

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
MESTRADO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

**HEMÓCITOS DA ARANHA *Lasiodora* sp (ARANEAE: THERAPHOSIDAE):
ULTRACARACTERIZAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE INIBIDOR DE SERINO
PROTEASES**

TATIANA SOARES

ORIENTADORA: PATRÍCIA MARIA GUEDES PAIVA
CO-ORIENTADORA: MARIA DO SOCORRO DE M. CAVALCANTI

RECIFE
2010

TATIANA SOARES

**HEMÓCITOS DA ARANHA *Lasiodora* sp (ARANEAE: THERAPHOSIDAE):
ULTRACARACTERIZAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE INIBIDOR DE SERINO
PROTEASES**

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

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva

Co-orientadora: Profa. Dra. Maria do Socorro de Mendonça Cavalcanti

RECIFE

2011

Soares, Tatiana

**Hemócitos da aranha Lasiodora sp (Araneae: Theraphosidae) :
ultracaracterização e purificação de inibidor de serino proteases / Tatiana
Soares. – Recife: O Autor, 2010.**

68 folhas : il., fig.

Orientadora: Patrícia Maria Guedes Paiva

Co-Orientadora: Maria do socorro de Mendonça Cavalcanti

**Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de
Pernambuco. CCB. Bioquímica e Fisiologia, 2010.**

Inclui bibliografia

1. Aranha 2. Artrópode 3. Imunidade 4. Proteases I. Título.

595.44

CDD (22.ed.)

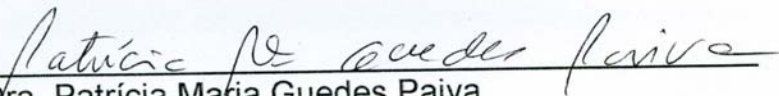
UFPE/CCB-2011-092

Tatiana Soares

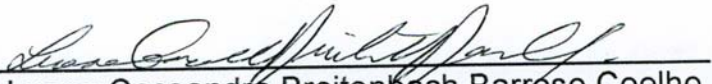
"Hemócitos da aranha *Lasiadora* sp (araneae: theraphosidae):
ultracaracterização e purificação de inibidor de serino proteases"

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

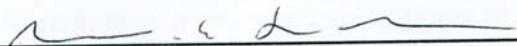
Aprovado por:



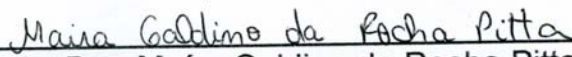
Profa. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva
Presidente



Profa. Dra. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho



Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra



Profa. Dra. Maíra Galdino da Rocha Pitta

Data: 22 / 02 / 2011

DEDICATÓRIA

*À Deus, à minha família, amigos e todos que me
deram forças e apoio durante essa pesquisa*

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar devo agradecer à Deus que mesmo quando me esquivava de meus deveres, Ele e seus representantes, sempre estavam presentes me guiando e não me deixaram sucumbir à tentação que me impele à falir.

Agradeço sinceramente à Professora Patrícia Paiva pela orientação, confiança e amizade construídas durante esses anos de convivência.

À Professora Socorro Cavalcanti pela co-orientação, confiança, conselhos, paciência e por tudo que fez por mim, minha eterna gratidão.

Sou grata à Professora Aparecida Sadae Tanaka, pela orientação, paciência, confiança, receptividade e ensinamentos compartilhados.

Grata aos Professores Fábio Brayner, Luís Alves e Marília Cavalcanti pela colaboração e por todos os conhecimentos compartilhados, além da agilidade e disponibilidade a mim fornecidas.

Igualmente grata ao Professor Pedro Ismael da Silva Júnior, pelo apoio, receptividade e colaboração.

A todos do Departamento de Bioquímica; especialmente aos amigos do Laboratório de Glicoproteínas, pela amizade, paciência e momentos de diversão, com atenção especial àqueles que me ajudaram diretamente como Fernando, Francis, Giselly, Lidi, Lu, Mano, Naty, Romero e Titi. Ressaltando minha gratidão e admiração aos meus eternos tutores Mano e Titi.

A todos do Departamento de Bioquímica do Instituto de Farmacologia da UNIFESP que me deram apoio, amizade, receptividade, confiança e compartilharam seus conhecimentos com muita paciência. Especialmente à Izaura Y. Hirata pelos sequenciamentos realizados.

A todos do Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada – LETA/Butantan pela receptividade, paciência e ensinamentos compartilhados.

Em seguida agradeço às pessoas que devo minha vida e toda gratidão por tudo que fizeram por mim, meus pais Carmem e Francisco, os quais sem suas proteções e conselhos essa pesquisa não teria sentido.

A minha segunda mãe, Simone, por toda delicadeza, simplicidade e amor a mim dedicados, minha eterna gratidão.

Gostaria de agradecer aos meus queridos parentes que me deram apoio, torcendo e me ajudando sempre. Principalmente minhas irmãs tão amadas, que sempre me assistem

minhas melhores amigas, Julianna e Lucianna. Não podendo esquecer minha sobrinha, Lara, pelos momentos de descontração, bem estar e amor pleno, que só ela proporciona.

Ao meu noivo Pedro por toda sua dedicação, apoio e compreensão. Por tudo que compartilhamos de mais sagrado, nossos ideais de vida, regados com muita amizade, amor e respeito. Que eu possa a cada dia conviver, e aos que hão de vir, demonstrar de forma mais pura minha gratidão e amor.

A todos os meus amigos, minha segunda família, que não deixaram nenhum desânimo abalar minha resignação me dando apoio sempre com muita paciência, dedicação, amor e humor, em especial aos meus grandes e eternos amigos, André, Bela, Bia parceira, Clara, Deco, Jão, Joana, Ju, Keninha, Reby, Robson, Rodrigo irmão e Sura.

À André, amigo-irmão, que me apóia, corrige e ensina a cada vez mais a viver com muito amor e humildade, nesses anos de amizade que passaram e que virão.

À Felipe pelo apoio e resignação durante esse tempo de amizade compartilhado juntos.

E finalmente, a todos que de alguma forma contribuíram para o andamento dessa pesquisa e em minha vida acadêmica, minha profunda e humilde gratidão.

RESUMO

Os artrópodes se protegem das infecções através da imunidade inata, dividida em reações celular e humoral. As células do sangue de invertebrados, os hemócitos, são identificadas com base na morfologia, ultraestrutura e função fisiológica. Sendo a fagocitose de corpos estranhos, como microorganismos, uma das funções celulares desempenhadas pelos hemócitos durante a imunidade inata; enquanto que a defesa humoral geralmente envolve componentes liberados pelos hemócitos, incluindo os peptídeos antimicrobianos, proteases e inibidores de proteases. Os últimos desempenham um papel importante como moduladores de vários processos biológicos, em especial, a ativação da fenoloxidase e coagulação. A aranha brasileira *Lasiodora* sp, amplamente distribuída na Região Nordeste do Brasil, é conhecida pelo nome trivial de caranguejeira. Estes animais têm mais tempo de vida do que os outros artrópodes e esta longevidade pode ser atribuída aos hemócitos e suas funções (imunidade inata). A maioria dos estudos de caracterização funcional e bioquímica de hemócitos de artrópodes foram realizados em insetos, com uma limitada literatura sobre outros grupos. O presente estudo relata, pela primeira vez, o isolamento e caracterização de inibidor de elastase de neutrófilos humanos presente nos hemócitos de *Lasiodora* sp (EILaH, do inglês *Elastase Inhibitor of Lasiodora sp Hemocytes*) e a caracterização dos hemócitos quanto a morfologia e função fagocitária. EILaH foi purificado por cromatografia de afinidade em coluna de tripsina-sepharose seguida por cromatografia de fase reversa. Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de sulfato sódico de dodecila revelou a massa molecular de 8 kDa e espectrometria de massa (MALDI-TOF) revelou a massa molecular de 8274 Da. A sequência amino terminal determinada foi LPCP(F)PYQQELTC e a constante de inibição (K_i) para elastase de neutrófilos humanos foi 0,32 nM. Seis tipos celulares de hemócitos foram determinados e caracterizados quanto a presença de atividade fagocítica *in vivo* e *in vitro*. O estudo contribui para a caracterização inédita do gênero e para a elucidação do papel bioquímico de inibidores de proteases em hemócitos de aranhas.

Palavras-chave: inibidor de serinoprotease, ultraestrutura, hemócitos, *Lasiodora* sp, aranha.

ABSTRACT

Arthropods protect themselves from infection by innate immunity and it can be divided into cellular and humoral reactions. The blood cells of invertebrates, the hemocytes, are identified based on morphology, ultrastructure and physiological function. The phagocytosis of foreign bodies such as microorganisms is one of the cellular functions performed by hemocytes during innate immunity, while humoral defense usually involves components released by hemocytes, including antimicrobial peptides, proteases and protease inhibitors. The latter play an important role as modulators of many biological processes, in particular, activation of coagulation and phenoloxidase. A Brazilian spider *Lasiodora* sp, widely distributed in Northeastern of Brazil, is known as tarantula. These animals have longer life than other arthropods and this longevity can be dedicated to hemocytes and their functions (innate immunity). Most studies of biochemical and functional characterization of hemocytes of arthropods were conducted on insects, with a limited literature on other groups. The present study reports for the first time, the isolation and characterization of an inhibitor of human neutrophil elastase present in *Lasiodora* sp hemocytes (EILaH, Elastase Inhibitor of *Lasiodora* sp hemocytes) and the characterization of the hemocytes with morphology and phagocytic function. EILaH was purified by affinity chromatography on trypsin-Sepharose column followed by reversed phase chromatography. Polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulfate revealed the molecular mass of 8 kDa and mass spectrometry (MALDI-TOF) revealed a molecular mass of 8274 Da amino-terminal sequence was determined LPCP(F)PYQQELTC and the inhibition constant (K_i) for human neutrophil elastase was 0.32 nM. Six cell types of hemocytes were determined and analyzed for the presence of phagocytic activity *in vivo* and *in vitro*. The study contributes to the characterization of the genre and to elucidate the biochemical role of protease inhibitors in spiders hemocytes.

