conhecimentos passados, confiança, amizade e oportunidade a mim dados para desenvolver essa pesquisa em intercâmbio com a UFRJ.

A Professora Patrícia Paiva, pela magnífica co-orientação, amizade, incentivo e confiança em mim depositada.

A Professora Socorro por sua amizade e todo apoio dado durante o decorrer da pesquisa e oportunidade de aprender sempre mais. Sem ela nunca teria chegado aqui.

A Professora Aparecida Tanaka, pela amizade, e conhecimento compartilhado.

A todos que fazem parte do Laboratório de Glicoproteínas da UFPE, pela amizade e companheirismo durante toda pesquisa. Especialmente à Andréa, Fernando, Lidiane, Luciana, Mano e Neila. A Giselly um obrigado especial pela ajuda sempre dada nas coletas de hemolinfa.

A todos os funcionários do Departamento de Bioquímica da UFPE, que de alguma forma contribuíram para este trabalho. Em especial aos técnicos Maria Reis e João.

A todos que fazem a UEMP na UFRJ, pela amizade, apoio, receptividade, força e atenção a mim dada quando no Rio. Especialmente à Ana Cristina, Ana Lúcia, Marjolly, Silas, Patrícia, Vivi, Taty e Lu.

A Adriana pela divertida vivência no Rio de Janeiro. As minhas grandes amigas Taciana e Paulinha pelo apoio sempre dado a mim dentro e fora do laboratório.

A minha querida amiga Tatiana, pela ajuda com os experimentos, amizade e companheirismo dentro e fora do laboratório, muito obrigado.

A minha querida amiga Fabi pela grande amizade e carinho comigo dentro e fora do laboratório nesse pouco tempo em que nos conhecemos, só tenho a lhe agradecer.

As minhas amigas Renata e Natália pela força, incentivo, receptividade e apoio dado durante a minha estadia no Rio, muito obrigado por tudo.

A CAPES pelo suporte financeiro.

LISTA DE ABREVIATURAS

INTRODUÇÃO

BmTIs – Inibidor de tripsina de *Boophilus microplus*

LPS – Lipopolissacarídeo

proPO – Pro – fenoloxidase

ARTIGO

APTT – Tempo de tromboplastina parcialmente ativada

CaCl₂ – Cloreto de Cálcio

FPLC – do inglês Fast Performace Liquid Chromatography

HCL – Ácido Clorídrico

LPA – do inglês *Lasiodora* Plasma Anti-coagulant

LPTI – do inglês *Lasiodora* Plasma Trypsin Inhibitor

NaCl – Cloreto de Sódio

PEG – Polietileno Glicol

PT – Tempo de Protrombina

SDS – PAGE – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em presença de Dodecil Sulfato de Sódio

TBS – do inglês Tampão Tris

Tris – Tris Hidroxiamino Metano

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1. Aparência externa do corpo de uma aranha	3
Figura 2. Aranha <i>Lasiodora</i> sp	5
Figura 3. (A) Esquema de sistema circulatório de aranhas (B) Destaque para o vaso dorsal (coração)	6
Figura 4. Proteínas da hemolinfa de <i>Manduca sexta</i>	7
Figura 5. Granulócito de <i>Culex quinquefasciatus</i>	8
Figura 6. Sistema ativador da pro-fenoloxidase de artrópodes.	10

ARTIGO

Figure 3. Chromatography of <i>Lasiodora</i> plasma on trypsin-Sepharose column	46
Figure 2. (A) Chromatography of <i>Lasiodora</i> plasma on Sephadex G-100 (B) SDS-PAGE of crude trypsin inhibitor	47
Figure 3. Effect of crude trypsin inhibitor on blood-clotting	48
Figure 4. Isolation of LPTI and LPA from crude trypsin inhibitor by anion exchange chromatography	49

RESUMO

Inibidores de protease são moléculas que têm a capacidade de controlar proteases por bloqueio da atividade catalítica. As proteases participam de importantes eventos fisiológicos tais como a digestão dos alimentos, coagulação sangüínea, e apoptose. A ação dos inibidores é essencial para garantir a homeostase. Artrópodes como insetos e aracnídeos são ricas fontes desses inibidores. O objetivo desse trabalho foi isolar inibidores de proteases presentes na hemolinfa da aranha *Lasiodora* sp. Hemolinfa foi coletada através de punção cardíaca na presença de anticoagulante. Após centrifugação (800g) o plasma foi separado e utilizado para a detecção de inibidor de tripsina, trombina, fator Xa e XIIa. Cromatografia de afinidade em tripsina-Sepharose resultou no inibidor purificado, porém sem atividade inibitória. Isolamento do inibidor de tripsina foi realizado por cromatografia em coluna de Sephadex G-100 e a preparação contendo atividade inibitória de tripsina foi denominada: inibidor de tripsina bruto. Cromatografia em Mono Q isolou a partir do inibidor de tripsina bruto, o inibidor de tripsina LPTI (do inglês *Lasiodora* plasma trypsin inhibitor) e uma proteína anticoagulante LPA (do inglês *Lasiodora* plasma anti-coagulant). Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de sulfato sódico de dodecila revelou massa molecular de 72 kDa para LPTI e LPA. Avaliação de atividade inibitória sobre proteases e do efeito na coagulação através de determinação do tempo de recalcificação, tempo de protrombina (TP) e tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA) revelou que LPTI não interfere na coagulação e LPA, sem atividade inibitória de tripsina, interfere no TTPA. De acordo com nosso conhecimento LPTI e LPA correspondem ao primeiro inibidor de tripsina e a primeira proteína anticoagulante isolados da hemolinfa de aranha. LPTI e LPA podem participar no mecanismo de coagulação da hemolinfa através do controle da produção da protease fenoloxidase, que dispara a cascata, e do controle da atividade de proteases da cascata de coagulação.

Palavras chaves: aranha, inibidor de tripsina, anticoagulante, *Lasiodora*

ABSTRACT

Protease inhibitors are molecules that have the ability to control proteases by blocking the catalytic activity. The proteases are involved in important physiological events such as food digestion, blood coagulation, and apoptosis. The action of inhibitors is essential to ensure homeostasis. Arthropods such as insects and arachnids are rich sources of these inhibitors. The aim of this work was to isolate inhibitors of proteases present in the hemolymph of the spider *Lasiodora* sp. Hemolymph was collected by cardiac puncture in the presence of anticoagulant. After centrifugation (800g) the plasma was separated and used for the detection of inhibitors of trypsin, thrombin, factor Xa and XIIa. Affinity chromatography on trypsin-Sepharose resulted in the purified inhibitor, but without inhibitory activity. Isolation of the trypsin inhibitor was performed by chromatography on Sephadex G-100 column and preparation containing inhibitory activity of trypsin was called: crude trypsin inhibitor. Chromatography on Mono Q isolated from crude trypsin inhibitor, *Lasiodora* plasma trypsin inhibitor (LPTI) and *Lasiodora* plasma anti-coagulant (LPA). Polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulfate revealed a molecular mass of 72 kDa for LPTI and LPA. Evaluation of inhibitory activity on proteases and effect on coagulation by determining of the time of recalcificação, prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (APTT) revealed that LPTI did not interfere with the coagulation and LPA, without of trypsin inhibitory activity, interferes in APTT. To the best of our knowledge LPTI and LPA are the first inhibitor of trypsin and the first anticoagulant protein isolated from hemolymph of spider. LPTI and LPA may participate in the mechanism of coagulation through the control of phenoloxidase production, which triggers the cascade, and control the activity of proteases of the coagulation cascade.

Keywords: spider, trypsin inhibitor, anti-coagulant, *Lasiodora*

1. INTRODUÇÃO

1.1 Artrópodes

Os artrópodes constituem um grande agrupamento de animais invertebrados, com uma diversidade adaptativa que lhes permitiu sobreviver em virtualmente todos os habitats, sendo o maior agrupamento de espécies dentro do Reino Animal. No entanto duas classes merecem destaque devido a sua importância junto aos humanos: os quelicerados que são representados pelo carangueijo-ferradura e aracnídeos, e os insetos que constituem o grupo de animais mais diversificado. Os aracnídeos compõem a maior e, do ponto de vista humano, a mais importante e numerosa classe de quelicerados, que são representados pelas formas mais comuns e familiares, tais como: aranhas, escorpiões, ácaros e carrapatos.

O sucesso adaptativo e a sobrevivência alcançada pelos aracnídeos nos mais diversos habitats devem-se principalmente ao sistema de defesa essencialmente composto por moléculas como a fenoloxidase, fatores de coagulação, fatores de complemento, lectinas, proteases, peptídeos antimicrobianos e inibidores de proteases encontrados tanto na hemolinfa como nos hemócitos desses animais. Estas moléculas têm um potencial biotecnológico explorável o que incentiva o estudo e o isolamento das mesmas. Devido à potencialidade de uso dessas proteínas, esse grupo tem sido alvo de pesquisas que vêm isolando uma gama dessas moléculas bioativas (Fukuzawa *et al.*, 2008).

Entre os aracnídeos um grupo de destaque é o das aranhas (ordem araneae), animais de importância médica e ecológica que surgiram provavelmente no período Devoniano a aproximadamente 400 milhões de anos atrás. As aranhas estão distribuídas em praticamente todo o planeta habitando todos os ecossistemas, com exceção do ar e do mar aberto e representam um grande potencial de estudo (Foelix, 1996).

1.1.1 Aranhas

As aranhas variam desde pequenas espécies com menos de 0,5 mm de comprimento até as grandes aranhas tropicais chamadas de caranguejeira, com o comprimento corporal de 9 cm (Foelix, 1996). Excluindo os insetos, que são suas presas primárias, as aranhas constituem o maior e mais diverso grupo de invertebrados terrestres (Rash & Hodgson, 2002). Há 40.462 espécies descritas distribuídas em 3.733 gêneros (Platnick, 2009), restando um grande número de animais a espera de caracterização (Coddington & Levi, 1991).

Morfológicamente, o corpo de uma aranha consiste de duas partes principais: uma porção anterior, o prossoma ou cefalotórax, e uma parte posterior, o opistossoma ou abdome, que são conectadas por uma estrutura delicada, o pedicelo. O cefalotórax suporta quatro pares de pernas, um par de quelíceras em frente à boca e um par de pedipalpos localizados entre a quelícera e o primeiro par de pernas, (Fig.1) que nos machos são modificados na sua extremidade em órgãos copuladores. Ainda no prossoma são encontrados os olhos do animal que podem ser em número de dois, seis ou oito, e são de extrema importância para taxonomia do grupo. O abdome por sua vez abriga os sistemas respiratório, circulatório, digestivo e reprodutor (Foelix, 1996).

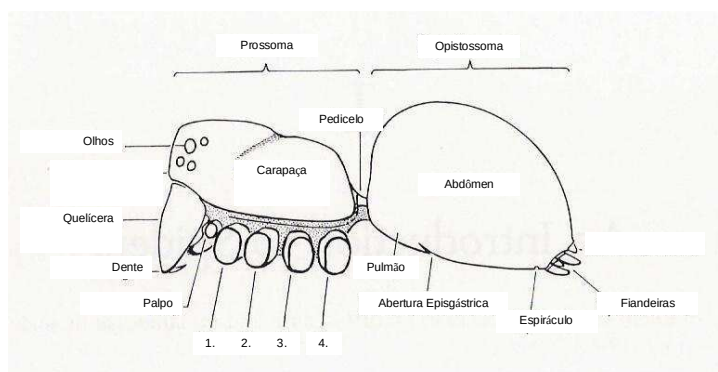


Figura 1. Aparência externa do corpo de uma aranha. Adaptado de Foelix (1996).

