

Milena Palmeira Reis Caldeira Brant

**Análise Bioquímica dos Produtos de
Excreção/Secreção de Larvas de
Dermatobia hominis.**

*Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual
Paulista, Campus de Botucatu, para obtenção do
título de Mestre em Clínica Veterinária.*

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Teresa Cristina Goulart de Oliveira Sequeira

Botucatu - SP

2004

SUMÁRIO

| | Página |
|---|--------|
| 1. INTRODUÇÃO | 15 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | 18 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS | 29 |
| 3.1. Laboratórios | 29 |
| 3.2. Obtenção de larvas de <i>D. hominis</i> | 29 |
| 3.3. Obtenção dos produtos de excreção/secreção das larvas de <i>D. hominis</i> | 30 |
| 3.4. Dosagem de proteínas dos produtos de excreção/secreção..... | 31 |
| 3.5. Perfil protéico dos produtos de excreção/secreção de larvas de <i>D. hominis</i> | 31 |
| 3.5.1. Eletroforese das proteínas dos produtos de excreção/secreção..... | 31 |
| 3.5.2. Coloração dos géis para visualização das proteínas..... | 33 |
| 3.6. Atividade proteolítica dos produtos de excreção/secreção de larvas de <i>D. hominis</i> | 33 |
| 3.6.1. Zimograma em géis de SDS-PAGE copolimerizado com gelatina..... | 33 |
| 3.6.1.1. Efeito de inibidores de proteases sobre os produtos de excreção/secreção de larvas de <i>D. hominis</i> | 34 |
| 3.6.2. Ensaio enzimático com substrato cromóforo..... | 36 |
| 3.6.2.1. Ensaio com azocaseína..... | 36 |
| 3.6.2.1.1. Efeito de inibidores de protease sobre a clivagem enzimática da azocaseína pelos produtos de excreção/secreção de larvas de <i>D. hominis</i> | 37 |

| | |
|--|----|
| 3.6.2.2. Ensaio com N α - benzoil-DL-Arg-p-nitroanilida (BAPNA)..... | 38 |
| 3.6.2.2.1. Efeito de inibidores de protease sobre a clivagem enzimática de N α - benzoil-DL-Arg-p-nitroanilida (BAPNA) pelos produtos de excreção/secreção de larvas de <i>D. hominis</i> | 39 |
| 4. RESULTADOS..... | 41 |
| 4.1. Perfil protéico dos produtos de excreção/secreção de larvas de <i>D. hominis</i> | 41 |
| 4.1.1. Eletroforese das amostras pré-tratadas com inibidores (PMSF, TPCK, TLCK)...... | 41 |
| 4.1.2. Eletroforese das amostras não tratadas com inibidores..... | 43 |
| 4.2. Atividade proteolítica dos produtos de excreção/secreção de larvas De <i>D.hominis</i> | 45 |
| 4.2.1. Zimograma em géis de SDS-PAGE copolimerizado com gelatina. | 45 |
| 4.2.2. Efeito de inibidores de protease sobre os produtos excreção/secreção de larvas de <i>D. hominis</i> | 46 |
| 4.2.3. Atividade proteolítica dos produtos de excreção/secreção de larvas de <i>D.hominis</i> sobre azocaseína..... | 53 |
| 4.2.4. Efeito de inibidores de protease sobre a clivagem enzimática da azocaseína pelos PE/S de larvas de <i>D. hominis</i> | 54 |
| 4.2.5. Atividade tríptica dos produtos de excreção/secreção de larvas de <i>D.hominis</i> sobre BAPNA. | 57 |
| 4.2.6. Efeito de inibidores de protease sobre a clivagem enzimática de N α -benzoil-DL-Arg-p-nitroanilida (BAPNA),pelos produtos de excreção/secreção de larvas de <i>D.hominis</i> | 58 |
| 5. DISCUSSÃO..... | 62 |
| 6. CONCLUSÕES..... | 71 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 73 |