Keywords: serinoprotease inhibitor, ultrastructure, hemocytes, *Lasiodora* sp, spider.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

1 INTRODUÇÃO	14
2 JUSTIFICATIVA	16
3 OBJETIVOS	
3.1 Objetivo Geral	17
3.2 Objetivos Específicos	17
4 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	
4.1 Artrópodes	18
4.2 Aranhas	19
4.2.1 Classificação do gênero <i>Lasiadora</i>	20
4.2.2 Hemolinfa e Hemócitos	22
4.3 Proteases e Inibidores de proteases	27
4.3.1 Classificação de inibidores de proteases	28
4.3.1.1 Inibidores do tipo Serpina	29
4.3.1.2 Inibidores do tipo Kazal	29
4.3.1.2 Inibidores do tipo Kunitz	30
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
6 ARTIGOS	
6.1 Artigo 1 - Ultrastructural characterization and phagocytic activity from hemocytes of <i>Lasiadora</i> sp (ARANEAE: Theraphosidae)	40
6.2 Artigo 2 - The first serine protease inhibitor from hemocytes of <i>Lasiadora</i> sp (ARANEAE: Theraphosidae)	54
7 CONCLUSÕES	68

LISTA DE ABREVIATURAS

UNIFESP – Universidade Federal de São Paulo

UPE – Universidade de Pernambuco

UFPE – Universidade Federal de Pernambuco

AIDS- Síndrome da Deficiência da Imunidade Adquirida

LPS - Lipopolissacarídeo

BmTIs – Inibidores de tripsina de *Boophilus microplus*

RsTIs – Inibidores de tripsina de *Rhipicephalus sanguineus*

HNE – Elastase de Neutrófilos Humanos

TPA – Ativador de plasminogênio

LHEI – Inibidor de Elastase de Hemócitos de *Lasiodora*

TFA – Ácido trifluoroacético

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Pressão

Ki – Constante de inibição ou dissociação

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida com sódio dodecil sulfato

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. O caranguejo-ferradura <i>Limulus polyphemus</i>	18
Figura 2. O escorpião <i>Tityus serrulatus</i>	18
Figura 3. A aranha <i>Lasiodora parahybana</i>	18
Figura 4. O carrapato <i>Boophilus microplus</i>	18
Figura 5. Representante de <i>Lasiodora</i> sp matida em aquário de vidro	20
Figura 6. <i>Lasiodora</i> sp	21
Figura 7. Esquema do sistema circulatório de aranhas	22
Figura 8. Representação esquemática das respostas imunológicas nos insetos	24
Figura 9. Sistema ativador da pro-fenoloxidase (proPO) de artrópode	25
Figura 10. Sistema de defesa nos hemócitos do caranguejo-ferradura	26
Figura 11. Cascata de coagulação em carangueijo-ferradura	27

1. Introdução

Os artrópodes desenvolveram um eficiente sistema de defesa, sendo a imunidade inata a primeira linha de proteção contra bactérias, fungos e patógenos virais; podendo ser realizada por via celular ou humoral (Hoebe *et al.*, 2004; Fukuzawa *et al.*, 2008).

Os aracnídeos compõem a mais importante e numerosa das classes de quelicerados, e, são representados pelas formas mais comumente envolvidas com o homem, tais como: aranhas, escorpiões, ácaros e carrapatos. A aranha *Lasiodora* sp, popularmente conhecida como tarântula, pertence à família das grandes caranguejeiras sendo facilmente encontrada no nordeste brasileiro, em áreas de Mata Atlântica (Bertani, 2001).

O sucesso adaptativo alcançado por esses animais é um dos motivos que incentivam o estudo de isolamento de novas moléculas com poder biotecnológico explorável e deve-se ao sistema de defesa 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.

Os hemócitos são identificados com base na sua morfologia, ultraestrutura, e papéis fisiológicos. Em invertebrados a fagocitose de corpos estranhos, tais como microorganismos, é uma das funções celulares desenvolvida pelo hemócitos na imunidade inata. Em carrapatos já foi relatado, dois tipos de células fagocíticas, granulócitos e plasmatócitos (Inoue *et al.*, 2001; Kadota *et al.*, 2003). Fukuzawa e colaboradores (2008) reportaram a mesma função nos granulócitos da aranha *Acanthoscurria gomesiana*.

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 proteases (Fear *et al.*, 2007). Esses se ligam às enzimas e bloqueiam suas ações formando complexos estequiométricos estáveis sendo assim importantes e fundamentais reguladores da atividade proteolítica (Laskowski e Qasim, 2000). Os inibidores pertencem a várias famílias, tendo como propriedade

comum à presença de múltiplas pontes dissulfeto; estas ligações covalentes conferem estabilidade e rigidez a estrutura do inibidor auxiliando na fixação do sítio reativo que interage com o sítio ativo da proteinase, na correta conformação requerida para a inibição (Kanost, 1999).

Inibidores de proteases são moléculas importantes presentes em invertebrados e vertebrados para o controle extracelular de cascatas de serinoproteinases envolvidas na mediação da rápida resposta de defesa sobre a lesão ou patógeno infeccioso. Artrópodes e outros invertebrados são fontes de inibidores de proteases, isolados principalmente da hemolinfa e pertencentes, principalmente, às famílias Kunitz e Serpina.

Em aranhas, toxinas têm sido purificadas do veneno (Kushmerick *et al.*, 2001; Kalapothakis *et al.*, 2003; Vieira *et al.*, 2004), no entanto, não existem relatos na literatura sobre inibidores de proteases purificados a partir de hemócitos. O uso de inibidores como agentes terapêuticos tem motivado a busca por essas moléculas; inibidores de elastase com diferenças estruturais e/ou propriedades físicoquímicas podem ser novas ferramentas terapêuticas eficientes (Brillard-Bourdet *et al.*, 2006). A purificação e caracterização de inibidores de proteases são os primeiros passos para a elucidação de seus papéis fisiológicos e bioquímicos.

2. Justificativa

Considerando a diversidade biológica dos artrópodes, esse grupo conta com uma riqueza de moléculas com funções e aplicações fisiológicas ainda pouco estudadas. Eles têm proporcionado modelos importantes para o estudo de estratégias antimicrobianas, que podem fornecer informações relevantes para o combate a doenças; bem como para o estudo da imunologia. Dentre as moléculas mais estudadas, os inibidores de proteases, têm sua importância no controle da cascata de coagulação e fenoloxidase e sua obtenção na forma pura é importante devido às suas aplicações biotecnológicas; na agricultura, são vacinas contra carrapatos, e na medicina, são drogas utilizadas no tratamento de doenças, tais como diabetes, doenças pulmonares, câncer, dengue e AIDS.

O gênero *Lasiadora*, passa por uma revisão sistemática a qual ainda encontra-se em desenvolvimento coordenada pelo Instituto Butantan. Estudos relacionados à caracterização de hemócitos e a presença de proteínas na hemolinfa e em hemócitos deste gênero são inexistentes na literatura, havendo apenas estudos sobre venenos. O estudo ao investigar a morfologia e bioquímica de hemócitos de *Lasiadora* sp contribuirá para a caracterização bioquímica inédita do gênero.

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Classificar hemócitos da aranha *Lasiodora* sp quanto à morfologia e atividade fagocítica e purificar inibidor de serino proteases de hemócitos.

3.2 Objetivos Específicos

- 3.2.1 Ultracaracterizar os hemócitos de *Lasiodora* sp por microscopia óptica (luz e confocal) e de transmissão;
- 3.2.2 Classificar morfologicamente os hemócitos utilizando a literatura existente;
- 3.2.3 Classificar os hemócitos quanto à atividade fagocítica *in vivo* e *in vitro*;
- 3.2.4 Determinar o perfil de inibição de proteases do extrato de hemócitos;
- 3.2.5 Purificar inibidores de serino proteases a partir do extrato de hemócitos por métodos cromatográficos;
- 3.2.6 Caracterizar o inibidor isolado quanto à massa molecular, especificidade de inibição e composição de aminoácidos N-terminais.

4. Fundamentação teórica

4.1 Artrópodes

Os artrópodes constituem um grande filo dentro dos animais invertebrados e podem ser subdivididos, segundo Rupert e Barner (1996), em quatro subfilos: Trilobita (extintos), Chelicerata (límulos (Fig. 1), escorpiões (Fig. 2), aranhas (Fig. 3) e ácaros (Fig. 4)), Crustacea (copépodos, cracas, camarões, lagostas e caranguejos) e Uniramia (centopéias, piolhos-de-cobra e insetos).



Figura 1. O caranguejo-ferradura *Limulus polyphemus*.

Fonte: RI BUGS (2007) Foto de Dann Thombs.



Figura 2. O escorpião *Tityus serrulatus*.

Fonte: FastServ (2011).



Figura 3. A aranha *Lasiodora parahybana*.

Fonte: Sklipkani (2002).



Figura 4. O carrapato *Boophilus microplus*.

Fonte: ICB/USP Foto de Marcelo Palmeira (2011).

Os artrópodes ocupam quase todos os nichos ecológicos e estão constantemente expostos ao ataque de inúmeros inimigos naturais, muitos dos quais são potencialmente patogênicos. Para sobreviver a esses ataques, desenvolveram um eficiente sistema de defesa, sendo a imunidade inata a primeira linha de proteção contra bactérias, fungos e patógenos virais; a proteção contra infecções microbianas pode ser realizada por via celular ou humoral (Hoebe *et al.*, 2004; Fukuzawa *et al.*, 2008).

4.2 Aranhas

As aranhas (ordem Araneae) são o mais diverso e sucedido grupo de invertebrados terrestres, excluindo os insetos, os quais são suas presas primárias (Rash e Hodgson, 2002). Estão distribuídas em praticamente todo o planeta habitando todos os ecossistemas, com exceção do ar e do mar aberto (Ferreira, 2006). Há 42.055 espécies descritas em 3821 gêneros (Platnick, 2011), restando um grande número de animais à espera de caracterização.

As migalomorfas compreendem as aranhas conhecidas popularmente como caranguejeiras, as quais possuem longas expectativas de vida, podendo atingir mais de 20 anos (Silva Júnior, 2000; Foelix, 1996). São caracterizadas por suas quelíceras paraxiais que estão situadas paralelamente ao corpo, e se movem de cima para baixo. Possuem dois pares de pulmões foliáceos desenvolvidos e ausência de traquéia, o que confere a característica primitiva do grupo (Ferreira, 2006).

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 denominada pedicelo. O cefalotórax suporta quatro pares de pernas, um par de quelíceras em frente à boca (característica que determina o subfiló) e um par de pedipalpos localizados entre a quelícera e o primeiro par de pernas, 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 na taxonomia do grupo. O abdome por sua vez abriga os sistemas respiratório, circulatório, digestivo e reprodutor (Foelix, 1996).

As aranhas como todos os artrópodes, apresentam um exoesqueleto e durante o crescimento passam pelo processo de muda. Em geral, na maioria das aranhas, quando o estágio reprodutivo é atingido cessam o crescimento e as trocas de exoesqueleto. Nas grandes caranguejeiras, diferentemente das outras aranhas, as fêmeas adultas continuam realizando a muda uma vez ao ano ou em intervalos irregulares (Silva Júnior, 2000).

Fêmeas adultas do gênero *Lasiadora*, no estágio intermuda, foram coletadas de forma padronizada (sempre na mesma região) e mantidas em caixas de plástico ou vidro; comida e água foram fornecidas semanalmente (Fig. 5).