Atualmente as aranhas são distribuídas nas sub-ordens Opisthothelae e Mesothelae (Coddington & Levi, 1991). Os Mesothelae são constituídos por uma única família, a Liphistiidae, com aranhas asiáticas que conservam vários caracteres plesiomórficos, como a segmentação externa do abdome, oito fiandeiras ventrais medianas, quelíceras paraxiais e quatro aberturas respiratórias denominadas pulmões foliáceos (Coddington & Levi, 1991; Foelix, 1996). Os representantes da subordem Opisthothelae apresentam pouco ou nenhuma evidência de opistossoma segmentado e as fiandeiras se localizam mais posteriormente que nos mesothelideos. Essa sub-ordem é dividida em duas infra-ordens, Mygalomorphae e Araneomorphae, que são denominadas aranhas primitivas e modernas respectivamente (Coddington & Levi, 1991; Foelix, 1996).

As araneomorfos compreendem cerca de 90% de todas as aranhas (Foelix, 1996) e possuem as quelíceras perpendiculares ao eixo do corpo, movimentando-as de dentro para fora. As migalomorfos compreendem as aranhas conhecidas popularmente como caranguejeiras. Estas são caracterizadas por suas quelíceras paraxiais que estão situadas paralelamente ao corpo, e se movem de cima para baixo.

1.1.2 Gênero *Lasiodora*

A classificação do gênero *Lasiodora* segundo Ferreira (2006):

Filo	Arthropoda
Subfilo	Chelicerata
Classe	Arachnida
Ordem	Araneae
Sub-ordem	Ophistothelae
Infra-ordem	Mygalomorphae
Família	Theraphosidae
Gênero	<i>Lasiodora</i>

A *Lasiodora* sp (Fig. 2), em relação às demais aranhas é uma caranguejeira considerada de grande porte que pode atingir 20 cm de comprimento. Exemplares apresentam cor escura, preta ou marrom; e abdome com pêlos urticantes tipo I e III e/ou IV, que podem ser lançados quando o animal se sente ameaçado (Bertani, comunicação oral, 2006). Estas aranhas são caracterizadas por possuírem cerdas estridulatórias na região superior distal da face protolateral das coxas, geralmente avermelhadas e em pequeno número; sendo mais evidentes nas pernas I e II. Machos possuem apófises tibiais bifurcadas e o metatarso dobra-se sobre o ramo externo. As espermatecas são bilobuladas e ligadas por uma região esclerotizada (Bertani *et al.*, 1996). *Lasiodora* é encontrada no Nordeste do Brasil, principalmente em áreas de Mata Atlântica. Há registros ainda na região Sudeste e Centro-Oeste do país (Bertani *et al.*, 1996).



Figura 2. Aranha *Lasiodora* sp (Mygalomorphae, Theraphosidae). Foto: Felipe Borba

1.1.3 Hemolinfa

Como na maioria dos invertebrados, as aranhas possuem um sistema circulatório aberto onde corre um fluído corporal análogo ao sangue dos vertebrados; a hemolinfa. O órgão responsável pela circulação desse líquido é o coração, este localizado dorsalmente no interior do opistossoma (Fig. 3) que é formado por um tubo muscular suspenso em uma ampla câmara através de ligamentos dorsais, laterais e ventrais (Foelix, 1996).

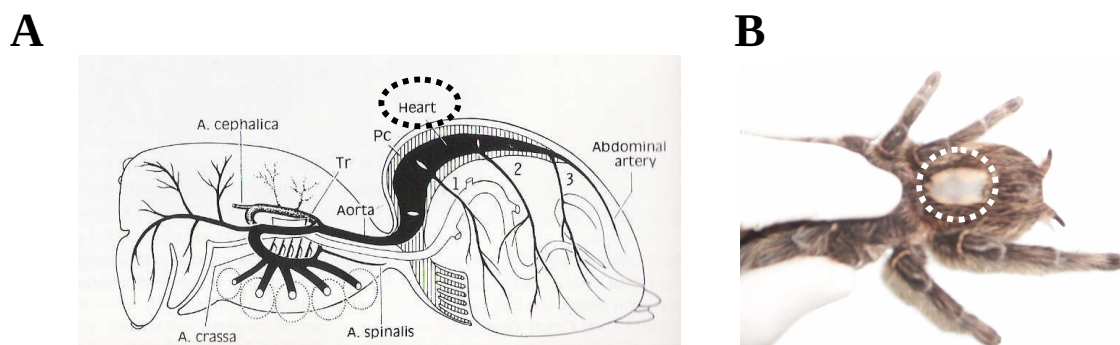


Figura 3. (A) Esquema do sistema circulatório de aranhas segundo Foelix (1996). (B) Destaque para o vaso dorsal (coração) Foto: Felipe Borba

A hemolinfa fresca de uma aranha apresenta-se de cor azulada devido à presença de cobre contido no pigmento respiratório hemocianina, e exibe uma grande variedade de células denominadas hemócitos. Segundo Foelix (1996), a maioria das substâncias orgânicas presentes nesse fluido são proteínas, como a hemocianina (cerca de 80%), aminoácidos livres (principalmente a prolina), carboidratos (glicose) e ácidos graxos (palmítico, linoléico e esteárico).

Nos quelicerados e crustáceos, a hemocianina parece desempenhar um papel imunológico importante (Cerenius e Söderhäll, 2004) e participa no sistema de imunidade inata (Nagai *et al.*, 2001). *In vitro*, componentes da cascata de coagulação e diversos fatores antimicrobianos derivados dos hemócitos podem induzir a hemocianina a expressar atividade de fenoxidase (Nagai *et al.*, 2001; Adachi *et al.*, 2003).

A hemolinfa dos artrópodes de forma geral é bastante estudada, em seu aspecto bioquímico, e dela já foram isoladas lectinas, inibidores de proteases e peptídeos antimicrobianos. Estudos de proteômica na hemolinfa de *Manduca sexta* (Furusawa *et al.*, 2008) demonstraram a presença de várias proteínas com função de transporte, sinalização

celular e defesa (Fig. 4). Dependendo do organismo moléculas bioativas têm sido detectadas no plasma, hemócitos, ou em ambos. Inibidores de proteases foram isolados do plasma do bicho-da-seda *Antheraea mylitta* (Shrivastava e Ghosh, 2003) e da lagarta *Manduca sexta* (Wang e Jiang, 2004), hemócitos do camarão *Litopenaeus vannamei* contêm um inibidor de protease (Vega e Albores, 2005), e hemócitos do carrapato *Boophilus microplus* contêm peptídeo antimicrobiano (Fogaça *et al.*, 2006). A investigação de antimicrobianos em aranhas é escassa (Silva Júnior, 2000).

A ação combinada das proteínas presentes no plasma e nos hemócitos dos invertebrados parecem estar envolvidos na coagulação da hemolinfa e no combate às infecções através da cascata de coagulação. Esse fenômeno bem conhecido em invertebrados principalmente no carangueijo-ferradura (Muta e Iwanaga, 1996) é análogo a coagulação sanguínea dos vertebrados, onde existe uma resposta a nível celular e extra-celular durante a ativação desse mecanismo fisiológico.

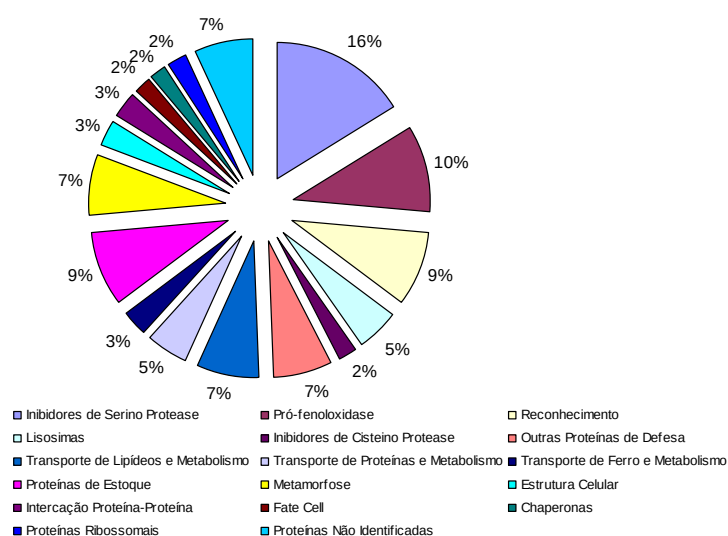


Figura 4. Proteínas da hemolinfa de *Manduca sexta*. Adaptado de Furusawa *et al.* (2008).

Os hemócitos têm a habilidade de defender os organismos contra patógenos, parasitas e outros corpos estranhos, que penetrem na hemocele. As reações de defesa são mediadas pela fagocitose, encapsulação e reparação de danos (Lavine e Strand, 2002). Os hemócitos circulantes parecem estar envolvidos na coagulação da hemolinfa e no combate às infecções, sendo extremamente sensíveis ao lipopolissacarídeo bacteriano respondendo a ele através da liberação de componentes granulares (Iwanaga e Lee, 2005). Geralmente são distinguidos quatro tipos de células, sendo os mais comuns os granulares (Fig. 5), que apresentam muitos grânulos densos concentrados em seu citoplasma, com função sugerida de esclerotização da exocutícula (Foelix, 1996). Outras funções atribuídas aos hemócitos são atuar como fagócitos ou células de armazenagem, ou ainda para impedimento do extravasamento da hemolinfa (Muta e Iwanaga, 1996). Três tipos de hemócitos foram observados na *Acanthoscurria gomesiana*: os granulócitos, os plasmatócitos e os oenócitos (Fukuzawa *et al.*, 2008).

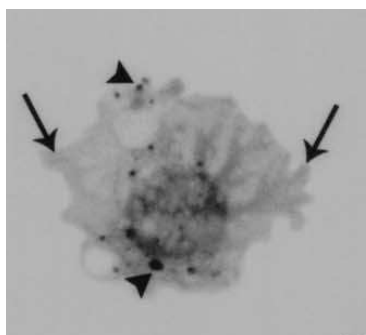


Figura 5. Granulócito de *Culex quinquefasciatus*. Setas indicam pseudopodes e cabeças das setas indicam grânulos densos no citoplasma (Brayner *et al.*, 2005).

Injúrias mecânicas ou a presença de elementos estranhos como microrganismos resultam na deposição de melanina ao redor do tecido danificado ou do corpo estranho. A

melanina servirá fisicamente de escudo a um invasor e, portanto, impede ou retarda o seu crescimento, mas talvez ainda mais importante durante a formação da melanina, é a produção de intermediários altamente reativos e tóxicos como as quinonas (Cerenius e Söderhäll, 2004). Todo o mecanismo de melanização faz parte do sistema de imunidade inata, e diversas proteínas presentes na hemolinfa estão envolvidas nesse processo, dentre elas, proteases da cascata de coagulação. A ativação dessas proteases é cuidadosamente regulada no sistema da fenoloxidase que consiste numa cascata de proteínas capazes de se ligar a polissacarídeos, peptidoglicanos e lipopolissacarídeos de microrganismos. A cascata é finamente regulada por inibidores de protease (Silva, 2002; Soares, 2008).

A fenoloxidase é uma enzima que cataliza a oxidação de compostos fenólicos presentes na hemolinfa. O produto final dessa oxidação é a melanina, que participa de três importantes processos fisiológicos: esclerotização da cutícula, cicatrização de lesões e defesa imunológica (Azzolini, 2006). A fenoloxidase encontra-se como uma pro-enzima, chamada pro-fenoloxidase que é ativada proteoliticamente por uma ou duas serinoproteases em resposta a bactérias, fungos, LPS (componentes da parede celular das bactérias Gram-negativas), peptidoglicanas (componente celular das bactérias Gram-positivas) e β -1,3 glucanas (componente da parede celular de fungos e algas), bem com parasitóides, enzimas proteolíticas (tripsina e quimotripsina) e injúrias nos tecidos. Oxidações subsequentes de fenóis pela fenoloxidase levam à produção de quinonas que são polimerizadas para formar melanina (Fig. 6) (Nappi e Ottaviani, 2000; Cerenius e Söderhäll, 2004; Azzolini, 2006; Soares, 2008).

As proteases da cascata da fenoloxidase ainda não estão bem caracterizadas, mas é proposto que essas sejam precisamente reguladas através da presença de inibidores de

proteases específicos que previnem uma ativação descontrolada (Cerenius e Söderhäll, 2004; Franssens *et al.*, 2008; Soares, 2008).