LISTA DE FIGURAS

| | página |
|---|--------|
| Figura 1. Perfis protéicos dos produtos de excreção/secreção de larvas de primeiro, segundo e terceiro estágios de <i>D. hominis</i> , previamente tratados com PMSF, TPCK e TLCK. (SDS-PAGE-Prata)..... | 42 |
| Figura 2. Perfis protéicos dos produtos de excreção/secreção de larvas de primeiro, segundo e terceiro estágios de <i>D. hominis</i> , não tratadas com inibidores:(SDS-PAGE-Prata). | 44 |
| Figura 3. Gel de atividade proteolítica dos PE/S de larvas de primeiro(L1) estágio de <i>D. hominis</i> . Amostras tratadas com inibidores (SDS-PAGE-Gelatina - Amido Black). | 47 |
| Figura 4. Gel de atividade proteolítica dos PE/S de larvas de primeiro estágio (L1) de <i>D. hominis</i> . Amostras tratadas com inibidores (SDS-PAGE-Gelatina – Amido Black) | 48 |
| Figura 5. Gel de atividade proteolítica dos PE/S de larvas de segundo estágio (L2) de <i>D. hominis</i> . Amostras tratadas com inibidores. (SDS-PAGE-Gelatina – Amido Black) | 50 |
| Figura 6. Gel de atividade proteolítica dos PE/S de larvas de terceiro estágio (L3) de <i>D. hominis</i> . Amostras tratadas com inibidores (SDS-PAGE-Gelatina – Amido Black)..... | 52 |
| Figura 7. Cinética da Atividade proteolítica dos PE/S de larvas de primeiro, segundo e terceiro estágios de <i>D. hominis</i> sobre a azocaseína. | 53 |
| Figura 8. Hidrólise da azocaseína pelos PE/S de larvas de primeiro estágio (L1) de <i>D. hominis</i> , tratados e não tratado (CE) com inibidores de protease. | 54 |
| Figura 9. Hidrólise da azocaseína pelos PE/S de larvas de segundo estágio (L2) de <i>D. hominis</i> , tratados e não tratado (CE) com inibidores de protease..... | 55 |

| | |
|---|----|
| Figura 10. Hidrólise da azocaseína pelos PE/S de larvas de terceiro estágio (L3) de <i>D. hominis</i> , tratados e não tratado (CE) com inibidores de protease..... | 56 |
| Figura 11. Cinética da Atividade hidrolítica dos PE/S de larvas de primeiro, segundo e terceiro estágios de <i>D. hominis</i> sobre BAPNA. | 57 |
| Figura.12. Atividade proteolítica dos PE/S de larvas de segundo estágio (L2) de <i>D.hominis</i> , tratados e não tratados (CE) com inibidores de proteases, sobre BAPNA. | 59 |
| Figura 13. Atividade proteolítica dos PE/S de larvas de terceiro estágio(L3) de <i>D. hominis</i> , tratados e não tratados (CE) com inibidores de proteases, sobre BAPNA..... | 60 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-------------------|---------------------------------------|
| BCA | ácido bicinconínico |
| BOD | Biological Oxigen Demand |
| CaCl ₂ | cloreto de cálcio |
| CE | Controle da enzima |
| DTT | Ditiotreitol |
| HCL | ácido clorídrico |
| kDa | Kilodalton |
| M | molar |
| mA | miliampére |
| µg | micrograma |
| µl | microlitro |
| mM | milimolar |
| mU | miliunidade |
| PAGE | eletroforese em gel de poliacrilamida |
| pH | potencial hidrogeniônico |
| PE/S | produto de excreção/secreção |
| p/v | peso por volume |
| SDS | dodecil sulfato de sódio |
| TCA | ácido tricloroacético |
| Tris-tris | (hidroximetil) aminometano |
| U | Unidade |
| V | volts |
| v/v | volume por volume |