Figura 5. Representante de *Lasiadora* sp matida em aquário de vidro. Detalhe do algodão embebido com água no canto superior direito, forma de absorção desses representantes. Fonte: arquivo do autor.

4.2.1 Classificação do gênero *Lasiadora*

A aranha brasileira *Lasiadora* sp (Mygalomorphae, Theraphosidae), é conhecida com o nome trivial de caranguejeira ou tarântula e encontra-se distribuída na região Nordeste do Brasil, especialmente na Floresta Atlântica, havendo registros ainda na região Sudeste e Centro-Oeste do país (Bertani, 2001).

O gênero, pertencente à família Theraphosidae, descrito por C. Koch em 1850

(apud Bertani, 2001) encontra-se atualmente com sua classificação em andamento coordenado pelo Dr. Rogério Bertani do Instituto Butantan, São Paulo, Brasil.

Lasiadora sp (Fig. 6) em relação às demais aranhas é de grande porte, podendo atingir 20 cm de comprimento e seus exemplares apresentam cor escura, preta ou marrom e possui no abdome pêlos urticantes tipo I e III e/ou IV, que podem ser lançados quando o animal sente-se ameaçado (Ferreira, 2006).



Figura 6. *Lasiadora* sp. Barra: 4 cm. Fonte: arquivo do autor.

A classificação geral do gênero *Lasiadora* sp foi descrito em Ferreira (2006), como segue abaixo:

Filo Arthropoda

Subfilo Chelicerata

Classe Arachnida

Ordem Araneae

Sub-ordem Ophistothele

Infra-ordem Mygalomorphae

Família Theraphosidae

Gênero Lasiodora

4.2.2 Hemolinfa e Hemócitos

As aranhas possuem um sistema circulatório aberto por onde corre um fluido corporal análogo ao sangue dos vertebrados: a hemolinfa (Ferreira, 2006). O coração, órgão responsável pela circulação desse líquido, é localizado dorsalmente no interior do opistossoma ou abdome (Fig. 7), formado por um tubo muscular suspenso por ligamentos dorsais, laterais e ventrais (Foelix, 1996).

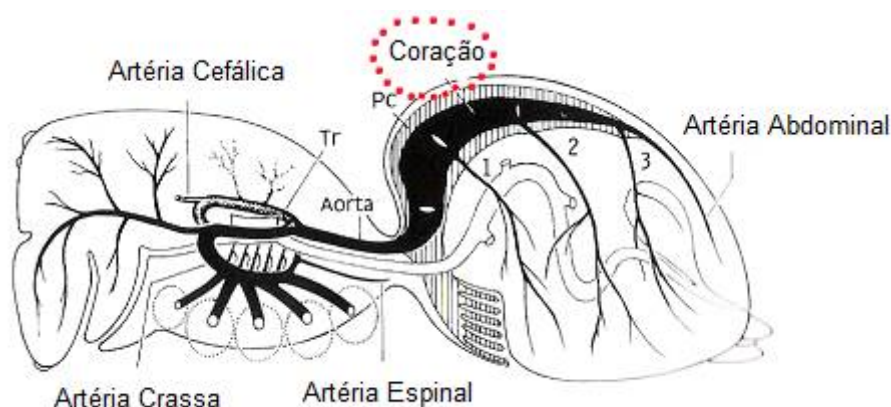


Figura 7. Esquema do sistema circulatório de aranhas. Destaque para o vaso dorsal (coração). Fonte: adaptado Foelix (1996).

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

Em quelicerados e crustáceos, a hemocianina parece desempenhar um papel imunológico importante e participa no sistema de imunidade inata (Cerenius e Söderhäll, 2004; 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 fenoloxidase (Nagai *et al.*, 2001; Adachi *et al.*, 2003).

A hemolinfa dos artrópodes é bastante estudada em seu aspecto bioquímico; lectinas, inibidores de proteases e peptídeos antimicrobianos já foram isolados tanto do plasma como dos hemócitos. Como exemplo tem-se, o inibidor de protease no plasma do bicho-da-seda *Antheraea mylitta* (Shrivastava e Ghosh, 2003), o inibidor de serino proteinase encontrado no plasma da lagarta *Manduca sexta* (Wang e Jiang, 2004), o inibidor tripsina e subtilisina dos hemócitos do camarão *Litopenaeus vannamei* (Vega e Albores, 2005), e, o peptídeo antimicrobiano dos hemócitos do carrapato *B. microplus* (Fogaça *et al.*, 2006). No entanto, em aranhas a investigação dessas moléculas é escassa (Silva Júnior, 2000).

Os hemócitos circulantes parecem estar envolvidos na coagulação da hemolinfa e no combate às infecções, sendo extremamente sensíveis ao lipopolissacarídeo bacteriano respondendo através da liberação de componentes granulares (Iwanaga e Lee, 2005). Estruturalmente são distinguidos quatro tipos de células, sendo os mais comuns os granulares, que apresentam muitos grânulos densos concentrados em seu citoplasma, atribuindo-lhes a função de esclerotização da exocutícula (apud Foelix, 1996), outros parecem atuar como fagócitos ou células de armazenagem, ou ainda impedindo o extravasamento da hemolinfa (Muta e Iwanaga, 1996). Fukuzawa e colaboradores (2008) observaram três tipos de hemócitos na *A. gomesiana*: os prohemócitos, os granulócitos e os cianócitos. Durante a troca de exoesqueleto, ou muda, a porcentagem relativa de diferentes tipos de hemócitos é alterada drasticamente.

Os hemócitos têm a habilidade de defender os invertebrados 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). Em insetos, esses mecanismos de defesa são bem caracterizados (Fig. 8).

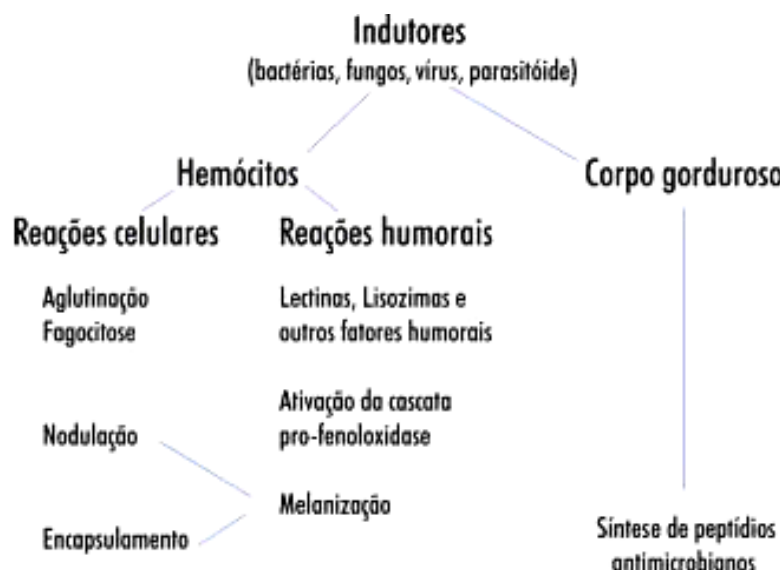


Figura 8. Representação esquemática das respostas imunológicas nos insetos. Fonte: Silva (2002).

Injúrias mecânicas ou a presença de objetos 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 são envolvidas nesse processo, dentre elas, proteases da cascata de coagulação. A ativação dessas proteases é cuidadosamente regulada pelo sistema da fenoloxidase que consiste numa cascata de proteínas capazes de se ligar a polissacarídeos e outro composto tipicamente associado a microrganismos, tais como peptidoglicanos e lipopolissacarídeos (Silva, 2002).

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 defesas imunológicas (Azzolini, 2003). A fenoloxidase encontra-se como uma pro-enzima, chamada pro-fenoloxidase que é ativada proteoliticamente por uma ou duas serino proteases em resposta ao lipopolissacarídeo (LPS, componente da parede celular das bactérias Gram-negativas), peptidoglicanos (componente celular das bactérias Gram-positivas), β -1,3 glicanos (componente da parede celular de fungos e algas),

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. 9) (Nappi e Ottaviani, 2000; Cerenius e Söderhäll, 2004; Azzolini, 2006).

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).

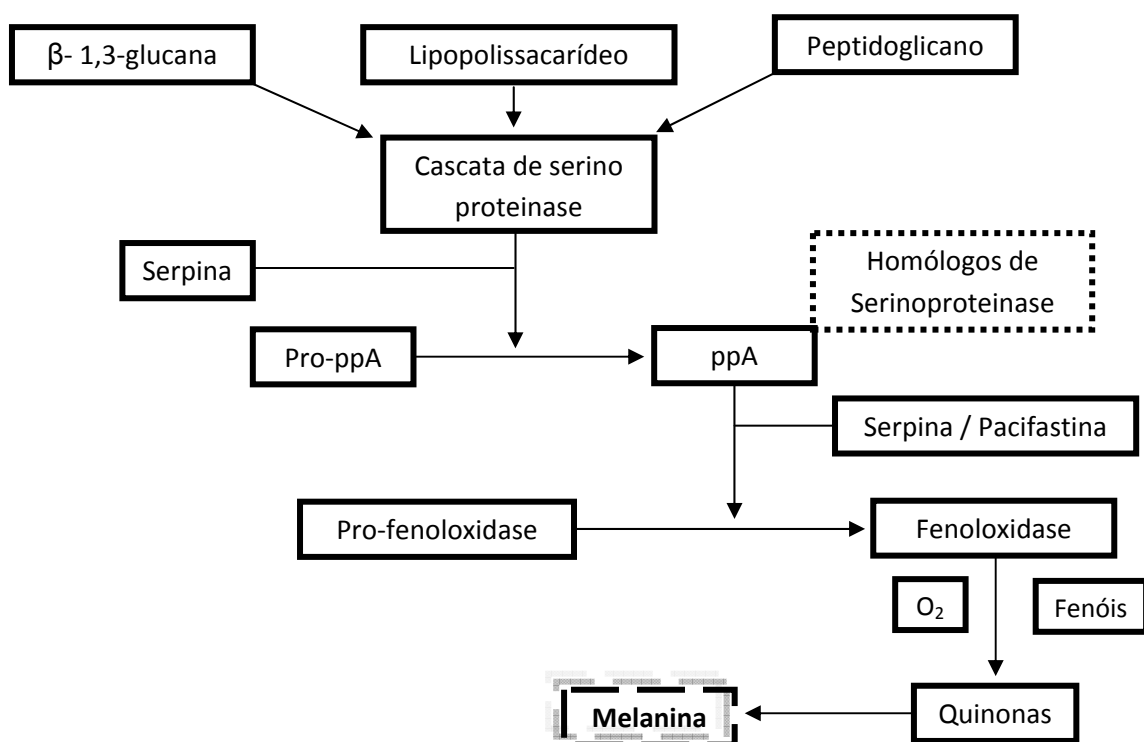


Figura 9. Sistema ativador da pro-fenoloxidase (proPO) de artrópode. O sistema é ativado pelo reconhecimento protéico de β -1,3-glicanos, lipopolissacarídeos, peptidoglicanos, ou por outros componentes como fatores endógenos produzidos sobre a lesão tecidual. A cascata de serinoproteinases, a qual não foi ainda caracterizada, pode resultar na clivagem do zimogênio da enzima ativadora da pro-fenoloxidase (pro-ppA) em fenoloxidase ativa. Fonte: adaptado Cerenius e Söderhäll (2004).