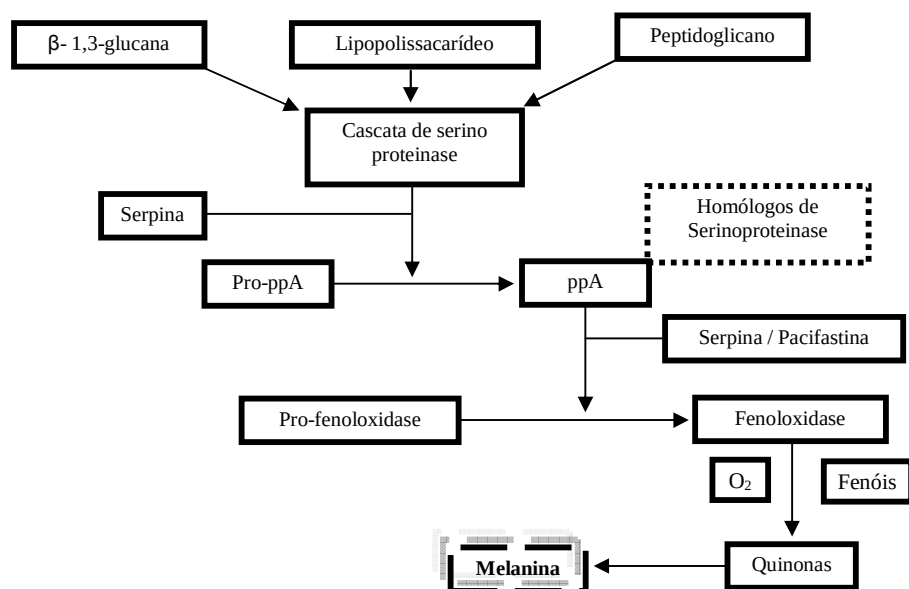


Figura 6. Sistema ativador da pro-fenoloxidase de artrópode. O sistema é ativado pelo reconhecimento protéico de β -1,3-glucanas, lipopolissacarídeos, peptidoglicanos, ou por outros componentes como fatores endógenos produzidos sobre a lesão tecidual. A cascata de serinoproteinases, as quais não foram ainda caracterizadas, podem resultar na clivagem do zimogênio da enzima ativadora da Pro-ppA em ppA ativa. Os homólogos de serinoproteinases são requeridos pelas ppAs e algumas ppAs são capazes de clivar Pro-fenoloxidase em fenoloxidase ativa. Fonte: adaptado Cerenius e Söderhäll (2004).

1.2 Inibidores de protease

As proteases são enzimas que apresentam inúmeras funções fisiológicas em diferentes tipos celulares e participam da defesa imunológica, renovação tecidual e digestão de alimentos (Simonet *et al.*, 2002; Eijk *et al.*, 2003; Fear, 2007). A hidrólise da ligação

peptídica catalisada por proteases é essencialmente irreversível sendo controlada por uma extensa rede de inibidores de protease (Fear *et al.*, 2007).

As serinoproteases têm sido extensivamente investigadas e contêm as cadeias laterais dos resíduos de serina, ácido aspártico e histidina alinhadas formando a tríade catalítica comum à maioria das enzimas desta classe. Essas enzimas já foram encontradas em vírus, bactérias e eucarióticos e algumas são: tripsina, quimotripsina e subtilisina, segundo Lima (2006). As serinoproteases que participam do processo de coagulação da hemolinfa e ativação da proPO podem ser controladas por inibidores de serinoproteases do tipo Kunitz, Serpina e Pacifastina presentes na hemolinfa de artrópodes, sugerindo que cada protease participante da cascata da fenoloxidase, assim como na cascata da coagulação da hemolinfa, é regulada por um ou mais inibidores específicos presentes no plasma ou em hemócitos de animais invertebrados (Theopold *et al.*, 2002; Cerenius e Söderhall, 2004; Soares, 2008).

Inibidores de proteases endógenas ligam-se às enzimas e bloqueiam suas ações formando complexos estequiométricos estáveis sendo assim importantes e fundamentais reguladores da atividade proteolítica (Laskowski e Qasim, 2000).

Alguns inibidores agem sobre mais de um tipo de proteases, podendo ocorrer como proteínas isoladas, pequenas ou em alguns casos como domínios de cadeias de inibidor que fazem parte do mesmo polipeptídeo (Fear *et al.*, 2007).

Esses inibidores pertencem a várias famílias, tendo como propriedade comum a presença de múltiplas pontes dissulfetos, que os tornam proteínas bastante estáveis e rígidas auxiliando na fixação do sítio reativo que interage com o sítio ativo da protease, na correta conformação requerida para a inibição (Kanost, 1999).

A maioria dos inibidores de proteases de artrópodes foi isolada da hemolinfa dos

insetos e podem ser agrupados principalmente em duas famílias: proteínas de baixo peso molecular relacionadas como inibidores do tipo Kunitz e proteínas com aproximadamente 45 kDa, que pertencem a superfamília das Serpinas (Polanowski e Wilusz, 1996).

É bem sabido que inibidores de serinoproteases estão envolvidos em diversos mecanismos no sistema imune de artrópodes. Por exemplo, eles medeiam a coagulação e melanização da hemolinfa e a produção de peptídeos antimicrobianos (Fogaça *et al.*, 2006). O principal papel dessas proteínas é a regulação de serinoproteases endógenas implicadas nas cascatas do sistema da fenoloxidase e da coagulação sanguínea (Cherqui *et al.*, 2001; Cerenius e Söderhall, 2004).

1.2.1 Classificação dos inibidores de protease

A classificação de inibidores de proteases é feita segundo sua origem, podendo ser de tecidos animais, vegetais e microorganismos, e agrupados em famílias segundo a similaridade na estrutura primária, mecanismo de ação, resíduos de cisteínas conservados e estrutura tridimensional (Azzolini, 2006). Ainda podem ser classificados em cinco grupos (serina, treonina, cisteína, aspartil e inibidores de metaloproteases) de acordo com o mecanismo empregado no sítio ativo da protease a ser inibida (Fear *et al.*, 2007).

Os inibidores de serinoproteases de origem animal são os que apresentam o maior número de membros descritos, sendo os membros das famílias Serpina, Kazal e Kunitz os mais estudados (Roberts *et al.*, 1995).

Nas duas últimas décadas, uma nova família de inibidores de serinoproteases vem sendo descrita em artrópodes, sendo o primeiro membro identificado dessa família a

pacifastina, que dá nome à família, presente na hemolinfa da lagosta *Pacifastacus leniusculus* (Azzolini, 2006).

1.2.1.1 Inibidores do tipo Serpina

Os inibidores do tipo Serpina são proteínas com aproximadamente 45 kDa, representam quase 10% das proteínas totais encontradas no plasma animal e participam na regulação de proteases envolvidas na inflamação, coagulação sanguínea e ativação do complemento (Silverman *et al.*, 2001; Gettins, 2002), além de, induzirem a síntese de peptídeos antimicrobianos (Jiang e Kanost, 2000). A seletividade inibitória de uma serpina é determinada pela exposição do loop do sítio reativo na superfície da molécula (Wang e Jiang, 2004).

No caranguejo-ferradura, *Limulus polyphemus*, foram caracterizados três inibidores de proteases da família tipo Serpina (Jiang e Kanost, 2000). Membros desta família têm sido caracterizados em alguns insetos onde participando no controle da resposta imune, como o inibidor isolado da hemolinfa de *Manduca sexta* sendo capaz de bloquear a cascata da fenoloxidase (Zhu *et al.*, 2003).

1.2.1.2 Inibidores do tipo Kazal

Inibidores Kazal formam uma família bem definida de inibidores competitivos de serinoproteases, que possuem estruturas com vários domínios e parecem estar envolvidos no controle da atividade proteolítica na coagulação e sistema da fenoloxidase (Vega e Albores, 2005).

Estes inibidores caracterizam-se pela alta similaridade nas estruturas primárias, três pontes dissulfeto e resíduos de cisteínas conservados em posições homólogas, assim como obedecem a um mecanismo de inibição padrão (Laskowski e Kato, 1980).

Muitos inibidores do tipo Kazal têm sido identificados em animais hematófagos podendo possuir um ou mais domínios (Azzolini, 2006). Uma proteína com quatro domínios Kazal foi isolada dos hemócitos do camarão *Litopenaeus vannamei* (Vega e Albores, 2005).

1.2.1.3 Inibidores do tipo Kunitz

Os inibidores da família tipo Kunitz são proteínas de baixa massa molecular com aproximadamente 60 resíduos de aminoácidos, com um ou mais domínios inibitórios capazes de inibirem uma ou mais serinoprotease (Azzolini, 2006). Estes inibidores são classificados segundo as posições conservadas de seis resíduos de cisteínas que formam três pontes dissulfeto responsáveis pela compactação e estabilidade destas moléculas (Roberts *et al.*, 1995). Estes inibidores ligam-se às suas enzimas como se fossem substratos.

No carrapato (*Boophilus microplus*) inibidores de proteases da família Kunitz, sem atividade anticoagulante, têm sido caracterizados; dentre eles, encontram-se os inibidores isolados de extrato de larvas infestantes, os BmTIs (Tanaka *et al.*, 1999b; Sasaki *et al.*, 2004) e recentemente, uma proteína com atividades anti-quimotripsina e antimicrobiana foi descrita em *B. microplus*, e denominada ixodidina (Fogaça *et al.*, 2006). Recentemente, Lai e colaboradores (2004) isolaram e caracterizaram um inibidor de trombina com dois domínios Kunitz da hemolinfa do carrapato *Amblyomma hebraeum*.

Inibidores tipo Kunitz de *B. microplus* (BmTIs) quando utilizados na imunização de bovinos levaram a uma proteção de 72,8% contra a infestação por *B. microplus*, o que faz destas proteínas importantes alvos no desenvolvimento de vacinas (Andreotti *et al.*, 2002; Sasaki *et al.*, 2004; Sasaki *et al.*, 2006).

O interesse em estudar inibidores de proteases deve-se à sua potencialidade em controlar mecanismos como inflamação, coagulação sanguínea e ciclo celular.

1.3 Potencial biotecnológico dos inibidores

Inibidores dos mais variados organismos já foram caracterizados quanto as suas atividades biológicas e tem sido sugerido o seu potencial uso biotecnológico como drogas para o controle de algumas doenças como câncer, *diabetes mellitus* ou no controle de vírus, fungos e inflamação (Fear *et al.*, 2007).

Bothrojaracina um potente inibidor de trombina presente no veneno da serpente *Bothrops jararaca* foi considerado como molécula anti-trombótica (Zingali *et al.*, 2005). Esta molécula pode ser extremamente útil no desenvolvimento de futuras drogas destinadas a indivíduos que apresentem desordens da coagulação sanguínea e têm risco de desenvolver trombos que podem evoluir para patologias mais graves como derrames. Ceraul e colaboradores (2008) demonstraram no trato digestório do carrapato *Dermacentor variabilis* uma molécula com atividade anti-tripsina cujo papel fisiológico seria o combate local a fungos, já que esses microorganismos utilizam enzimas com propriedades tripsina-like durante o curso da infecção ao hospedeiro.

Na utilização biotecnológica de inibidores de protease pode-se destacar o tratamento de células transformadas oncogeneticamente visando à inibição de enzimas

envolvidas na evolução da patologia em várias etapas da doença. Bortezomib (Velcade) foi o primeiro inibidor de protease aprovado para utilização em pacientes com câncer, que juntamente com outras drogas demonstrou melhora significativa nos pacientes que recebiam o inibidor como terapia (Fear et *al.*, 2007).

A diversidade de atividades biológicas dos inibidores de proteases tem estimulado o estudo da sua presença em fontes variadas visando a uma futura utilização biotecnológica dos inibidores isolados e caracterizados.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

- Isolar inibidor de tripsina e proteína anticoagulante da hemolinfa da aranha caranguejeira *Lasiodora* sp.