RESUMO

O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de caracterizar os produtos de excreção/secreção (PE/S) de larvas de *Dermatobia hominis*, especialmente, no que se refere à atividade proteolítica desses produtos. Os PE/S foram obtidos de larvas de primeiro estágio (L1) cultivadas em laboratório e de larvas de segundo (L2) e terceiro (L3) estágios colhidas de bovinos parasitados. O perfil das proteínas foi obtido pela eletroforese dos PE/S em gel de poliacrilamida contendo sódio dodecil sulfato (SDS-PAGE) e a atividade proteolítica foi investigada utilizando gelatina, azocaseína e *N*- α -benzoil-arginina-nitroanilida (BAPNA) como substratos. Para caracterização das proteases foram realizados ensaios utilizando estes mesmos substratos, nos quais as amostras foram tratadas com os inibidores: PMSF, TPCK, TLCK, DCI, E-64, EDTA, Elastatinal, Leupeptina, Fenantrolina e Antipainá. Nos PE/S de L1 foram detectadas exclusivamente proteases com peso molecular aparente acima de 168 kDa, cuja inibição revelou pertencerem aos grupos das metaloproteases e serina-proteases. Os zimogramas dos PE/S de L2 e L3 em géis copolimerizados com gelatina revelaram uma ampla faixa de atividade proteolítica, na qual estavam presentes proteases de alto, médio e baixo pesos moleculares aparentes. Nos ensaios realizados com inibidores de proteases, utilizando os três substratos, as proteases presentes em L2 e L3 foram identificadas como pertencentes ao grupo das serina-proteases, sendo em L3, predominantemente, do tipo tripsina. As alterações nos padrões de proteólise e nas características bioquímicas das proteases presentes nos três estágios larvais discutiram-se à atividade das larvas em cada fase do seu desenvolvimento.

ABSTRACT

In the present investigation the biochemical characteristics of the *Dermatobia hominis* larvae secretory/excretory products (PE/S) were analyzed mainly regard to their proteolytic activities. The PE/S of first-instar larvae were collected from larvae reared in the laboratory and of the second and third instars from larvae removed from infested cattle. The PE/S were tested in a sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) to identify their proteic profiles and the proteases activity were investigated using gelatine, azocasein, and N-a-benzoil-arginine-nitroanilide (BAPNA) as substrates. The proteases characterizations were performed by treating PE/S samples by the following proteases inhibitors: PMSF, TPCK, DCI, E-64, EDTA, Elastatinal, Leupeptine, Phenatroline, and Antipain. SDS-PAGE-Gelatin profiles of L1 PE/S revealed only proteases with molecular weight above 168 KDa whereas profiles from L2 and L3 PE/S revealed a high range of proteolytic activity, including high, medium and low molecular weight proteases. The assays performed with the protease inhibitors, and gelatin and azocasein as substrates, revealed that metalloprotease is the major class of proteases present in the PE/S of L1 besides the low content of serine-proteases. The major class of proteases present in the PE/S of L2 and L3 was characterized as serine-proteases, being in L3 predominantly of trypsin type. The changes in the proteolytic patterns and biochemical characteristics of the proteases found in all three instar larvae of *D. hominis* were with the larval activity in each phase of their development.

1. INTRODUÇÃO

As larvas da mosca *Dermatobia hominis* (Linnaeus Jr., 1781) (Diptera: Cuterebridae) são responsáveis por miíases furunculares em diversas espécies de mamíferos domésticos e silvestres, incluindo o homem. Em termos econômicos e no que se refere à saúde pública, o parasitismo por esta espécie faz com que ela seja considerada a mais importante espécie da família Cuterebridae (CATTS, 1982).

Embora várias espécies de animais domésticos possam ser afetadas, economicamente, o parasitismo dos bovinos é o mais relevante. Os prejuízos à pecuária bovina incluem a redução na produção de carne e leite, retardo no crescimento dos animais (MATHEUS, 1979) e intensa desvalorização dos couros (OLIVEIRA & ROCHA, 1985). Os danos parciais ou totais produzidos nos couros bovinos são considerados os mais expressivos, pois comprometem o desempenho da indústria de calçados e de outros produtos derivados do couro (MORAES et al., 1986).