Uma vez atingido o local de infecção os hemócitos podem secretar componentes da cascata de coagulação e peptídeos antimicrobianos na cavidade livre da hemocele (Fukuzawa *et al.*, 2008). A produção de peptídeos antimicrobianos mediados por

receptores semelhantes a Toll, coagulação da hemolinfa, formação da melanina e ativação do complemento mediado por lectinas são as respostas imunes mais proeminentes (Iwanaga e Lee, 2005). O fenômeno da coagulação da hemolinfa foi primeiramente identificado como um sistema de defesa no caranguejo-ferradura *L. polyphemus*, por Bang (1956).

No caranguejo-ferradura, os hemócitos são conhecidos como granulócitos ou amebócitos, por possuírem grânulos de vários tamanhos, e essas células são bastante sensíveis à endotoxinas bacterianas, em geral o LPS. Quando detecta essa molécula em suas superfícies, os hemócitos liberam seus grânulos através de uma rápida exocitose (Fig. 10). Dois componentes granulares liberados da reação de coagulação são os fatores C e G. Esses zimogênios de serino proteases são autocataliticamente ativados pelo LPS e β -1,3-D-glicano, principais componentes da parede celular de bactérias Gram-negativas e fungos, respectivamente (Muta e Iwanaga, 1996); a ativação resulta na transformação do coagulogênio em coagulina (Fig. 11). Os invasores da hemolinfa ou hemocele são fagocitados ou imobilizados pelo coágulo e em seguida são mortos por ação de lectinas, substâncias antimicrobianas e inibidores de proteases encontradas nos grânulos.

Os hemócitos estão sendo bastante investigados, porque contêm uma diversidade de peptídeos antimicrobianos, lectinas, proteases e inibidores de proteases.



Figura 10. Sistema de defesa nos hemócitos do caranguejo-ferradura. O hemócito detecta LPS nas bactérias Gram-negativas e inicia a exocitose dos grandes e pequenos grânulos. Os fatores de coagulação são ativados por LPS ou β -1,3-D-glicano, resultando na coagulação da hemolinfa. Os grandes grânulos contêm inibidores de proteases. Fonte: adaptado Muta e Iwanaga (1996).

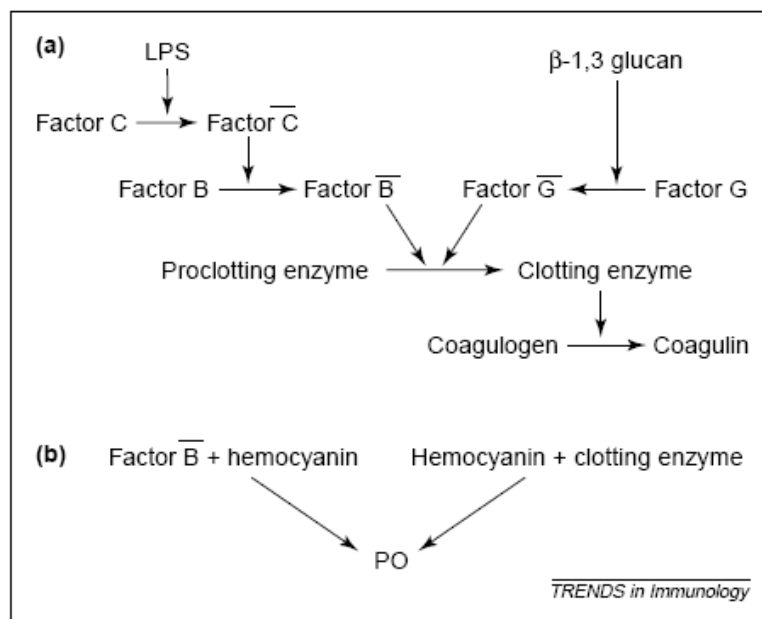


Figure 11. Cascata de coagulação em carangueijo-ferradura. (a) A exposição ao LPS leva à proteólise autocatalítica de fator C, ao passo que a exposição a β -1,3-D-glicano resulta na ativação do fator G. Factor C pode atuar como um receptor de reconhecimento padrão. (b) Hemocianina pode ser convertida para fenoloxidase por meio de interações não-catalíticas com um fator ativado da enzima B ou de coagulação. Fonte: Theopold *et al* (2004).

4.3 Proteases e Inibidores de proteases

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, 2007).

As serino proteases 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 incluem a tripsina, quimotripsina e subtilisina (Lima, 2006). As serino proteases que participam do processo de coagulação da hemolinfa e ativação da profenoloxidase podem ser controladas por inibidores de serino proteases do tipo Kunitz, Serpina e Pacifastina presentes na hemolinfa de artrópodes; tem sido sugerido 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).

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).

A maioria dos inibidores de proteases de artrópodes foi isolada da hemolinfa dos insetos e podem ser agrupados 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).

Inibidores de serino proteases estão envolvidos em diversos mecanismos no sistema imune de artrópodes; por exemplo, eles medeiam os processos de coagulação e melanização da hemolinfa e a produção de peptídeos antimicrobianos (Fogaça, *et al.*, 2006). O principal papel dessas proteínas é a regulação de serino proteases endógenas implicadas nas cascatas do sistema da fenoloxidase e da coagulação sanguínea (Cherqui *et al.*, 2001; Cerenius e Söderhall, 2004).

Os inibidores de proteases têm sido investigados como potenciais drogas para o controle de algumas doenças como câncer, *diabetes mellitus* ou no controle de vírus, fungos e inflamação (Fear *et al.*, 2007). E têm sido identificados em diversos artrópodes, incluindo o caranguejo-ferradura (Donovant e Laue, 1991; Iwannaga, 2005), o camarão (Vega e Albores, 2005) e o carrapato (Lai *et al.*, 2004; Fogaça *et al.*, 2006).

4.3.1 Classificação de inibidores de proteases

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). Segundo Fear e colaboradores

(2007), podem ainda 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.

Os inibidores de serino proteases 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 serino proteases 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).

4.3.1.1 Inibidores do tipo Serpina

Serpinas são de uma família amplamente distribuída de inibidores de protease que utilizam mudanças conformacionais para a inibição das enzimas alvo. Eles são fundamentais no controle de importantes e numerosas cascatas proteolíticas, incluindo as vias de coagulação em mamíferos (Law *et al.*, 2006). 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.

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

4.3.1.2 Inibidores do tipo Kazal

Os inibidores de protease do tipo Kazal estão entre as famílias mais conhecidas de inibidores de proteases, amplamente encontrada em mamíferos, aves e uma variedade de invertebrados (Rimphanitchayakit & Tassanakajon, 2010). Eles formam uma família bem definida de inibidores competitivos de serino proteases, que possuem estruturas com vários domínios e parecem estar envolvidos com o controle da atividade proteolítica na coagulação e sistema da fenoloxidase (Vega e Albores, 2005).

Inibidores de serino proteases tipo Kazal 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 *L. vannamei* (Vega e Albores, 2005).

4.3.1.3 Inibidores do tipo Kunitz

Os inibidores da família tipo Kunitz animal são proteínas de baixa massa molecular com aproximadamente 60 resíduos de aminoácidos, com um ou mais domínios inibitórios capazes de inibir uma ou mais serino proteases (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 as suas enzimas como se fossem substratos.

No carrapato (*B. 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.*, 1999a; Sasaki *et al.*, 2004) e recentemente, uma proteína com atividades anti-quimotripsina e antimicrobiana foi descrita em *B. microplus*, e denominada de 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*.

Larvas de carrapatos *Ricephalus (Boophilus) microplus* contêm o BmTI-A, inibidor de tripsina, elastase e calicreína plasmática humana que tem dois domínios tipo Kunitz e participa na fixação das larvas prevenindo a coagulação e a resposta inflamatória (Tanaka *et al*, 1999b) e o inibidor de tripsina RsTI (Azzolini *et al.*, 2003). Inibidores tipo Kunitz de *R. (Boophilus) microplus* (BmTIs) quando utilizados na imunização de bovinos levaram a uma proteção de 72,8% contra a infestação por *R. (Boophilus) 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 potencialidade em controlar mecanismos como inflamação, coagulação sanguínea e ciclo celular.

5. Referências Bibliográficas

- HOEBE, K.; JANSEN, E.; BEUTLER, B. **The interface between innate and adaptative immunity.** Nature Immunology 5: 971-974, 2004.
- 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.
- 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.
- INOUE, N.; HANADA, K.; TSUJI, N.; IGARASHI, I.; NAGASAWA, H.; MIKAMI, T.; FUJISAKI, K. **Characterization of phagocytic hemocytes in *Ornithodoros moubata* (Acari: Ixodidae),** J. Med. Entomol. 38: 514-519, 2001.

- KADOTA, K.; WALTER, S.; CLAVERIA, F.G.; IGARASHI, I.; TAYLOR, D.; FUJISAKI, K. **Morphological and populational characteristics of hemocytes of *Ornithodoros moubata* nymphs during the ecdysal phase**, J. Med. Entomol. 40: 770-776, 2003.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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 *Lasiadora* spider venom on Ca²⁺ and Na⁺ channels**. Toxicon 39: 991-1002, 2001.
- 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 (*Lasiadora* sp.) on the isolated rat heart**. Toxicon 41: 23-28, 2003.

- 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.
- 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.
- RUPPERT, Edward E.; BARNER, Robert D. **In: Zoologia dos invertebrados.** 6 ed. São Paulo: Roca, 1996.
- RI BUGS/ A CATALOGUE OF RHODE ISLANDARTHROPOD - 2007. **Caranguejo- ferradura *Limulus polyphemus*.** Disponível em: <http://www.decemberized.com/ribugs/index.asp?ID=855>. Acesso em 23 de janeiro de 2011.
- FASTSERV - 2011. **Escorpião *Tityus serrulatus*.** Disponível em: www.cacavazamentosemsp.com.br. Acesso em 23 de janeiro de 2011.
- SKLIPKANI - 2002. **Aranha *Lasiadora parahybana*.** Disponível em: <http://www.arachne.wz.cz/kvetos/galerie/sklipkani.html>. Acesso em 23 de janeiro de 2011.
- UNIVERSITY OF SÃO PAULO/INSTITUTE OF BIOMEDICAL SCIENCES, 2011. **Carrapato *Boophilus microplus*.** Disponível em: <http://www.icb.usp.br/~marcelcp/Boophilus.htm>. Acesso em 23 de janeiro de 2011.
- HOEBE, K.; JANSEN, E.; BEUTLER, B. **The interface between innate and adaptative immunity.** Nature Immunology 5: 971-974, 2004.