2.2 Específicos

- Isolar o inibidor de tripsina da hemolinfa através de cromatografia de gel filtração
- Avaliar o efeito das frações obtidas por cromatografia de gel filtração sobre Fator Xa, Fator XIIa, tripsina e trombina
- Isolar um inibidor de tripsina por cromatografia de troca-iônica em coluna de Mono-Q (FPLC)
- Isolar uma proteína anticoagulante da hemolinfa através de cromatografia de gel filtração
- Avaliar a atividade anti-coagulante das frações obtidas por cromatografia de gel filtração sobre o tempo de recalcificação e as via extrínseca e intrínseca da coagulação sangüínea
- Isolar a proteína anticoagulante por cromatografia de troca-iônica em coluna de Mono-Q (FPLC)
- Caracterizar as proteínas isoladas por eletroforese em gel de poliacrilamida.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADACHI, K.; HIRATA, T.; NISHIOKA, T.; SAKAGUCHI, M. **Hemocyte components in crustaceans convert hemocyanin into a phenoloxidase-like enzyme.** Comparative Biochemistry and Physiology Part B 134: 135–141, 2003.

ANDREOTTI, R.; GOMES, A.; MALAVAZI-PIZA, K. C.; SASAKI, S. D.; SAMPAIO, C. A.; TANAKA, A. S. **BmTI antigens induce a bovine protective immune response against *Boophilus microplus* tick.** International Immunopharmacology 2(4): 557-63, 2002.

AZZOLINI, S. S. **Estudos bioquímicos e funcionais do inibidor de serinoproteases presente em mosca-dos-chifres, *Haematobia irritans irritans*.** São Paulo, 2006, Tese (Doutorado) Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo.

AZZOLINI, S. S.; SASAKI, S. D.; TORQUATO, R. J.; ANDREOTTI, R.; ANDREOTTI, E.; TANAKA, A. S. ***Rhipicephalus sanguineus* trypsin inhibitors present in the tick larvae: isolation, characterization, and partial primary structure determination.** Archives of Biochemistry and Biophysics. 417(2):176-82, 2003.

BANG, F. B. **A bacterial disease of *Limulus polyphemus*.** Bull. Johns Hopkins Hosp. 98: 325-351, 1956.

BERTANI, R.; SILVA JÚNIOR, P.I.; LUCAS, S. In: **Mygalomorphae**, apostila Laboratório de Artrópodes Instituto Butantan Setembro de 1996.

BERTANI, R. **Revision, Cladistic Analysis, and Zoogeography of *Vitalius*, *Nhandu*, and *Proshapalopus*; with notes on other theraphosine genera (Araneae, Theraphosidae).**

Arquivos de Zoologia, São Paulo V. 36 (3), 2001.

BRAYNER, F.A.; ARAÚJO, H.R.C; CAVALCANTI, M.G.S.; ALVES, L.C; PEIXOTO, C.A.; **Ultrastructural characterization of the hemocytes of *Culex quinquefasciatus* (DIPTERA: Culicidae).** Micron 36: 359 – 367, 2005

BRILLARD-BOUDERT, M.; HAMDAOUI, A.; HAJJAR, E.; BOUDIER, C.; REUTER, N.; EHRET-SABATIER, L.; BIETH, J. G.; GAUTHIER, J. **A novel locust (*Schistocerca gregaria*) serine protease inhibitor with a high affinity for neutrophil elastase.** Journal of Biochemistry 400: 467-476, 2006.

CERENIUS, L.; SÖDERHÄLL, K. **The prophenoloxidase-activating system in invertebrates.** Immunological Reviews 198: 116-126, 2004.

CHERQUI, A.; CRUZ, N.; SIMÕES, N. **Purification and characterization of two serine protease inhibitors from the hemolymph of *Mythimna unipuncta*.** Insect Biochemistry and Molecular Biology 31: 761-769, 2001.

CODDINGTON, J.A.; LEVI, H.W. **Systematic and evolution of spiders (Araneae).** Annu. Rev. Ecol. Syst. 22: 565 – 592.

DONOVANT, M. A.; LAUE, T. M. **A novel trypsin inhibitor from hemolymph of the horseshoe crab *Limulus polyphemus*.** The Journal of Biological Chemistry 266: 2121-2125, 1991.

EIJK, M van; NOORDEN, C. J.; GROOT, C. de. **Proteinases and their inhibitors in the immune system.** International Review of Cytology, 222 :197-236, 2003.

FEAR, G.; KOMARNYTSKY, S.; RASKIN, I. **Protease inhibitors and their peptidomimetic derivatives as potential drugs.** Pharmacology e Therapeutics 113: 354–368, 2007.

FERREIRA, F. R. B. **Identificação e caracterização parcial de atividade hemaglutinante e inibidor de protease na hemolinfa da aranha caranguejeira *Lasiodora* sp.** Pernambuco, 2006. Monografia. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Pernambuco.

FRANSSENS, V.; SIMONET, G.; BREUGELMANS, B.; SOEST, S. V.; HOEF, V. V.; BROECK, J. V. **The role of hemocytes, serine protease inhibitors and pathogen-associated patterns in prophenoloxidase activation in the desert locust, *Schistocerca gregaria*.** Peptides 29: 235-241, 2008.

FOELIX, R. F. **In: Biology of spiders.** 2 Ed. Oxford University Press, 1996.

FOGAÇA, A. C.; ALMEIDA, I. C.; EBERLIN, M. N.; TANAKA, A. S.; BULET, P.; DAFFRE, S.. **Ixodidin, a novel antimicrobial peptide from the hemocytes of the cattle tick *Boophilus microplus* with inhibitory activity against serine proteinases.** Peptides 27: 667-674, 2006.

FUKUZAWA, A. H.; VELLUTINI, B. C.; LORENZINI, D. M.; SILVA JR, P. I.; MORTARA, R. A.; SILVA, J. M. C. DA; DAFFRE, S. **The role of hemocytes in the immunity of the spider *Acanthoscurria gomesiana*.** Developmental and Comparative Immunology 32 (6): 716-25, 2008.

FURUSAWA, T.; RAKWAL, R.; NAM, H.W.; HIRANO, M.; SHIBATO, J.; KIM, Y.S.; OGAWA, Y.; YOSHIDA, Y.; KRAMER, K.J.; KOUZUMA, Y.; AGRAWAL, G.K.; YONEKURA, M. **Systematic Investigation of the Hemolymph Proteome of *Manduca sexta* at the Fifth Instar Larvae Stage Using One- and Two-Dimensional Proteomics Platforms.** Journal of Proteomic Research 7: 938 – 959, 2008.

GETTINS, P. G. **Serpin structure, mechanism and function.** Chemistry Review 102: 4751-4804, 2002.

HOEBE, K.; JANSEN, E.; BEUTLER, B. **The interface between innate and adaptative immunity.** Nature Immunology 5: 971-974, 2004.

IWANAGA, S.; LEE, B. L. **Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals.** Journal of Biochemistry and Molecular Biology 38 (2): 128-150, 2005.

JIANG, H.; KANOST, M. R. **The clip-domain family of serine proteinases in arthropods** . Insect Biochemistry and Molecular Biology 30: 95-105, 2000.

KALAPOTHAKIS, E.; KUSHMERICK, C.; GUSMÃO, D. R.; FAVARON, G. O. C.; FERREIRA, A. J.; GOMEZ, M. V.; ALMEIDA, A. P. de. **Effects of the venom of a Mygalomorph spider (*Lasiodora* sp.) on the isolated rat heart**. Toxicon 41: 23-28, 2003.

KANOST, M. R. **Serine proteinase inhibitors in arthropod immunity**. Developmental and Comparative Immunology 23: 291-301, 1999.

KUSHMERICK, C.; CARVALHO, F. M de; MARIA, M. de; MASSENSINI, A. R.; ROMANO-SILVA, M. A.; GOMEZ, M. V.; KALAPOTHAKIS, E.; PRADO, M. A. M. **Effects of a *Lasiodora* spider venom on Ca^{2+} and Na^{+} channels**. Toxicon 39: 991-1002, 2001.

LAI, R.; TAKEUCHI, H.; JONCZY J.; REES, H. H.; TURNER, P. C. **A thrombin inhibitor from the ixodid tick, *Amblyomma hebraeum***. Gene 24;342(2): 243-9, 2004.

LASKOWSKI, M.; KATO, I. **Protein inhibitors of proteinases**. Ann. Ver. Biochemistry 49: 393-629, 1980

LASKOWSKI, M.; QASIM M. A. **What can the structures of enzyme-inhibitors complexes tell us about the structures of enzyme substrate complexes?** Biochimia

et Biophysica Acta 1477: 324-337, 2000.

LAVINE, M. D; STRAND, M. R. **Insect hemocytes and their role in immunity.** Insect Biochemistry and Molecular Biology 32 :1295–1309, 2002.

LIMA, C. A. **BmCistatina, Inibidor de cisteinoproteases presente em corpo gorduroso de carrapato *Boophilus microplus*: Clonagem, expressão, purificação e caracterização.** São Paulo, 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências). Escola Paulista de Medicina, Universidade de São Paulo.

MUTA, T.; IWANAGA, S. **The role of hemolymph coagulation in innate immunity.** Current Opin in Immunology 8: 41-47, 1996.

NAGAI, T.; OSAKI, T.; KAWABATA, S. **Functional conversion of hemocyanin to phenoloxidase by horseshoe crab antimicrobial peptides.** Journal of Biology Chemistry 276: 27166-27170, 2001.

NAPPI, A. J.; OTTAVIANI, E. **Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates.** Bioassays 22: 469-480, 2000.

POLANOWSKI A.; WILUSZ, T. **Serine proteinase inhibitors from insect hemolymph.** Acta Biochem. Pol. 43: 445-453, 1996.

PLATNICK, N. I. 2009. **The world spider catalog**, version 9.0. American Museum of Natural History, disponível em:

<http://research.amnh.org/entomology/spiders/catalog/index.html>

RASH, L. D.; HODGSON, W.C **Pharmacology and biochemistry of spiders venoms.**

Toxicon. 40: 225 – 254, 2002.

ROBERTS, R.M.; MATHIALAGAN, N.; DUFFY, J.Y.; SMITH, G.W.; **Regulation and regulatory role of proteinase inhibitors.** Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression 5(3-4): 385-436, 1995.

SASAKI, S. D.; AZZOLINI, S. S.; HIRATA, I. Y.; ANDREOTTI, R.; TANAKA, A. S. ***Boophilus microplus* tick larvae, a rich source of Kunitz type serine proteinase inhibitors.** Biochimie. 86 (9-10): 643-9, 2004.

SASAKI, S. D.; COTRIN, S. S.; CARMONA, A. K.; TANAKA, A. S. **An unexpected inhibitory activity of Kunitz-type serine proteinase inhibitor derived from *Boophilus microplus* trypsin inhibitor on cathepsin L.** Biochemical and Biophysical Research Communications 341: 266–272, 2006.

SASAKI, S. D.; TANAKA, A. S. **rBmTI-6, a Kunitz-BPTI domain protease inhibitor from the tick *Boophilus microplus*, its cloning, expression and biochemical characterization.** Vet. Parasitol. doi:10.1016/j.vetpar.2008.03.031, 2008.

SHRIVASTAVA, B.; GHOSH, A.K. **Protein purification, cDNA cloning and characterization of a protease inhibitor from the Indian tasar silkworm, *Antheraea mylitta*.** Insect Biochemistry and Molecular Biology. 33: 1025 – 1033, 2003.

SILVA, C. C. A. da. **Aspectos do sistema imunológico dos insetos.** Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento 24: 68-72, janeiro e fevereiro de 2002.

SILVA JÚNIOR, P. I. **Sistema imune em aracnídeos: estrutura química e atividade biológica de peptídeos antimicrobianos da hemolinfa da aranha *Acanthoscurria gomesiana*.** São Paulo, 2000. Dissertação (Doutorado em Ciências). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.