Em estudos com outros dípteros, cujas larvas produzem miíases, verificou-se que o estabelecimento das larvas nos tecidos dos hospedeiros é facilitado pela produção de quantidades consideráveis de enzimas digestivas que são secretadas e/ou excretadas. Dessa forma, estas enzimas passaram a ser vistas como um elemento chave para o estabelecimento e sobrevivência larval uma vez que são responsáveis pela digestão extra-corpórea de proteínas integrais dos tecidos, auxiliando no estabelecimento e na nutrição das larvas (MUHARSINI et al., 2000).

O interesse em investigar enzimas proteolíticas em diferentes sistemas biológicos tem se intensificado, pois verificou-se que podem constituir um alvo potencial para produção de drogas e de imunógenos para o controle de diversas enfermidades, inclusive as causadas por parasitas. Entretanto, estes estudos são ainda incipientes para grande parte dos dípteros causadores de miíases e inexistentes para *D. hominis*, a despeito da relevância dos prejuízos econômicos causados à pecuária nacional e dos problemas de saúde pública causados pela dermatobiose.

Evidências de que os produtos de excreção/secreção desempenham importante papel no estabelecimento das larvas de *D. hominis* e também nos mecanismos de evasão do parasita foram obtidos em estudos histológicos e imunoistoquímicos realizados em bovinos (OLIVEIRA-SEQUEIRA et al., 1996). Dando continuidade a estes estudos, o presente trabalho tem por objetivo iniciar os estudos de caracterização dos produtos de excreção/secreção de larvas de primeiro, segundo e terceiro estágios de *D. hominis* e de investigar, comparativamente, a atividade proteolítica desses produtos em cada estágio do desenvolvimento larval do parasita.

2. REVISÃO DE LITERATURA

As larvas de *Dermatobia hominis* (Linnaeus, Jr., 1781), (Díptera: Cuterebridae) são uma das mais freqüentes causas de miíases em regiões quentes e úmidas do continente americano. As larvas, denominadas berne no Brasil, determinam uma miíase cutânea, do tipo furunculosa, na qual as larvas se desenvolvem nos tecidos subcutâneos de animais domésticos, silvestres e também do homem (GUIMARÃES & PAPAVERO, 1999).

As miíases (do grego mûie = mosca + ase = doença) são definidas como sendo as infestações dos tecidos do homem e dos animais por larvas de dípteros, as quais, por um determinado período, se alimentam dos tecidos vivos ou mortos dos hospedeiros, de líquidos tissulares ou dos alimentos por eles ingeridos (ZUMPT, 1965).

As miíases são classificadas de acordo com a localização anatômica das larvas no corpo dos hospedeiros e também em termos parasitológicos. No segundo caso, de acordo com o tipo de relacionamento das larvas com os hospedeiros são consideradas as seguintes categorias: miíases obrigatórias, miíases facultativas e pseudomiíases. As miíases são ditas obrigatórias quando as larvas, denominadas biontófagas, se desenvolvem exclusivamente em tecidos vivos e dependem dos hospedeiros para que seu ciclo biológico se complete (HENDRIX, 1998). No caso das miíases facultativas, as larvas são denominadas necrobiontófagas; são organismos de vida livre que normalmente se desenvolvem em matéria orgânica em decomposição e cadáveres, porém, ocasionalmente, essas larvas podem se instalar em tecidos necrosados de animais vivos, determinando um quadro de miíase. As miíases acidentais ou

pseudomiíases ocorrem quando ovos ou larvas de moscas são inadvertidamente ingeridos pelos hospedeiros (HALL & WALL, 1995).