RASH, L. D.; HODGSON, W.C **Pharmacology and biochemistry of spiders venoms.** Toxicon. 40: 225 – 254, 2002.

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.

PLATNICK, N. I. 2011. **The world spider catalog**, version 9.0. American Museum of Natural History, disponível em: <http://research.amnh.org/iz/spiders/catalog/COUNTS.html> Acesso em: 26 de janeiro de 2011.

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.

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

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

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.

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.

- 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.
- 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.
- 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.
- VEGA, F. J.; ALBORES, F. V. **A four-Kazal domain protein in *Litopenaeus vannamei* hemocytes.** *Developmental and Comparative Immunology* 29: 385-391, 2005.
- [15] 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.
- 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.
- MUTA, T.; IWANAGA, S. **The role of hemolymph coagulation in innate immunity.** *Current Opin in Immunology* 8: 41-47, 1996.
- LAVINE M.D., STRAND M.R. **Insect hemocytes and their role in immunity.** *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32 (10): 1295-309, 2002.

- SILVA, C. C. A. da. **Aspectos do sistema imunológico dos insetos**. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento 24: 68-72, janeiro e fevereiro de 2002.
- 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.
- NAPPI, A. J.; OTTAVIANI, E. **Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates**. Bioassays 22:469-480, 2000.
- AZZOLINI, S. S. **Estudos bioquímicos e funcionais do inibidor de serino proteases presente em mosca-dos-chifres, *Haematobia irritans irritans***. São Paulo, 2006, Tese (Doutorado) Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo.
- 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.
- BANG, F. B. **A bacterial disease of *Limulus polyphemus***. Bull. Johns Hopkins Hosp. 98: 325-351, 1956.
- THEOPOLD, U.; SCHMIDT, O.; SÖDERHÄLL, K.; DUSHAY, M.S. **Coagulation in arthropods: defence, wound closure and healing**. TRENDS in Immunology 25 (6), 2004.
- LIMA, C. A. **BmCistatina, Inibidor de cisteinoproteases presente em corpo gorduroso de carrapato *Boophilus microplus*: Clonagem, expressão,**

purificação e caracterização. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Escola Paulista de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

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

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.

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.

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.

LAW, R.H.P.; ZHANG, Q.; MCGOWAN, S.; BUCKLE, A.M.; SILVERMAN, G.A.; WONG, W.; ROSADO, C.J.; LANGENDORF, C.G.; PIKE, R.N.; BIRD, P.I.; WHISSTOCK, J.C. **An overview of the serpin superfamily.** Genome Biology 7: 216, 2006.

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.

- GETTINS, P. G. **Serpin structure, mechanism and function**. Chemistry Review 102: 4751-4804, 2002.
- JIANG, H.; KANOST, M. R. **The clip-domain family of serine proteinases in arthropods** . Insect Biochemistry and Molecular Biology 30: 95-105, 2000.
- 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.
- RIMPHANITCHAYAKIT, V.; TASSANAKAJON, A. **Structure and function of invertebrate Kazal-type serine proteinase inhibitors**. Dev. Comp. Immunol. 34 377–386, 2010.
- LASKOWSKI, M.; KATO, I. **Protein inhibitors of proteinases**. Ann. Ver. Biochemistry 49: 393-629, 1980
- 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, 1999a.
- 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.
- 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, 1999b.

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.

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.

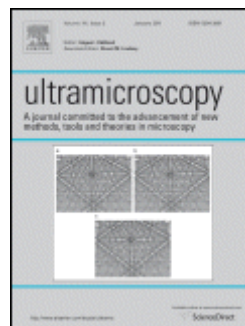
SASAKI, S. D.; COTRIN, S. S.; CARMONA, A. K.; TANAKA, A. S. **An unexpected inhibitory activity of Kunitz-type serine proteinase inhibitor derived from *Boophilus microplus* trypsin inhibitor on cathepsin L.** Biochemical and Biophysical Research Communications 341: 266–272, 2006.

6. Artigos

6.1 Artigo 1

Ultrastructural characterization and phagocytic activity from hemocytes of *Lasiadora* sp (ARANEAE: Theraphosidae)

Revista para submissão:



Fator de Impacto: 2.067

**Ultrastructural characterization and phagocytic activity from
hemocytes of *Lasiadora* sp (ARANEAE: Theraphosidae)**

Tatiana Soares¹, Marília Gabriela dos Santos Cavalcanti^{2,3}, Felipe Roberto Borba
Ferreira⁴, Maria do Socorro de Mendonça Cavalcanti⁴, Luiz Carlos Alves^{2*}, Fábio
André Brayner dos Santos², Patrícia Maria Guedes Paiva¹

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

²*Departamento de Parasitologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - (CPqAM/FIOCRUZ), Recife,
Pernambuco, Brazil*

³*Departamento de Fisiologia e Patologia, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), João Pessoa,
Brazil*

⁴*Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.*

*Luiz Carlos Alves, Departamento de Biologia Celular e Ultraestrutura, Centro de Pesquisas Aggeu
Magalhães - FIOCRUZ, Recife, Pernambuco, Brazil, lcalves@cpqam.fiocruz.br, Tel: C55 81 3301 2540;
Fax: C55 81 3453 2449.

ABSTRACT

For the first time, new blood cell types have been found in the circulation of the tarantula spider *Lasiodora* sp. We aimed to characterize the hemocytes of *Lasiodora* sp by optic and transmission microscopy beyond to identify phagocytic activity *in vivo* and *in vitro*. Six hemocytes types were identified: granulocytes type I (Gr I), granulocytes type II (Gr II), granulocytes type III (Gr III), granulocytes type IV (spherulocytes) (Gr IV), granulocytes type V (Gr V) and plasmatocytes (Pl). The polymorphic granulocytes presented a rounded (Gr I/Gr V), elongate (Gr II), elliptical (Gr III), oval (Gr IV) or yet irregular (Pl) profile with a large and varied amount of granules; except the plasmatocytes which has no granules. These granules had differences in density when compared with other granulocytes types and they could be found at the periphery of the cell in different concentrations. This study was not able to detect the prohemocytes. The *Lasiodora* sp hemocytes showed phagocytic activity in the *in vivo* and *in vitro* experiments. We argue on the possible reasons and implications of the observed changes.

Key-words: *Lasiodora* sp; Hemocytes; Microscopy; Ultrastructure; Phagocytic activity; Spider.

1. Introduction

Arthropods protect themselves against infection through reaction of innate immunity and these reactions are divided into humoral and cellular, whose have not been explored so extensively [1]. The ability of blood cells to recognize and rapidly respond to tissue damage or infections is an integral part of the tissue repair response and immunity. Humoral defenses have been devoted to mechanism like antimicrobial peptides, melanization and coagulation of hemolymph through serine protease cascades and reactive free radical intermediates of oxygen or nitrogen to recognition and destruction of invading microorganisms [2-4].

Hemocytes are identified on basis of their morphology, ultrastructure, and physiological function [5]. Phagocytosis of foreign bodies, such as microorganisms, is one of the cellular functions developed by hemocytes in invertebrates during the innate immunity. In ticks at least two types of phagocytic cells, granulocytes and plasmatocytes, have been reported [5-6]. Fukuzawa and coworkers [2] showed the same function in the granulocytes from spider *A. gomesiana*.

Most of the functional characterization studies of arthropod hemocytes have been performed in insects, with a limited literature about other groups. Spiders, after the insects, represent the most diverse and successful terrestrial invertebrates [7].

The Brazilian spider *Lasiodora* sp is known by trivial name of tarantula and is widely distributed in Northeastern Region of Brazil [8]. These animals have longer time life than others arthropods, approximately twenty years. Directly correlated with the hemocytes and their functions a successful system of innate immunity can be stated as a cause of this longevity. The identification of the species of the genus *Lasiodora* (C. L. Koch, 1950) under study awaits the development of a suitable key; work which is now in progress.

The aim of the present study was to characterized, for the first time, morphological types of *Lasiadora* sp hemocytes by optic and transmission electron microscopy beyond the function of phagocytosis of the same cells performed *in vivo* and *in vitro*.

2. Material and Methods

2.1 Animal and sample collection

Adult female *Lasiadora* spiders were kept in plastic boxes with water and food given weekly. The hemolymph was collected by cardiac puncture (1 mL per animal) with an apyrogenic syringe. To avoid hemocyte degranulation and coagulation, the hemolymph was collected in the presence of sodium citrate buffer, pH 4.6, 2:1 - v: v [9]. The hemocytes were removed from plasma by centrifugation at 800g for 10 min at 4° C.

2.2 Hemocytes characterization

2.2.1 Optical microscopy

2.2.1.1 Light microscopy (LM)

The hemolymph of one animal was obtained by cardiac puncture and bled directly on to a glass slide and allowed dry in natural air conditions for 20–30 min. After natural air-drying of the cells were fixated and stained with fast panoptic and slides were rapidly washed with distilled water. After air drying the slides were dehydrated and mounted in Entellan.

2.2.1.2 Differential interference contrast (DIC)

Using a Cell Culture Plate (MatTEK) the hemocytes were diluted in GRACE medium and observed under a Leica fluorescent microscope. The images were obtained using a Leica SP2 confocal microscopy.

2.2.2 Transmission electron microscopy (TEM)

Hemolymph (2 mL) was pooled and centrifuged at 800 g for 10 min at 4°C. The pellet was washed in sodium citrate buffer, pH 4.6. The cells were resuspended and fixed in 4% glutaraldehyde in 0.2 M cacodylate buffer, pH 7.2, overnight [10]. The samples were washed in 5% sucrose solution in 0.2 M cacodylate buffer, pH 7.2 and post-fixed with osmium tetroxide (1%) in cacodylate buffer for 1 h. After dehydration in graded acetone series, the cells were embedded in EMBED 812/Araldite (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA).

2.3 Phagocytic assay

2.3.1 Experiment in vitro

Hemolymph (1mL) was collected, then diluted in GRACE medium (1:500), and placed on Cell Culture Plate (MatTEK). The yellow-green-conjugated latex beads (5µl in aqueous solution, 10% solids content, 0,5 µm - Sigma Co., St. Louis, MO, USA) were added at a ratio of 1:50 with GRACE medium. The plates were incubated for 30 min in a dark chamber at room temperature. The phagocytic activity of *Lasiodora* sp hemocytes was examined during 2 h and registered as described at 2.2.1.2.