SILVERMAN, G. A.; BIRD, P. I.; CARREL, R. W.; CHURCH, F. C.; COUGHLIN, P. B.; GETTINS, P. G.; IRVING, J. A.; LOMAS, D. A.; LUKE, C. J.; MOYER, R. W.; PEMBERTON, P. A.; REMOLD-O'DONNELL, E.; SALVESEN, G. S.; TRAVIS, J.; WHISSTOCK, J. C. **The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature.** Journal Biology Chemistry 7; 276(36): 33293-6, 2001.

SIMONET, G.; CLAEYS, I; BROECK, J. V. **Structural and functional properties of a novel serine protease inhibiting peptide family in arthropods.** Comparative Biochemistry and Physiology Part B 132: 247-255, 2002.

SOARES, T. **Purificação e caracterização parcial do inibidor de elastase de hemócitos da aranha caranguejeira *Lasiodora* sp.** Pernambuco, Monografia. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Pernambuco, 2008.

TANAKA, A.S.; ANDREOTTI, R.; GOMES, A.; TORQUATO, R. J. S.; SAMPAIO, U. M.; SAMPAIO, C. A. M. **A double headed serine proteinase inhibitor – human plasma kallikrein and elastase inhibitor – from *Boophilus microplus* larvae.** Immunopharmacology 45: 171-177, 1999a.

TANAKA, A. S.; SILVA, M. M.; TORQUATO, R. J.; NOGUTI, M. A.; SAMPAIO, A.; FRITZ, H.; AUERSWALD, E. A. **Functional phage display of leech-derived tryptase inhibitor (LDTI): construction of a library and selection of thrombin inhibitors.** FEBS Lett. 10; 458(1):11-6, 1999b.

TREMBLAY, G. M.; JANELLE, M. F.; BOURBONNAIS, Y. **Anti-inflammatory activity of neutrophil elastase inhibitors.** Current Opinion Investigation. Drugs 4: 556-565, 2003.

THEOPOLD, U.; LI, D.; SCHEFER, C.; SCHMIDT, O. **The coagulation of insect hemolymph.** CMLS Cell. Mol. Life Sci. 59: 363 – 372, 2002.

VEGA, F. J.; ALBORES, F. V. **A four-Kazal domain protein in *Litopenaeus vannamei* hemocytes.** Developmental and Comparative Immunology 29: 385-391, 2005.

VIEIRA, A. L. G.; MOURA, M. B.; BABÁ, E. H.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C.; KALAPOTHAKIS, E.; CASTRO, I. M. **Molecular cloning of toxins expressed by the venom gland of *Lasiadora* sp.** Toxicon 44: 949-952, 2004.

WANG, Y.; JIANG, J. **Purification and characterization of *Manduca sexta* serpin-6: a serine proteinase inhibitor that selectively inhibits prophenoloxidase-activating proteinase-3.** Insect Biochemistry and Molecular Biology 34: 387-395, 2004.

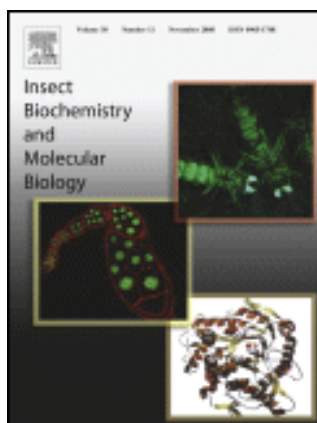
ZINGALI, R.B., FERREIRA, M.S., ASSAFIM, M., FRATTANI, F.S., MONTEIRO, R.Q., **Bothrojaracin, a *Bothrops jararaca* snake venom-derived (pro)thrombin inhibitor, as an anti-thrombotic molecule.** Pathophysiology of haemostasis and thrombosis 34, 160 – 163, 2005.

ZHU, K.; BOWMAN, A.S.; BRIGHAM, D.L.; ESSENBERG, R.C.; DELLWITH, J.W.; SAUER, J. R. **Isolation and characterization of americanin, a specific inhibitor of thrombin, from the salivary glands of the star tick *Amblyomma americanum*.** Experimental Parasitology, 87 : 30-38, 1997.

ZHU, Y.; WANG, Y.; GORMAN, M.; JIANG, H.; KANOST. ***Manduca sexta* serpin-3 regulates prophenoloxidase activation in response to infection by inhibiting prophenoloxidase-activating proteinases.** Journal of Biology and Chemistry 278: 46556-64, 2003.

4. ARTIGO A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO

Insect Biochemistry and Molecular Biology (Impacto: 2,8)



Isolation of trypsin inhibitor and anti-coagulant protein from hemolymph of tarantula spider Lasiodora sp.

Felipe R. B. Ferreira, Tatiana Soares, Luana Cassandra B. B. Coelho, Maria do Socorro de
Mendonça Cavalcanti, Patrícia Maria Guedes Paiva, Russolina B. Zingali

**Isolation of trypsin inhibitor and anti-coagulant protein from
hemolymph of tarantula spider *Lasiodora* sp.**

Felipe R. B. Ferreira¹, Tatiana Soares¹, Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho¹, Maria do Socorro de
Mendonça Cavalcanti², Patrícia Maria Guedes Paiva^{*1}, Russolina B. Zingali³

¹Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

²Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

³Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro,
Brazil.

*e-mail address: ppaivaufpe@yahoo.com.br; tel: +55-81-2126.8541 fax: +55-81-2126.8540

Abstract

Protease inhibitor and anti-coagulant protein were purified from hemolymph of tarantula spider *Lasiodora* sp. The inhibitor was active on trypsin and was denominated LPTI (*Lasiodora* plasma trypsin inhibitor) and protein anti-coagulant denominated LPA (*Lasiodora* plasma anti-coagulant) inhibited significantly intrinsic pathway of coagulation cascade. LPA no significantly inhibited extrinsic pathway. LPTI did not affect the intrinsic pathway and the LPA did not present a protease inhibitor activity against trypsin. The 72 kDa molecular mass of both LPTI and LPA were determined by SDS-PAGE. Few inhibitors and anti-coagulant proteins have been purified from arachnids, and isolation of these molecules is the first step to elucidating their physiological role in these animals.

Keywords: Anti-coagulant; Blood-Clotting; Hemolymph; *Lasiodora*; plasma; Trypsin inhibitor; Spider.

1. Introduction

In invertebrates the protection against microbial infection can be achieved through cellular and humoral immune defenses (Fukuzawa et al., 2007). The cellular defense consists of encapsulation, nodulation, and phagocytosis of microbes by hemocytes, while humoral response comprises factors related to the recognition of invading microorganisms, melanization and coagulation promoted by serine proteases (Brayner et al., 2005).

It is known that polysaccharides and other compounds typically associated with microorganisms to active the phenoloxidase enzyme resulting in the activation of coagulation cascade with production of melanin and toxic quinones (Cerenius & Söderhäll, 2004). The hemolymph of arthropods contains pro-phenoloxidase that is converted to phenoloxidase by action of serine proteases such as proPO-activating proteinase 3 (PAP-3). The proteolysis of pro-phenoloxidase is a defense mechanism in insects (Wan & Jiang, 2004).

Protease inhibitors are classified into 5 groups (serine, threonine, cysteine, aspartyl and metalloprotease inhibitors) according to the mechanism employed at the active site of proteases that they inhibit (Fear et al., 2007). Among the families of protease inhibitors, Serpins and Cystatins are best characterized (Mangan et al., 2008; Turk et al., 2008). Serpins are active against serine or cysteine proteases (Mangan et al., 2008) and contains conserved tertiary structures consisting of 9 α -helices (denotated A-I) and three β -sheets (denoted A-C). The regions important for protease inhibition are centered on β -sheets A and the reactive center loop (Mangan et al., 2008).

Insects exhibits a large quantity of proteases, but relatively few enzyme inhibitors and insect protease inhibitors are able to inhibit more than one type of protease participating in several physiologic processes (Brillard-Bourdet et al., 2006). The presence of protease

inhibitors has been demonstrated in the hemolymph of arthropods and those isolated from tobacco hornworm (*Manduca sexta*), *Drosophila melanogaster*, *Anopheles gambiae* were classified as serpins (Wang et al., 2004).

Spiders are the most diverse and successful terrestrial invertebrates, excluding insects, which are their primary prey (Rash et al., 2002). They are distributed all over the world in 40.462 species (Platnick, 2009). The Brazilian spider *Lasiodora* sp (Mygalomorphae, Theraphosidae) is known by trivial name of caranguejeira or tarantula and is distributed in Northeastern Region of Brazil in the Forest Rain (Bertani, 2001). There are few studies about *Lasiodora* and just about their venom (Dutra et al, 2008). To our knowledge there is no report of protease inhibitor from hemolymph of spiders and this paper describes the purification of a trypsin inhibitor and an anti-coagulant protein from hemolymph of *Lasiodora* sp.

2. Materials and methods

2.1 Lasiodora sp

The animals used in the experiments were adult females in the intermolt stage. Spiders were kept in the Laboratório de Glicoproteínas, Universidade Federal de Pernambuco, Brazil, in plastic boxes covered by stones and given cotton soaked with water. Bovine meat was used to feed the spiders once every week. Hemolymph was collected from 16 spiders (approximately 1 ml per animal) by cardiac puncture with an apyrogenic syringe in presence of 3% (w/v) NaCl supplemented with 2 mM of propanolol to avoid coagulation. The hemocytes were removed from hemolymph by centrifugation at 800g for 10 minutes at 28 °C and aliquots (4 ml) of plasma were dried by lyophilisation.

2.2 Trypsin-Sepharose Chromatography

Plasma (20 mg of protein) was applied onto a trypsin-Sepharose column (0.6 x 7 cm) equilibrated at 10 mL/h flow rate with 50 mM Tris-HCl buffer pH 8.0 (10 mL). The unabsorbed proteins were eluted with equilibrating solution until the absorbance at 280 nm was negligible. Then the adsorbed proteins were eluted with 0.5 M KCl-HCl buffer pH 2.0 (10 mL). The fractions obtained with KCl-HCl buffer from column were pooled, dialyzed (4 h at 4°C) against 20 mM Tris-HCl buffer pH 8.0 (2L) for eluent elimination and evaluated for protein content and trypsin inhibitory activity.

2.3 Gel filtration chromatography

Dried plasma was reconstituted in 2ml (40mg) of Milli-Q water and 1ml (20mg) was applied onto a Sephadex G-100 column (0.5cm x 50 cm) equilibrated with 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0 at a flow rate of 0.32 ml/min. Fractions (2 ml) were collected and monitored for protein (absorbance at 280 nm) and trypsin inhibitory activity as described below. The active fractions were pooled and called crude trypsin inhibitor.

2.4 Anion exchange chromatography

Mono-Q column (HR 55 from GE Healthcare, USA) connected to FPLC system was equilibrated with 20 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0 at flow rate of 0.4 ml/min. Crude trypsin inhibitor (90.3 µg) from Sephadex G-100 chromatography was applied on column and fractions (1 ml) were collected during 90 min. Adsorbed proteins were eluted with 0 – 1 M NaCl gradient in the equilibrium buffer. Protein was monitored by absorbance at 214 nm and 280 nm. Fractions containing trypsin inhibitory activity (*Lasiodora* plasma trypsin inhibitor, LPTI) and those containing anticoagulant activity (*Lasiodora* plasma

anticoagulant, LPA) were pooled, desalted by dialysis (6 h against 20 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0 at 4°C).

2.5 Protein determination

The soluble protein concentrations were determined by Coomassie Blue dye binding method (Bradford, 1976) and according Lowry et al. (1951). Bovine serum albumin as used as standard.

2.6 SDS-PAGE analysis

Crude trypsin inhibitor, LPTI and LPA were analyzed by sodium dodecil sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE) according to Laemmli (1970). The concentration of acrylamide was 12% in the separating gel and 5% in the stacking gel. Gels were stained with Comassie Blue R-250. The molecular weight standards were phosphorylase b (97 kDa), albumin (66 kDa), glutamic ovalbumin (45kDa), carbonic anhydrase (30 kDa), trypsin inhibitor (20.1 kDa), and α -lactalbumin (14.4 kDa) from Sigma.