2.3.2 Experiment in vivo

Spiders were inoculated with 5 µL yellow-green-conjugated latex beads (aqueous solution, 10% solids content, 0,5 µm Sigma Co., St. Louis, MO, USA) in combination

with Grace medium (1:50). After 30 min the hemolymph (1mL) was collected and diluted in GRACE medium (1:500) in a Cell Culture Plate (MatTEK). The plates were incubated for 30 min in a dark chamber at room temperature. The phagocytic activity of the challenged *Lasiadora* sp hemocytes was examined during 2 h and registered as described at 2.2.1.2.

3. Results

Six morphological types of the circulating cells can be recognized in the hemolymph of the spider *Lasiadora* sp: granulocytes type I, granulocytes type II, granulocytes type III, granulocytes type IV, granulocytes type V and plasmatocytes.

3.1 Hemocytes cell types

3.1.1 Granulocytes type I

Granulocytes I (Gr I) were the biggest cells found in the hemolymph, displaying a spherical profile of approximately 39 μm in diameter. The large and centrally located nucleus almost fills the whole cell. The chromatin is intent, the cytoplasm was homogeneous with some vesicles and only a few structures can be seen, with a conspicuous development of granules and mitochondria. These granules can be found at different stages of formation in addition to possess different electrodense.

3.1.2 Granulocytes type II

Granulocytes II presented an elongate profile of approximately 42-56 μm in diameter and the nucleus was central and follows the format of the cell. The cytoplasm was rich in mitochondria that were polymorphics - rounded or elongated. The electrodense granules were the most proeminent granules found in the hemocytes cell types. In

electron micrographs, these hemocytes showed the lobated nucleus with heterochromatin present.

3.1.3 Granulocytes type III

Granulocytes III (Gr III) presented an elliptical profile of approximately 16-33 μm in diameter and the nucleus was central and follows the format of the cell. The cytoplasm presented less mitochondria than Gr II; the electron-dense granules were also prominent differ only in the format, more elliptical than the Gr II. In electron micrographs, these hemocytes showed the lobated nucleus with heterochromatin attached to the nuclear membrane.

3.1.4 Granulocytes type IV

The granulocytes IV (Gr IV) or spherulocytes shows an rounded cell profile with average diameter of 19-22 μm in diameter, displaying a round nucleus which almost fills the whole cell and a condensed chromatin. These cells showed a big number of large inclusions (the spherules) that cause the cell to adopt an irregular shape. We suggest that spherulocytes may be involved in the process of coagulation of hemolymph because we have witnessed the phenomenon of clot formation.

3.1.5 Granulocytes type V

Granulocytes V (Gr V) with homogeneous cytoplasm, presenting rounded shaped cells measuring approximately 44-50 μm in diameter. The ultrastructure revealed many electron-dense mitochondria, some granulocytes with different electron density (when compared with other cell types) and the heterochromatin attached to the nuclear membrane.

3.1.6 Plasmatocytes

The plasmatocytes (Pl) varied from spindle-shaped to round cells, measuring approximately 17-20 μm in diameter and the cytoplasm was agranular. The heterochromatin clumps were present. In TEM, vesicles and mitochondria were observed.

3.2 Phagocytic assay

Phagocytic activity of hemocytes was evaluated by experiments *in vitro* and *in vivo* and they were examined by confocal microscopy. After inoculation of latex particles *in vitro*, hemocytes showed no morphological changes at various periods of observation, but they had some phagocytic activity, especially for the type Gr I; in the challenged spiders, was observed the same phenomenon, specially for Gr I, Gr II and less for Gr III. Two hours after the host inoculation the degranulation or secretion of granular contents by exocytosis was profusely observed and it was quietly observed in the first hours at this experiment.

4. Discussion

Identification of hemocytes is essential to understand hemocyte-mediated immune responses in invertebrates [5]. The studies of arthropod hemocytes have mainly been motivated by the significance of these cells in interactions host-pathogens and, due to this fact, the mainstream of hemocyte research focuses traditionally on insects, a group containing many important vectors of human stand point-of-view. As a result, the majority of data on arthropod hemocytes, including their classification schemes and terminology, is derived from this group of arthropods [11]. In this scenario, our

examination provides new ultrastructural data and reveals several differences between arthropods hemocytes, thus highlighting the difficult points in establishing a reliable classification of spider hemocytes.

Sherman [12] has classified the hemocytes of the spider *Eurypelma marxi* following the insect's nomenclature. He observed sections of a spider heart by TEM and found at least three types of hemocytes: plasmatocytoids (quite abundant), oenocytoids (5% of the hemocytes population) and some hemocytes appeared to be in transition from plasmatocytoids to both oenocytoids and granular hemocytes.

Foelix [13] classify the spider cell types at least in four types defined granulocytes, leberidiocytes, cyanocytes and prohemocytes. The granulocytes, named because of the numerous dense granules in cytoplasm. These cells were the most abundant in our work, result also found for the spider *A. gomesiana* by Fukuzawa and coworkers [2]. The leberidiocytes was firstly described in the horseshoe crab *limulus* [14]; and in his hemolymph its present just one type of cells, called amebocytes or granulocytes, and these cells are extremely sensitive to bacterial endotoxin. The cytoplasm of this hemocyte is filled with two types of granules, larger but less dense and smaller but dense [15]. The leberidiocytes and cyanocytes did not have similarities with those cells described above, and they were not detected in our analysis.

This study was not able to detect a typical stem cell with entirely undifferentiated cytoplasm, the prohemocytes. We agree with Borovičková and Hypša [11] that cited in their work that is none of the preceding studies were able to bring a convincing picture of such cell type and suppose that the main problem with detection of prohemocytes in the very initial stage may stem from their rapid differentiation and hence a low probability of their observance in a sample.

The polymorphic granulocytes, described above in results, presented a rounded (Gr I/V), elongate (Gr II), elliptical (Gr III), oval (Gr IV) or yet irregular profile with a large and varied amount of granules; except the plasmatocytes which was agranular. These granules had differences in electrodensity when compared with another granulocytes type and they could be found at the periphery of the cell. The granules can be differentiated into: quantity, distribution and shape.

Arthropods have open circulatory systems and must seal wounds and keep bacteria from entering the hemocoel using efficient clotting systems [16]. As seen by Fukuzawa and coworkers [2], the injection of fluorescent particles into the spider leg clearly activated a coagulation cascade; we suggest that the same process occurred in the heart with the spherulocytes. Another clotting reaction observed for us in *Lasiadora* sp and in *A. gomesiana* by Fukuzawa and coworkers [2] was that in the absence of an anticoagulation solution the hemolymph coagulated during the collection. The clot presumably serves to immobilize bacteria, reducing the risk of their systemic dispersal [17].

Fukuzawa and coworkers [2] suggest that phagocytosis is not the major defense mechanism activated upon microbial challenge and probably plays a secondary role, being responsible for clearing cellular debris and remodeling damaged tissues. They also related that the *in vitro* experiments did not activate the hemocyte phagocytic response in *A. gomesiana*. Interestingly, phagocytosis in horseshoe crab was only observed after hemocyte incubation with endotoxin free iron particles [17]. On the other hand, the *Lasiadora* sp hemocytes showed phagocytic activity in the *in vitro* and *in vivo* experiments.

5. Conclusions

For the first time, new blood cell types have been found in the circulation of the tarantula spider *Lasiodora* sp. The granulocytes, which have been named I to V, are replete with free granules, nevertheless, the plasmatocytes were agranular. These cells showed phagocytic activity *in vitro* and *in vivo*. In comparison with the studies published so far, our examination provides new ultrastructural data establishing a reliable classification of *Lasiodora* sp hemocytes.

6. Acknowledgements

We thank Cássia Docena for helping in the confocal experiments. This work was supported by grants from Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq), CAPES, Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) and Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

7. References

- [1] C. Ribeiro and M. Brehélin, Insect haemocytes: What type of cell is that? J. Insect Physiol. 52 (2006) 417–429.
- [2] A.H. Fukuzawa, B.C. Vellutini, D.M. Lorenzini, P.I. Silva Junior, R.A. Mortara, J.M.C. Silva, S. Daffre, The role of hemocytes in the immunity of the spider *Acanthoscurria gomesiana*, Develop. Comp. Immunol. 32 (2008), 716-25.
- [3] M.D. Lavine and M.R. Strand, Insect hemocytes and their role in immunity, Insect Biochem. Mol. Biol. 32 (2002) 1295-309.

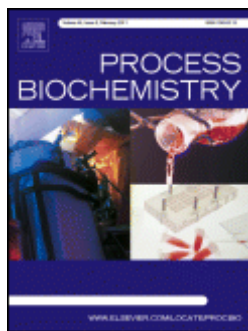
- [4] N. Okino, S. Kawabata, T. Saito, M. Hirata, T. Takagi, S. Iwanaga, Purification, characterization, and cDNA cloning of a 27-kDa lectin (L10) from horseshoe crab hemocytes, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 31008-15.
- [5] K. Kadota, S. Walter, F.G. Claveria, I. Igarashi, D. Taylor, K. Fujisaki, Morphological and populational characteristics of hemocytes of *Ornithodoros moubata* nymphs during the ecdysal phase, *J. Med. Entomol.* 40 (2003) 770-776.
- [6] N. Inoue, K. Hanada, N. Tsuji, I. Igarashi, H. Nagasawa, T. Mikami, K. Fujisaki, Characterization of phagocytic hemocytes in *Ornithodoros moubata* (Acari: Ixodidae), *J. Med. Entomol.* 38 (2001) 514-519.
- [7] L.D. Rash and W.C. Hodgson, Pharmacology and biochemistry of spider venoms, *Toxicon.* 40 (2002) 225-54.
- [8] R. Bertani, Revision, Cladistic Analysis, and Zoogeography of *Vitalius*, *Nhandu*, and *Proshapalopus*; with notes on other Theraphosine genera (Araneae, Theraphosidae), *Arquivos de Zoologia* V. 36, São Paulo, 2001.
- [9] K. Soderhall and V.J. Smith, Separation of the hemocyte populations of *Carcinus maenas* and other marine decapods, and prophenoloxidase distribution, *Dev. Comp. Immunol.* 7 (1983) 229-39.

- [10] F.A. Brayner, H.R.C. Araújo, M.G.S. Cavalcanti, L.C. Alves, C.A. Peixoto, Ultrastructural characterization of the hemocytes of *Culex quinquefasciatus* (DIPTERA: Culicidae), *Micron* 36 (2005) 359–367.
- [11] B. Borovičková and V. Hypša, Ontogeny of tick hemocytes: a comparative analysis of *Ixodes ricinus* and *Ornithodoros moubata*, *Exp. Appl. Acarol.* 35 (2005) 317-333.
- [12] R.G. Sherman, Ultrastructural features of cardiac muscle cells in a tarantula spider, *J. Morphol.* 140 (1973) 215–41.
- [13] R. Foelix, *Biology of spiders*, second ed., Oxford University Press Inc, New York, 1996.
- [14] W. H. Fahrenbach, The cyanoblast: hemocyanin formation in *Limulus polyphemus*, *J. Cell Biol.* 44 (1970) 445–53.
- [15] T. Shigenaga, Y. Takayenoki, S. Kawasaki, N. Seki, T. Muta, Y. Toh, A. Ito, S. Iwanaga, Separation of large and small granules from horseshoe crab (*Tachypleus tridentatus*) hemocytes and characterization of their components, *J. Biochem.*, 114 (1993) 307-316.
- [16] U. Theopold, O. Schmidt, K. Soderhall, M.S. Dushay, Coagulation in arthropods: defence, wound closure and healing, *Trends Immunol.* 25 (2004) 289–94.
- [17] Armstrong PB, Levin J. Invitro phagocytosis by limulus bloodcells. *J Invert Pathol* 1979;34(2):145–51.

6.2 Artigo 2

THE FIRST SERINE PROTEASE INHIBITOR FROM *Lasiodora* sp (ARANEAE: Theraphosidae) HEMOCYTES

Revista para submissão:



Fator de impacto: 2.444

THE FIRST SERINE PROTEASE INHIBITOR FROM
Lasiadora sp (ARANEAE: Theraphosidae) HEMOCYTES

**Tatiana Soares¹, Felipe Roberto Borba Ferreira¹, Luana Cassandra Breitenbach
Barroso Coelho¹, Ricardo José Soares Torquato², Maria do Socorro de Mendonça
Cavalcanti³, Aparecida Sadae Tanaka², Patrícia Maria Guedes Paiva^{1*}**

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

²Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil.

³Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

*Patrícia Maria Guedes Paiva, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil, 50670-420, ppaivaufpe@yahoo.com.br, Tel: +558121268540; Fax: +558121268576.

ABSTRACT

The genus *Lasiodora* sp is the object of a systematic review, but the literature lists no study on the presence of protein molecules in the hemolymph and hemocytes of this genus. In this work, we purified and characterized, for the first time, a serine protease inhibitor from *Lasiodora* sp hemocytes. The inhibitor was purified by trypsin-Sepharose column and RP-HPLC. SDS-PAGE revealed a molecular mass of 8 kDa and MALDI-TOF mass spectrometry revealed a single molecular mass of 8274 Da. The amino terminal sequence determined was LPCP(F)PYQQELTC. The dissociation constant (K_i) for human neutrophil elastase was 0.32 nM. Interestingly, these data are important to start to shed more light on the physiological role played by serine protease inhibitors in spiders.

Keywords: serine protease inhibitor; hemocytes; *Lasiodora* sp; spider.

1. Introduction

Arachnids comprise the largest and, from a human standpoint, the most important and numerous class of chelicerates, of which the most common and best known are spiders, scorpions, mites and ticks. The Brazilian spider *Lasiodora* (Mygalomorphae, Theraphosidae), whose trivial name is “caranguejeira”, or tarantula, is distributed in northeastern Brazil, in the rain forest [1].

Spiders are the most diverse and successful terrestrial invertebrates after insects, which are their primary prey [2]. This success is due to innate immunity, carried out mostly by hemocytes and that can be classified into humoral and cellular defenses. Phagocytosis, complement, antimicrobial peptides, coagulation and melanization are instances of cellular defenses, while humoral defense usually involves components released from hemocytes, which include antimicrobial peptides, proteases and proteinase inhibitors [3-7].

Protease inhibitors are essential for all organisms, chiefly for controlling protein damage of self and non-self proteases [8]. They can be serine, cysteine, aspartic or metalloproteinase inhibitors and the relatively well characterized families are Kazal, Kunitz and Pacifastin [9-11].

Serine proteinase inhibitors play important roles as modulators of several biological processes such as apoptosis, digestion, prophenol oxidase activation, blood coagulation, cellular remodeling, metamorphosis, complement system and defense against invading organisms [12-18]. Elastase inhibitors have been isolated from numerous invertebrates, including the locust *Schistocerca gregaria* [19], the shrimp *Penaeus monodon* [20, 9, 21], the kissing bug *Triatoma infestans* [8], the tick *Boophilus microplus* [5, 22, 23] and *Rhipicephalus (B.) microplus* [24]; however, to our knowledge no elastase inhibitor has been purified from *Lasiodora* sp hemocytes. In this

scenario, the aim of the present study was the characterization of a serine protease inhibitor from *Lasiodora* sp hemocytes.

2. Materials and Methods

2.1 Spiders and sample collection

The animals used in the experiments were adult females in the intermolt stage. Hemolymph was collected from 16 spiders (approximately 1 ml per animal) by cardiac puncture with an apyrogenic syringe in 3% NaCl supplemented with 2 mM propanolol, to avoid coagulation. The hemocytes were obtained from plasma by centrifugation at 800 *g* for 10 min at room temperature.

2.2 Hemocyte extract

Hemocytes were dried by lyophilisation and macerated in 100 μ l of 0.15 M NaCl. Then, 900 μ l of 0.15 M NaCl was added. The macerated hemocyte mass was centrifuged at 800 *g* for 10 min at room temperature and the supernatant (hemocyte extract) was collected and stored at -20°C.

2.3 Protein determination and protease inhibition assay

Protein concentration was determined according to Coomassie Blue dye binding method [25]. Bovine serum albumin was used as standard protein. Protease inhibition assay was carried out using hemocyte extract as well as sample obtained during inhibitor purification. The hemocyte samples were pre-incubated with the enzymes and after 10 min at 37°C, specific substrates (Chromogenix, Sweden) were added to the final concentration of 0.2 mM: Suc (Ala)₂-Pro-Phe-pNa (4 mM chymotrypsin), Suc-Ala-Ala-Pro-Val-pNA (4 mM human neutrophil elastase - HNE), HD-Val-Leu-Lys-pNA (4 mM

plasmin), tosyl-Gly-Pro-Arg-pNA (4 mM trypsin), Glu-Gly-Arg-pNA (10 mM urokinase), Bz-Ile-(OR)-Gly-Arg-pNA (4 mM factor Xa), HD-Pro-Phe-Arg-pNA (3.64 mM plasma kallikrein- HuPK), Boc-Gly-Gly-Leu-pNA (4 mM subtilisin), HD- Phe-Pip-Arg-pNA (4 mM thrombin) and HD-Ile-Pro-Arg-pNA (4 mM tissue plasminogen activator- TPA). The protease residual activities were determined by measuring absorbance at 405 nm after incubation for 15 min at 37°C in a spectrophotometer (ThermoLabsystems, Finland; model iEMS). Control reactions were performed under the same conditions, without the inhibitor.

2.4 Isolation of elastase inhibitor by affinity chromatography on trypsin-Sepharose and reversed-phase chromatography

The hemocyte extract (46.86 mg) exerting inhibitory activity against proteases was applied in a trypsin-Sepharose column (1 ml) equilibrated with 50 mM Tris-HCl pH 8.0 at a flow rate of 0.16 ml/min, and 1 ml fractions were collected. Proteins were eluted with 0.5 M KCl-HCl pH 2.0 at the same flow and neutralized by adding 50 µl 1 M Tris-HCl pH 8.0. Protein was measured by absorbance at 280 nm. The material (3.06 mg) eluted from trypsin-Sepharose chromatography was applied in a Sephasil Peptide C₁₈ column connected to an ÄKTA System (GE Healthcare) pre-equilibrated with 0.1% trifluoroacetic acid (TFA, solution A) at the flow rate of 0.5 ml/min, and 1 ml fractions were collected. Proteins were eluted with a linear gradient 0.1% TFA in 90% acetonitrile (solution B). Purified elastase inhibitor was named EILaH (Elastase Inhibitor from *Lasiadora* sp Hemocytes).

2.5 Determination of equilibrium dissociation constant (K_i)

The equilibrium dissociation constant of EILaH with neutrophil elastase was

determined according to Bieth [26]. Briefly, serine protease was incubated with different concentrations of EILaH in 0.1 M Tris-HCl pH 8.0, 0.15 M NaCl, 0.1% Triton X-100, 37°C and residual activities were measured after addition of chromogenic substrate Suc-Ala-Ala-Pro-Val-pNA (for human neutrophil elastase, HNE). Enzymatic residual activities were measured by absorbance at 405 nm using a Synergy HT microplate reader (BioTek). Apparent K_i values were calculated by fitting the steady-state velocities to the equation for the tight-binding inhibitor using a non-linear regression analysis [27].

2.6 SDS-PAGE analysis

Samples were analyzed by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) according to Laemmli [28]. The concentration of acrylamide was 12% in the separating gel and 5% in the stacking gel. Gels were stained with Silver (BioAgency, Brazil). The molecular weight standards (Sigma, USA) were: β -galactosidase (116 kDa), phosphorylase b (97 kDa), albumin (66 kDa), glutamic dehydrogenase (55 kDa), ovalbumin (45 kDa), carbonic anhydrase (29 kDa), trypsin inhibitor (20 kDa), and α -lactalbumin (14.2 kDa).

2.7 N-terminal amino acid sequencing

The N-terminal amino acid sequence of EILaH was determined by Edman degradation [29] using a PPSQ-23 Model Protein Sequencer (Shimadzu, Japan), this experiment was performed by Dr. Hirata from Departamento de Biofisica – UNIFESP. Acquired data were searched against the NCBI nr protein database for animal protein sequences.

2.8 Mass spectrometry analysis

EILaH molecular mass determination was carried out on a TOF Spec E mass spectrometer (Micromass, Manchester, UK) operating in linear mode using the matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight (MALDI-TOF) method, using *o*-cyano-4-hydroxycinnamic acid as the matrix. This experiment was performed by Dr. Maria Juliano from Departamento de Biofísica – UNIFESP.

3. Results

The *Lasiodora* sp hemocyte extract inhibited chymotrypsin (22%), trypsin (44%), TPA (52%), urokinase (58%) and HNE (99%); inhibition of factor Xa, thrombin, plasmin, HuPK and subtilisin was not detected.

Hemocyte extract was applied on trypsin-Sepharose column and the adsorbed fractions eluted with 0.5 M KCl-HCl pH 2.0 showed inhibitory activity on trypsin and HNE. The pool of fractions with inhibitory activity from affinity column was further purified on Sephasil C₁₈ column. The elastase inhibitor (EILaH) was successfully isolated by this purification strategy. Purified EILaH was shown to be homogeneous by SDS-PAGE with a molecular mass of 8 kDa. The inhibitor was shown to be pure and its molecular mass confirmed by MALDI-TOF mass spectrometry which revealed a single molecular mass of 8274 Da.

EILaH is a strong neutrophil elastase inhibitor, with dissociation constant (K_i) of 0.32 nM. The purification strategy of EILaH was optimized but the low yield of purified inhibitor (44 µg), obtained from 46.86 mg starting material, only allowed us to perform one N-terminal sequencing experiment, whose result was LPCP(F)PYQQELTC.