2.7 Protease inhibition assay

The assay was performed with bovine trypsin (4 nM in 0.1 M Tris-HCl containing 0.15 M NaCl, pH 8.0). Pre-incubation (37°C, 10 min) of enzyme with hemolymph (100 - 1000 μ g), crude trypsin inhibitor (0.32 - 8 μ g), LPTI (0.1 μ g) or LPA (0.1 μ g) in the presence of Tris-HCl 0.1M pH 8.0 was followed by addition of 0.2 mM N- α -benzoyl-DL-arginyl-p-nitroanilide (BAPNA) or 0.08 nM HD-Pro-Phe-Arg-pNA (S-2302) chromogenic

substrate from Chromogenix (Mölndal, Sweden) dissolved in dimethyl sulfoxide (BAPNA) or diluted with 0.02 M Tris-HCl buffer, pH 7.4 (S-2302). The substrate hydrolysis was followed by measuring the absorbance at 405 nm, and the inhibitory activity evaluated the remaining hydrolytic activity towards BAPNA or S-2302.

Inhibition of thrombin (0.5 nM, 50 µl) and factor Xa (2.5 nM, 50 µl) was performed by incubating (37 °C for 15 min) the enzyme with crude trypsin inhibitor (5.3 µg, 25 µl) in 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.02mg/ml PEG 600 buffer. Chromogenic substrates S-2238 (0.1mM HD-Phe-Pip-Arg-pNA, 25 µl for thrombin) and S-2765 (0.2 nM Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA, 25 µl for factor Xa) from Chromogenix (Mölndal, Sweden) were added and the reaction measured at 405 nm after 30 min at 37 °C.

Inhibition of factor XIIa was determined according to Vinazzer (1979) using a chromogenic substrate for plasma kalikrein. Human plasma samples (50µl) were incubated (37°C, 10 min) with crude trypsin inhibitor (0.5-3 µg, 50µl) in 0.02 M Tris-HCl buffer, pH 7.4 (50 µl). Following APTT reagent (Wiener lab, Argentina) was added (50 µl). Following 30 µl of the reaction mixture was removed, mixed with chromogenic substrate S2302 (0.4 nM, 50 µl) and after incubation (37 °C, 10 min) the absorbance at 405 nm was measured.

Control reactions were performed under the same conditions, but in the absence of *Lasiadora* samples.

2.8 Recalcification time assay

Citrated human plasma (50µl) was incubated (37 °C, 10 min) with crude trypsin inhibitor (0.5-3 µg, 20 µl), LPTI (20 µl) or LPA (20 µl), in 0.02 M Tris buffer saline, pH 8.0 (TBS buffer, 20 µl) pre-heated (37 °C). After incubation (37 °C, 1 min) 25 mM CaCl₂

(100 µl) was added and clotting time was determined. Control was performed at absence of protein.

2.9 Activated partial thromboplastin time assay

Activated partial thromboplastin time (APTT) was carried out using the activated partial thromboplastin time reagent (Wiener lab, Argentina). Briefly, citrated human plasma (50 µl) was incubated (37 °C, 10 min) with crude trypsin inhibitor (0.5-3 µg, 50 µl), LPTI (50 µl) or LPA (50 µl) and TBS buffer (50 µl) was added. After 1 min APTT reagent (50 µl) pre-heated (37 °C) was added and incubation (37 °C, 1 min) was performed. Following, pre-heated 25 mM CaCl₂ (100 µl) was added and clotting time was measured.

2.10 Prothrombin time assay

The prothrombin time (PT) was performed using thromboplastin reagent (Wiener lab, Argentina). Citrated human plasma (50 µl) was incubated (37 °C, 10 min) with crude trypsin inhibitor (0.5 - 3 µg, 50 µl), LPTI (50 µl) or LPA (50 µl) and TBS buffer (50 µl) was added. After 1 min PT reagent (100 µl) pre-heated (37 °C) was added and clotting time was measured.

2.11 Statistic analysis

Data are presented as mean $\pm$ S.E.M. Student's t-test for nonpaired data was developed and significant difference between groups was analyzed at $p < 0.05$ using the Microsoft Excel® (Microsoft Corporation, USA).

3. Results

3.1 Characterization of crude trypsin inhibitor

Lasiadora plasma (1000 μ g) with trypsin inhibitory activity (96%) was submitted to chromatography on trypsin-Sepharose aiming to isolate the trypsin inhibitor. The chromatography profile showed one unadsorbed peak and one peak of adsorbed protein eluted with KCl-HCl (Fig. 1). Evaluation of trypsin inhibitory activity revealed absence of activity in all chromatographic fractions. SDS-PAGE of KCl-HCl eluted fractions showed polypeptide of 72 kDa (Fig. 1, insert).

In order to obtain the active inhibitor *Lasiadora* plasma was submitted to chromatography on Sephadex G-100 and the inhibitor was detected in the second protein peak (Fig. 2A). The preparation called crude trypsin inhibitor (Fig. 2A, insert) showed multiple polypeptides (molecular masses ranging 66 to 120 kDa) by SDS-PAGE (Fig. 2B).

The major peak of the chromatography contains the hemocyanin a described component of spider plasma.

Crude trypsin inhibitor did not inhibit some serine proteases of coagulation cascade such as thrombin, factor Xa and factor XIIa but interfered with the coagulation time of human plasma.

Recalcification time was significantly prolonged and the plasma clotting was not observed when 3 μ g of crude trypsin inhibitor was used (Fig. 3A). Similarly, the intrinsic pathway (APTT) was significantly inhibited (Fig. 3B). The crude trypsin inhibitor only slightly altered the Prothrombin Time (extrinsic pathway) of blood coagulation (Fig. 3C). The experiments indicate the presence of anti-coagulant activity in crude trypsin inhibitor.

3.2 Isolation of LPTI and LPA

Crude trypsin inhibitor was applied onto a Mono Q column in order to separate the trypsin inhibitor from anti-coagulant. Chromatographic profile showed three main protein peaks eluted with NaCl gradient (Fig. 4) that were assayed for trypsin inhibitory and anti-coagulant activities (recalcification time, APTT and PT). Trypsin inhibitor (LPTI) was only detected in peak I (inhibition of 32%) and anticoagulant (LPA) was only detected in peak III (recalcification time and APTT were prolonged in relation to control). None of the tested activities assayed was found in peak II. SDS-PAGE showed that both LPTI and LAP had apparent molecular mass 72 kDa (Fig. 4, insert).

4. Discussion

This paper reports the isolation of proteins from hemolymph of tarantula spider *Lasidora* sp. with trypsin inhibitory (LPTI) and anti-coagulant activities (LAP). The molecular mass of both proteins (72 kDa) is similar to that of protease inhibitors of the Serpin superfamily. Trypsin inhibitors of arthropods showed variable molecular masses and those isolated from hemolymph of *Mythimna unipuncta*, *Anthera milita* and *Manduca sexta* have 52, 10.4 and 46.7 kDa, respectively (Cherqui et al., 2001, Shrivasta et. al., 2003, Wang & Jiang, 2004). LPTI was showed a larger molecular mass than the trypsin inhibitor from the hemolymph of horseshoe crab (15 kDa) that belongs to the same subphylum Chelicerata (Donovant et al., 1991).

The chromatography profile of trypsin-Sepharose column showed unadsorbed and adsorbed protein peaks without trypsin inhibitory activity. The SDS-PAGE profile showed single polypeptide in the fraction eluted with KCl-HCl, nevertheless no inhibitory activity

was detected. Probably the interaction of the inhibitor with the enzyme immobilized on matrix resulted in loss of inhibitory activity toward trypsin. This effect may be due by structural modification characteristic of the serpin family since loss of activity of protease inhibitor is described after interaction with their target enzyme (Reichhart, 2005).

Crude trypsin inhibitor failed to inhibit thrombin, factor Xa and factor XIIa, but significantly prolonged APTT (extrinsic pathway) and did not affect PT (intrinsic pathway). Accordingly LPA (the purified fraction derived from crude material) had no effect on PT, although it altered recalcification time and APTT. The lack of inhibition of factor XIIa of intrinsic pathway may indicate that alteration of APTT was due to action of crude trypsin inhibitor on other activated factors of this pathway. Inhibitors that impede blood coagulation were isolated from snakes venom and arthropods (Zingali et al. 2005, Carrijo-Carvalho et al., 2007). Kunitz inhibitors with thrombin inhibitory and anti-coagulant activities were isolated from hemolymph of ticks *Amblyomma hebraeum* and *Dermacentor variabilis*, respectively (Lai et al., 2004, Ceraul et al., 2008).

Studies have demonstrated that serpins from *M. sexta* hemolymph inhibits PAP-3, a serine protease of coagulation cascade in insects (Zou et al., 2005). Decker et al. (1998) revealed that hemocyanin from tarantula *Eurypelma californicum* treated with trypsin showed phenoloxidase activity indicating that probably a trypsin inhibitor is involved in the control of activation of pro-phenoloxidase. It has been also described that serpins from *Drosophila* are involved in the control of proteases that participate in the immune response (Reichhart, 2005).

Serpins were first described as regulators of blood coagulation, inflammation and complement activation and attention has been directed towards serpins because mutations in these proteins cause diseases in humans such as emphysema, cirrosis and dementia, or

blood-coagulation disorders (Reichhart, 2005). Serpins avoids tissue damage and premature death of immune system cells in vertebrates (Mangan et al., 2008) and the effect on mammalian proteases has stimulated investigations about their use as drugs to control of cancer and *diabetes mellitus* or to control virus, fungi and inflammation (Fear et al., 2007). To our knowledge LPTI and LPA are the first trypsin inhibitor and anti-coagulant described in plasma of spider. The biological properties of LPTI and LPA encourage studies of structural and functional characterization of these inhibitors. Knowledge of the molecular mechanism involved in the interaction LPTI and LPA and their target proteases may indicate the possible biotechnology application of these inhibitors.

5. Conclusion

LPTI and LAP may participate in defense mechanism of *Lasiodora* through control of the coagulation cascade by inhibition of production of fenoloxidase and coagulant proteases avoiding tissue damage due to unwanted proteolysis with production of phenols and quinones of high chemical reactivity.

Acknowledgments

The authors express their gratitude to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and to the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for research grants. Authors are deeply grateful to Ana Lúcia Carvalho, Maria Barbosa Reis da Silva and Patrícia Guimarães for their technical assistance.

References

Bertani, R. 2001. Revision, Cladistic Analysis, and Zoogeography of *Vitalius*, *Nhandu*, and *Proshapalopus*; with notes on other theraphosine genera (Araneae, Theraphosidae). Arquivos de Zoologia, São Paulo V. 36 (3)

Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem 72, 248-254

Brillard-Boudert, M., Hamdaoui, A., Hajjar, E., Boudier, C., Reuter, N., Ehret-Sabatier, L., Bieth, J.G., Gauthier, F., 2006. A novel locust (*Schistocerca gregaria*) serine protease inhibitor with a high affinity for neutrophil elastase. Biochem Journal 400, 467-476.

Brayner, F.A.; Araújo, H.R.C; Cavalcanti, M.G.S.; Alves, L.C; Peixoto, C.A.; 2005. Ultrastructural characterization of the hemocytes of *Culex quinquefasciatus* (DIPTERA: Culicidae). Micron 36: 359 – 367.

Carrijo-Carvalho, L.C., Chudzinski-Tavassi, A.M., 2007. The venom of the *Lonomia* caterpillar: an overview. Toxicon 49, 741 – 757.

Ceraul, S.M., Lesnick-Dreher, S.M., Mulenga, A., Rahman, M. S., Azad, A. F., 2008. Functional characterization and novel rickettsiostatic effects of a Kunitz-type serine protease inhibitor from the tick *Dermacentor variabilis*. Infection and Immunity, 76, 5429 – 5435.

Cerenius, L. & Söderhäll, K. 2004. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunological Reviews* 198, 116-126.

Cherqui, A., Cruz, N., Simões, N., 2001. Purification and characterization of two serine protease inhibitors from the hemolymph of *Mythimna unipuncta*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 31, 761 – 769.

Decker, H., Rimke, T., 1998. Tarantula hemocyanin shows phenoloxidase activity. *The Journal of Biological Chemistry* 273, 25889 – 25892.

Donovan, M. A., Laue, M., 1991. A novel trypsin inhibitor from the hemolymph of the horseshoe crab *Limulus polyphemus*. *The Journal of Biological Chemistry* 266, 2121 – 2125.

Dutra, A.A., Sousa, L.O., Resende, R.R., Brandão, R.L., Kalapothakis, E., Castro, I.M., 2008. Expression and characterization of LTx2, a neurotoxin from *Lasiodora* sp. effecting on calcium channels. *Peptides* 29, 1505 – 1513.

Fear, G., Komarnytsky, S., Raskin, I. 2007. Protease inhibitors and their peptidomimetic derivatives as potential drugs. *Pharmacology & Therapeutics* 113, 354–368.

Fogaça, A.C., Almeida, I.C., Eberlin, M.N., Tanaka, A.S., Bulet, P., Daffre, S., 2006. Ixodidin, a novel antimicrobial peptide from the hemocytes of the cattle tick *Boophilus microplus* with inhibitory activity against serine proteinases. *Peptides* 27, 667-674.

Fukuzawa, A.H., Vellutini, B.C., Lorenzini, D.M., Jr, P.I.S., Mortara, R.A., Silva, J.M.C., Daffre, S., 2007. The role of hemocytes in the immunity of the spider *Acanthoscurria gomesiana*. *Developmental and Comparative Immunology* 32 (6), 716-25.

Han, J., Zhang, H., Min, G., Kemler, D., Hashimoto, C., 2000. A novel *Drosophila* serpin that inhibits serine proteases. *FEBS Letters* 468, 194 – 198.

Iwanaga, S., Lee, B.L., 2005. Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 38 (2), 2 128-150.

Kamal, A.H., Tefferi, A., Pruthi, R.K., 2007. How to interpret and pursue an abnormal prothrombin time, activated partial thromboplastin time, and bleeding time in adults. *Mayo Clinic Proceeding* 82 (7), 864 – 873.

Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural protein during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Lai, R., Takeuchi, H., Jonczy, J., Rees, H. H., Turner, P. C., 2004. A thrombin inhibitor from the ixodid tick, *Amblyomma hebraeum*. *Gene* 342, 243 – 249.

Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Ferr, A.L.; Rendell, R.J., 1951. Protein measurement with the follin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.

Mangan, M.S.J., Kaiserman, D., Bird, P.I., 2008. The role of serpins in vertebrates immunity. *Tissue Antigens* 72, 1-10.

Pike, R.B., Buckle, A. M., Bonniec, B.F., Church, F., 2005. Control of the coagulation system by serpins getting by with a little help from glycosaminoglycans. *FEBS Journal* 272, 4842 – 4851.

Platnick, N. I. 2008. The world spider catalog, version 9.0. American Museum of Natural History, online at <http://research.amnh.org/entomology/spiders/catalog/index.html>

Rash, L. D., Hodgson, W.C., 2002. Pharmacology and biochemistry of spiders venoms. *Toxicon*. 40, 225 – 254.

Robertson, A. S., Belorgey, D., Gubb, D., Dafforn, T.R., Lomas, D.A., 2006. Inhibitory activity of the *Drosophila melanogaster* serpin necrotic is dependent on lysine residues in the D-helix. *The Journal of Biological Chemistry*. 281, 26437 – 26443.

Reichhart, J. M., 2005. Tip of another iceberg: *Drosophila* serpins. *TRENDS in Cell Biology* 15 (12), 659 – 665.

Shrivasta, B., Ghosh, A.K., 2003. Protein purification, cDNA cloning and characterization of a protease inhibitor from the Indian tasar silkworm, *Antheraea mylitta*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 33, 1025 – 1033.

Turk, V., Stoka, V., Turk, D., 2008. Cystatins: Biochemical and structural properties, and medical relevance. *Frontiers in Bioscience* 13, 5406 – 5420.

Vinazzer, H., 1979. Assay of total factor XII and of activated factor XII in plasma with chromogenic substrate. *Thrombosis Research* 14, 155-166.

Wang, Y., Jiang, H., 2004. Purification and characterization of *Manduca sexta* serpin-6: a serine proteinase inhibitor that selectively inhibits prophenoloxidase-activating proteinase-3. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 34, 387-395.

Zou, Z., Jiang, H., 2005. *Manduca sexta* serpin-6 regulates immune serine proteinases PAP-3 and HP8. *The Journal of Biological Chemistry* 280, 14341 – 14348.

Zingali, R.B., Ferreira, M.S., Assafim, M., Frattani, F.S., Monteiro, R.Q., 2005. Bothrojaracin, a *Bothrops jararaca* snake venom-derived (pro)thrombin inhibitor, as an anti-thrombotic molecule. *Pathophysiology of haemostasis and thrombosis* 34, 160 – 163.

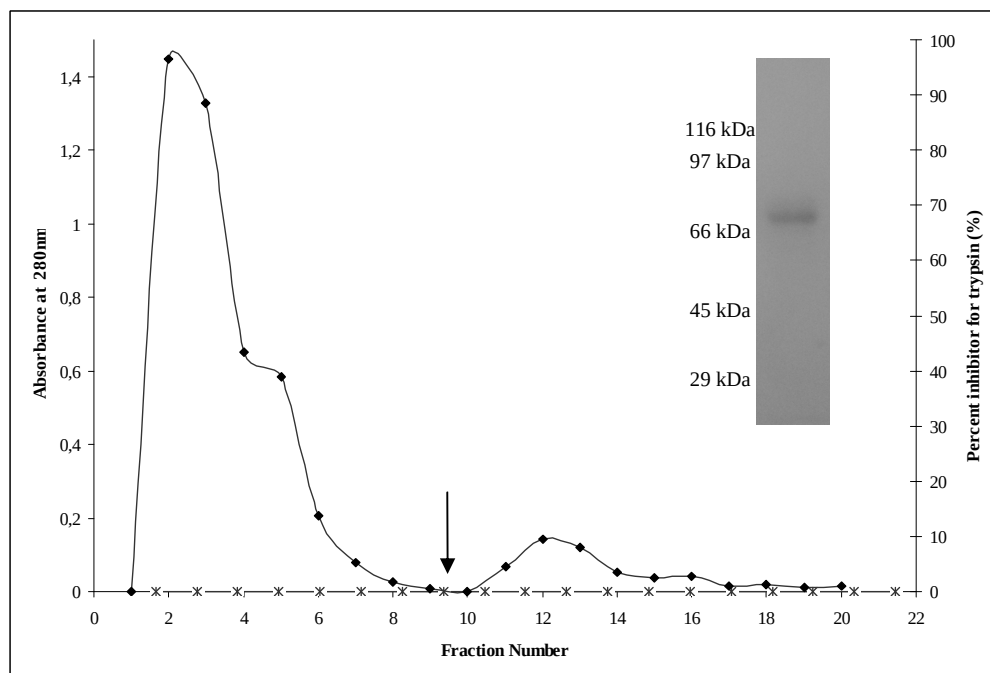


Figure 1. Chromatography of *Lasiodora* plasma (20 mg of protein) on trypsin-Sepharose column (0.6 x 7 cm). Washing step used 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0. Arrow indicates the addition of 0.5 M KCl-HCl, pH 2.0. Fractions of 1.0 mL were collected. Absorbance at A280 nm (•). Trypsin inhibitory activity was not detected. SDS-PAGE (12%) of fractions collected with KCl-HCl (insert).

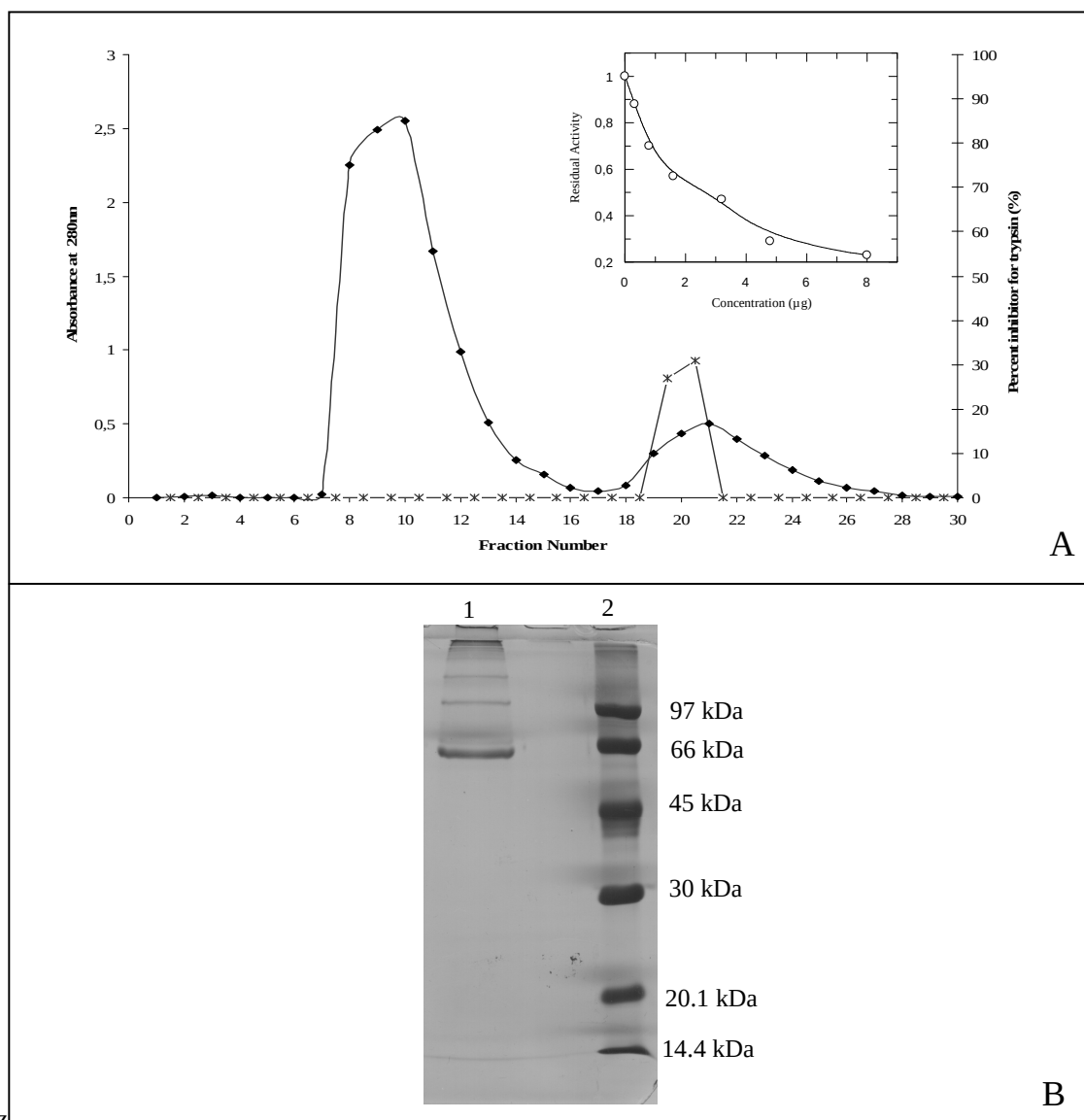


Figure 2. (A) Chromatography of *Lasiodora* plasma (20 mg of protein) on Sephadex G-100. Fractions with trypsin inhibitory activity were pooled (crude trypsin inhibitor) and evaluated against trypsin (insert). Absorbance at A_{280} nm (•) and trypsin inhibitory activity (x). (B) SDS-PAGE (12%) of crude trypsin inhibitor (lane 1) and standard marker (lane 2).