4. Discussion

Proteases comprise a broad range of hydrolytic enzymes which catalyze the

cleavage of targeted protein substrates. Hydrolysis of peptide bonds occurs by means of nucleophilic attack, which however is governed by different catalytic mechanisms [30].

Protease inhibitors are important molecules for invertebrate animals to control extracellular serine protease cascades that mediate rapid defense responses upon wounding or pathogen infection. In this study, it was demonstrated that hemocytes from the tarantula spider *Lasiodora* sp contain a powerful neutrophil elastase inhibitor named EILaH. Several inhibitors belonging to the families Kunitz and Serpin have been isolated, especially from hemolymph of arthropods.

Twelve forms of inhibitors from *B. microplus* (BmTIs) were isolated from larvae and demonstrated to have inhibitory activity for trypsin, HNE and HuPK with dissociation constants $K_i(s)$ in the nM range [31]. The purified EILaH presented K_i value of 0.32 nM, in the same range as the BmTI inhibitors.

Purification of EILaH was conducted in two chromatographic steps which yielded 44 μ g of purified EILaH. The material eluted from trypsin-Sepharose column inhibited only trypsin and HNE, suggesting that this chromatography step was important to isolate EILaH from other protease inhibitors present in the hemocyte extract. But the final purification of EILaH was obtained by a reversed phase chromatography. The inhibitor was still active against HNE after RP-HPLC, but not against trypsin. This result may suggest that the same hypothesis is valid: native EILaH is a trypsin inhibitor, and its activity is affected by organic solvent during the RP-HPLC experiment. Alternatively, it may be conjectured that another inhibitor was responsible for trypsin activity; however, more studies are needed so as to prove the case.

Considering the molecular mass of EILaH around 8 kDa, this inhibitor could be a member of several different serine protease families, since those molecules were described in many invertebrates, as for instance BmSI-7 7408 Da and BmSI-6 7271 Da

[23] , BmTI-D 8000 Da from the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* [31] , and greglin 9229 Da from the locust *Shistocerca gregaria* [19]. In attempt to classify the inhibitor, its N-terminal sequence was determined and the resulting amino acid sequence, LPCP(F)PYQQELTC, did not show any similarity with known members of the family of protease inhibitors.

The current literature lists studies about the toxins in *Lasiodora* sp venom [32-34], but no investigation on serine protease inhibitors in hemocytes has been reported. The present study is the first report of an elastase inhibitor from *Lasiodora* sp hemocytes. However, further studies are in progress to elucidate the physiological role of EILaH in this arthropod species.

5. Acknowledgements

This work was supported by grants from Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq), CAPES, Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de São Paulo (FAPESP) and Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE). We are grateful to Dr. Maria A. Juliano and Dr. Izaura Y. Hirata of Departamento de Biofísica, UNIFESP, for performing the Mass Spectrometry analysis and N-terminal amino acid sequencing, respectively.

6. References

- [1] Bertani R. Revision, Cladistic Analysis, and Zoogeography of *Vitalius*, *Nhandu*, and *Proshapalopus*; with notes on other theraphosine genera (Araneae, Theraphosidae). São Paulo: Arquivos de Zoologia; 2001. V. 36 (3).
- [2] Rash LD, Hodgson WC. Pharmacology and biochemistry of spiders venoms. Toxicon 2002; 40: 225–254.

- [3] Cerenius L, Söderhäll K. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunol. Rev.* 2004; 198: 116–26.
- [4] Iwanaga S, Lee BL. Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. *J. Biochem. Mol. Biol.* 2005; 38: 128-150.
- [5] Fogaça AC, Almeida IC, Eberlin MN, Tanaka AS, 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* 2006; 27: 667-674.
- [6] Jiravanichpaisal P, Lee BL, Söderhäll K. Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. *Immunobiol.* 2006; 211(4): 213–36.
- [7] Donpudsa S, Tassanakajon A, Rimphanitchayakit V. Domain inhibitory and bacteriostatic activities of the five-domain Kazal-type serine proteinase inhibitor from black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Dev. Comp. Immunol.* 2009; 33: 481–488.
- [8] de Marco R, Lovato DV, Torquato RJS, Clara RO, Buarque DS, Tanaka AS. The first pacifastin elastase inhibitor characterized from a blood sucking animal. *Peptides* 2010; 31: 1280-1286.
- [9] Fritz H, Wunderer G, Dittmann B. The isolation of porcine and human kallikrein using affinity chromatography: specific binding to water-insoluble Kunitz soybean-inhibitor-celluloses and dissociation with competitive inhibitors (benzamidine). *Hoppe Seylers Z Physiol. Chem.* 1972; 353: 893–900.
- [10] Kato I, Schrode J, Kohr WJ, Laskowski Jr M. Chicken ovomucoid: determination of its amino acid sequence, determination of the trypsin reactive site and preparation of all three of its domains. *Biochemistry* 1987; 26: 193–201.

- [11] Simonet G, Claeys I, Franssens V, De Loof A, Broeck JV. Genomics, evolution and biological functions of the pacifastin peptide family: a conserved serine protease inhibitor family in arthropods. *Peptides* 2003; 24: 1633–1644.
- [12] Laskowski Jr M, Kato I. Protein inhibitors of proteinases. *Annu. Rev. Biochem.* 1980; 49: 593–626.
- [13] Bode W, Huber R. Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. *Eur. J. Biochem.* 1992; 204: 433–451.
- [14] Kanost MR. Serine proteinase inhibitors in arthropod immunity. *Dev. Comp. Immunol.* 1999; 23: 291–301.
- [15] Laskowski M, Qasim MA. What can the structures of enzyme–inhibitor complexes tell us about the structures of enzyme substrate complexes? *Biochim. Biophys. Acta.* 2000; 1477: 324–337.
- [16] Morris MT, Coppin A, Tomavo S, Carruthers VB. Functional analysis of *Toxoplasma gondii* protease inhibitor. *J. Biol. Chem.* 2002; 277(47): 45259–66.
- [17] Kress H, Jarrin A, Thüroff E, Saunders R, Weise C, Schmidt am Busch M, Knapp EW, Wedde M, Vilcinskas A. A Kunitz type protease inhibitor related protein is synthesized in *Drosophila prepupal* salivary glands and released into the moulting fluid during pupation. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 2004; 34: 855–869.
- [18] Zheng QL, Chen J, Nie ZM, Lv ZB, Wang D, Zhang YZ. Expression, purification and characterization of a three-domain Kazal-type inhibitor from silkworm pupae (*Bombyx mori*). *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 2007; 146: 234–240.
- [19] Brillard-Boudert M, Hamdaoui A, Hajjar E, Boudier C, Reuter N, Ehret-Sabatier L, Bieth JG, Gauthier F. A novel locust (*Schistocerca gregaria*) serine protease inhibitor with a high affinity for neutrophil elastase. *Biochem. J.* 2006; 400: 467–

476.

- [20] Somprasong N, Rimphanitchayakit V, Tassanakajon A. A five-domain Kazal-type serine proteinase inhibitor from black tiger shrimp *Penaeus monodon* and its inhibitory activities. Dev. Comp. Immunol. 2006; 30: 998–1008.
- [21] Visetnan S, Donpudsa S, Supungul P, Tassanakajon A, Rimphanitchayakit V. Kazal-type serine proteinase inhibitors from the black tiger shrimp *Penaeus monodon* and the inhibitory activities of SPIPm4 and 5. Fish & Shellfish Immunology 2009; 27: 266–274.
- [22] Sasaki SD, Cotrin SS, Carmona AK, Tanaka AS. An unexpected inhibitory activity of Kunitz-type serine proteinase inhibitor derived from *Boophilus microplus* trypsin inhibitor on cathepsin L. Biochem. Bioph. Res. Co. 2006; 341: 266-272.
- [23] Sasaki SD, de Lima CA, Lovato DV, Juliano MA, Torquato RJS, Tanaka AS. BmSI-7, a novel subtilisin inhibitor from *Boophilus microplus*, with activity toward Pr1 proteases from the fungus *Metarhizium anisopliae*. Exp. Parasitol. 2008; 118: 214-220.
- [24] Tanaka AS, Andreotti R, Gomes A, Torquato RJ, Sampaio MU, Sampaio CA. A double headed serine proteinase inhibitor – human plasma kallikrein and elastase inhibitor – from *Boophilus microplus* larvae. Immunopharmacology 1999; 45: 171–177.
- [25] Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 1976; 72: 248-254.
- [26] Bieth JG. Pathophysiological interpretation of kinetic constants of protease inhibitors. Bull. Eur. Physiopathol. Respir. 1980; 16: 183-97.

- [27] Morrison JF. Kinetics of the reversible inhibition of enzyme catalysed reactions by tight-binding inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta.* 1969; 185: 269-286.
- [28] Laemmli UK. Cleavage of structural protein during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685.
- [29] Edman P, Begg G. A protein sequenator. *Eur. J. Biochem.* 1967; 1: 80-91
- [30] Scott CJ, Taggart CC. Biologic protease inhibitors as novel therapeutic agents. *Biochimie* 2010; 11: 1681-8.
- [31] Sasaki SD, Azzolini SS, Hirata IY, Andreotti R, Tanaka AS. *Boophilus microplus* tick larvae, a rich source of Kunitz type serine proteinase inhibitors. *Biochimie* 2004; 86 (9-10): 643-9.
- [32] Kalapothakis E, Kushmerick C, Gusmão DR, Favaron GOC, Ferreira AJ, Gomez MV, de Almeida AP. Effects of the venom of a Mygalomorph spider (*Lasiodora* sp) on the isolated rat heart. *Toxicon* 2003; 41: 23-28.
- [33] Kushmerick C, de Carvalho FM, de Maria M, Massensini AR, Romano-Silva MA, Gomez MV, Kalapothakis E, Prado MAM. Effects of a *Lasiodora* spider venom on Ca²⁺ and Na⁺ channels. *Toxicon* 2001; 39: 991-1002.
- [34] Vieira ALG, Moura MB, Babá EH, Chávez-Olórtegui C, Kalapothakis E, Castro IM. Molecular cloning of toxins expressed by the venom gland of *Lasiodora* sp. *Toxicon* 2004; 44: 949-952.

7. Conclusões

O estudo fornece dados para a caracterização inédita de *Lasiadora* sp ao identificar, pela primeira vez, tipos celulares presentes na hemolinfa e um inibidor de elastase.

Análises microscópicas revelaram que *Lasiadora* sp contém granulócitos (tipos I a V) e plasmatócitos; alguns tipos celulares apresentaram atividade *in vivo* e *in vitro*.

Contribui também para a determinação do papel bioquímico do inibidor de elastase de hemócitos, EILaH, que tem K_i de 0,32 nM, massa molecular de 8.274 Da e sequência de resíduos N-terminal LPCP(F)PYQQELTC.