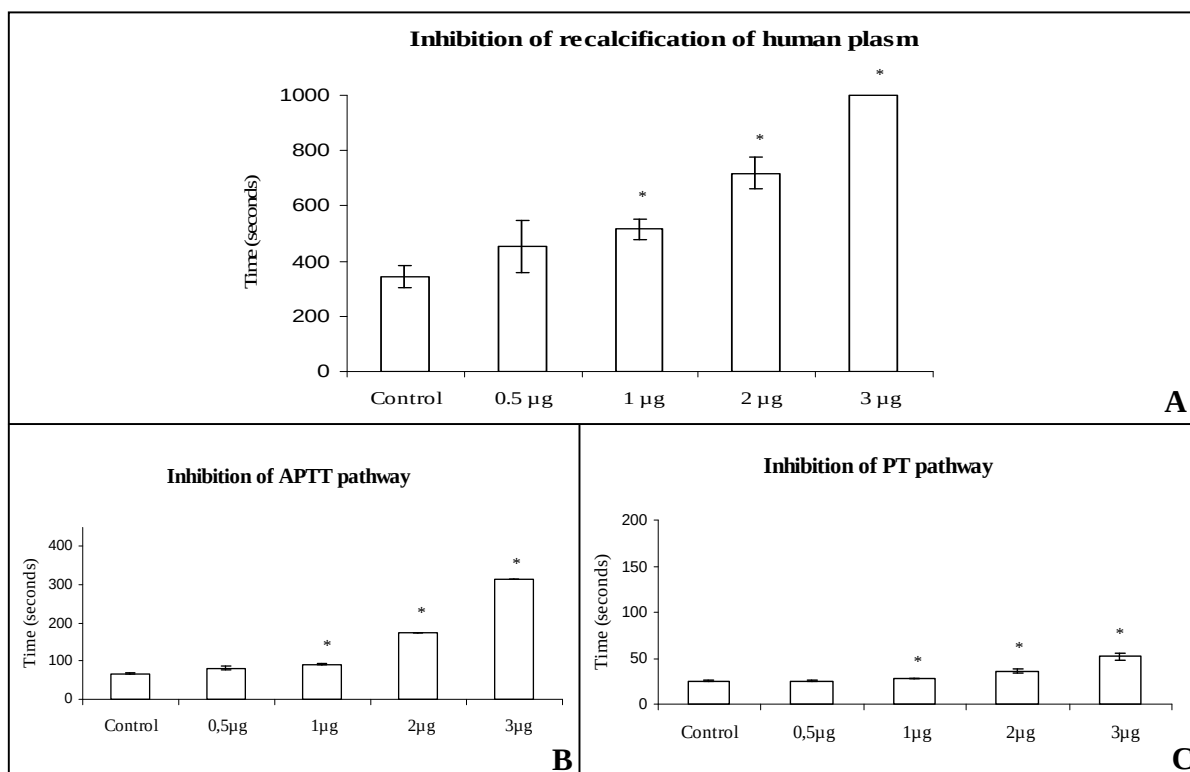


Figure 3. Effect of crude trypsin inhibitor on blood-clotting. (A) Recalcification time, (B) intrinsic pathway (APTT), and (C) extrinsic pathway (PT). * Values significantly different at $p < 0.05$ in relation at control.

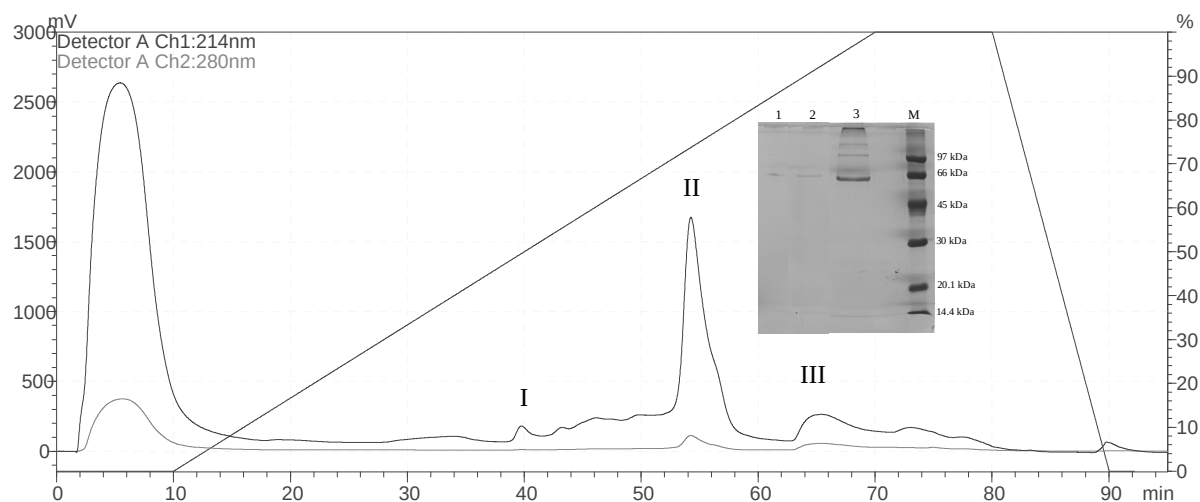


Figure 4. Isolation of LPTI and LPA from crude trypsin inhibitor by anion exchange chromatography. Mono-Q column (HR 55 from GE Healthcare, USA) connected to FPLC system was equilibrated with 20 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0 at flow rate of 0.4 ml/min. Crude trypsin inhibitor (90.3 μ g), was applied on column. The peak I corresponds to LPTI and the peak III to LPA. SDS-PAGE (insert) of LPA (lane 1), LPTI (lane 2), crude trypsin inhibitor (lane 3), and standard marker (lane M).

5. CONCLUSÃO

- Plasma de *Lasiadora* sp contém inibidor de tripsina (LPTI) e proteína anti-coagulante (LPA) de mesma massa molecular.
- A perda de atividade de LPTI após cromatografia de afinidade em coluna de tripsina-Sepharose sugere ser este um inibidor do tipo Serpina.
- LPA interfere na coagulação sanguínea principalmente na via intrínseca.

6. ANEXOS

Instructions to Authors Insect Biochemistry and Molecular Biology

Manuscript Preparation

General: See Guide to Online Submission ( <http://authors.elsevier.com/jnlmr/390>).

Manuscripts must be double-spaced with wide margins, page numbers (mandatory) and line numbers (optional). A single corresponding author should be identified (include a Fax number and E-mail address). Note that the email address of the corresponding author will be used for all editorial correspondence, and ultimately for sending proofs. Full postal address must be given for all co-authors. Authors should consult a recent issue of the journal for style if possible. The Editors reserve the right to adjust style to certain standards of uniformity.

Text: Follow this order when preparing manuscripts: Title, Authors, Affiliations, Abstract, Keywords, Main text, Acknowledgements, List of supplementary on-line material (if applicable), References, Illustrations, Figure Captions and then Tables and supplementary on-line material (if applicable). Do not import the Figures or Tables into your text. The corresponding author should be identified with an asterisk and footnote. Footnotes should be avoided and italics should not be used for emphasis.

- *Key Words.* A short list (5-8) of key words provided for rapid scanning of the contents of the paper and used for compiling the index
- *Introduction.* This should contain a brief survey of the relevant literature and the reasons for doing the work.

- *Materials and Methods*. Sufficient information should be given to permit repetition of the experimental work.
- *Results*. These should be presented concisely. Only in exceptional cases will it be permissible to present the same set of results in both a table and a figure. Full details of replication of results and statistical significance of differences claimed should be given.
- *Discussion*. This should deal with the significance of the results and their relationship to the object of the work. Comparison with relevant published work should be made and conclusions drawn.

Only standard abbreviations should be used. Where specialised abbreviations are used the name should firstly be given in full with the abbreviation indicated in parentheses. The recommendations of the latest edition of Enzyme Nomenclature (1973) Elsevier, Amsterdam, should be followed as far as possible including the use of EC numbers. The Latin names should be given for all species used in the investigation. Authors are required to deposit any novel nucleic acid sequences described in their paper to the GenBank database or the EMBL data library and report the accession number. Deposition of such data should be made either at the time of submission or, at the latest, after the paper has been accepted for publication.

Note that the information provided by the GenBank accessions (nucleotide sequence, deduced protein sequence, etc.) is extensive and often makes the presentation of a DNA sequence and its protein translation unnecessary as a figure in the manuscript.

Instructions for authors regarding GenBankIDNA sequence linking: Many Elsevier journals cite "gene accession numbers" in their running text and footnotes. Gene accession numbers refer to genes or DNA sequences about which further information can be found in

the databases at the National Center for Biotechnical Information (NCBI) at the National Library of Medicine. Elsevier authors wishing to enable other scientists to use the accession numbers cited in their papers via links to these sources, should type this information in the following manner:

For each and every accession number cited in an article, authors should type the accession number in **bold, underlined text**. Letters in the accession number should always be capitalised. (See Example I below.) This combination of letters and format will enable Elsevier' typesetter to recognize the relevant texts as accession numbers and add the required link to GenBank's sequences.

Example I: "GenBank accession nos. **A1631510**, **A1631511**, **A1632198**, and **BF223228**), a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. **BE675048**), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. **AA361117**)".

Authors are encouraged to check accession numbers used very carefully. **An error in a letter or number can result in a dead link.**

In the final version of the ***printed article***, the accession number text will not appear bold or underlined (see Example 2 below).

Example 2: "GenBank accession nos. A1631510, A1631511, A1632198, and BF223228), a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. BE675048), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. AA361 117)".

In the final version of the ***electronic copy***, the accession number text will be linked to the appropriate source in the NCBI databases enabling readers to go directly to that source from the article (see Example 3 below).

Example 3: "GenBank accession nos. AI63 1510, AI631511, AI632198, and BF223228), a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. BE675048), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. AA361117)".

Abstract: This should be a brief summary of the contents and conclusions of the paper and should refer to any new information. It should not exceed 200 words and may be divided into numbered sections.

References: All publications cited in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript. In the text refer to the author's name (without initials) and year of publication (e.g. "Since Peterson (1993) has shown that ..." or "This is in agreement with results obtained later (Kramer 1994)". For three or more authors use the first author followed by "et al.", in the text. The list of references should be arranged alphabetically by authors' names. The manuscript should be carefully checked to ensure that the spelling of authors' names and dates are exactly the same in the text as in the reference list.

References should be given in the following form:

Mazumdar-Leighton, S., Babu, CR., Bennet, J., 2000. Identification of novel serine protease gene transcripts in the midguts of two tropical insects, *Scirpophaga incertulas* (Wk.) and *Helicoverpa armigera* (Hb.). Insect Biochem. Mol. Biol. 30, 57-68.

The digital object identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents.

The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in

press' because they have not yet received their full bibliographic information. The correct format for citing the DOI is shown as follows: doi:10.1016/j.jbmb.2005.01.007. When you use the DOI to create URL hyperlinks to documents on the web, they are guaranteed never to change.

Illustrations: For information on how to prepare your artwork for electronic submission, see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Photographs, charts and diagrams are all to be referred to as "Figure(s)" and should be numbered consecutively in the order to which they are referred. They should accompany the manuscript, but should not be included within the text. All figures are to have a caption. Captions should be typed on a separate page.

Line Drawings: All lettering, graph lines and points on graphs should be sufficiently large and bold to permit reproduction when the diagram has been reduced to a size suitable for inclusion in the journal. Do not use any type of shading on computer-generated illustrations.

Colour illustrations: If, together with your accepted article, you submit usable colour figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, these figures will appear in colour on the web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. For colour reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Please note: Because of technical complications which can arise by converting colour figures to 'grey scale' (for the printed version should you opt for colour in print) please submit in addition usable black and white

versions of all the colour illustrations. The costs for exceptional colour plates may be waived at the discretion of the journal. Authors of review articles are entitled to one page of colour illustrations free of charge.

Tables: Tables should be numbered consecutively and given a suitable caption and each table typed on a separate page. Footnotes to tables should be typed below the table and should be referred to by superscript lowercase letters. No vertical rules should be used. Tables should not duplicate results presented elsewhere in the manuscript, (e.g. in graphs).

Supplementary material: submission on-line

Preparation of supplementary data. Elsevier now accepts electronic supplementary material (e-omponents) to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the Author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect:  <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data is provided in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at  <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.