As larvas de *D. hominis* são parasitas obrigatórios que se desenvolvem em nódulos nos tecidos subcutâneos de mamíferos. A infestação dos animais ocorre quando um inseto veiculador dos ovos de *D. hominis* pousa sobre o hospedeiro, já que as fêmeas da mosca fazem as posturas no abdome de outro díptero. O calor despreendido da pele parece constituir o principal estímulo para que ocorra a eclosão das larvas (CATTS, 1982). As larvas penetram ativamente na pele íntegra, auxiliadas, provavelmente, pela secreção/excreção de enzimas proteolíticas (OLIVEIRA-SEQUEIRA et al., 1996). Migrando através da epiderme e derme, as larvas atingem o tecido subcutâneo, mantendo os espiráculos voltados para a superfície da pele. A respiração traqueal das larvas faz-se possível graças ao orifício que se mantém aberto na epiderme estabelecendo conexão com o exterior. O desenvolvimento larval inclui três estágios (L1, L2 e L3) cuja duração é variável, sendo, nos bovinos, de cerca de 40 a 60 dias. A larva de terceiro estágio, madura, abandona espontaneamente o hospedeiro através do orifício respiratório e cai no solo para pupar. O ciclo completo pode levar de 100 a 140 dias (FREITAS et al., 1978).

Dermatobia hominis se distribui desde o sul do México (24 – 26°N), em todos os países da América Central e América do Sul, exceto no Chile, até o norte da Argentina (30 – 32°S) (HALL & WALL, 1995). As maiores infestações são registradas em regiões tropicais com altitude acima de 600 metros; em altitudes acima de 1500 metros são menos abundantes ou ausentes (GUIMARÃES & PAPAVERO, 1999).

De acordo com HORN & ARTECHE (1985) o parasitismo de animais pelas larvas de *D. hominis* é encontrado em 94% dos municípios brasileiros, porém em alguns Estados das Regiões Norte e Nordeste, a presença do parasito foi creditada à presença de animais parasitados provenientes de outros Estados, e não à presença autóctone da mosca.

A dermatobiose é responsável por danos extensos à pecuária. As perdas anuais causadas pelo parasita foram estimadas em mais de 260 milhões de dólares (MATHEUS, 1979). Os prejuízos econômicos são particularmente relevantes para o país, já que o rebanho bovino do Brasil é um dos maiores do mundo, possui alta taxa de crescimento populacional e as exportações brasileiras de produtos derivados da exploração de bovinos vêm aumentando (MUNIZ et al., 1995).

GUIMARÃES & PAPAVERO (1996) registram que apesar do estudo desse inseto haver fascinado e atraído a atenção de muitos entomologistas e não entomologistas, as informações disponíveis na literatura são freqüentemente fragmentadas e contraditórias e que alguns aspectos relativos ao díptero são constantemente repetidos enquanto que outros jamais foram investigados. Com isso, a despeito de sua importância, são escassas as pesquisas que abordam aspectos da relação parasita-hospedeiro que possam servir de base para a proposição de alternativas para o controle de *D. hominis* que, atualmente, depende exclusivamente do uso de inseticidas. Além de todos os inconvenientes relacionados ao uso de produtos químicos para o controle de ectoparasitas — tais como poluição ambiental e presença de resíduos no leite e na carne — estes produtos não evitam os danos ao couro devido à fibrose

que se instala nos locais de fixação das larvas após a sua morte ou expulsão dos tecidos subcutâneos (SANCHO, 1988).

Estes fatos assumem importância especial quando se consideram os avanços já obtidos pelas pesquisas científicas com outros ectoparasitas. Investigações que contemplaram tanto a resposta imunológica dos hospedeiros como os antígenos produzidos pelos parasitas culminaram com o desenvolvimento de imunógenos que são hoje disponíveis para o controle de ectoparasitas, como no caso de *Boophilus microplus* (JONSSON et al., 2000).

Os poucos estudos disponíveis sobre a relação parasita-hospedeiro envolvendo *D. hominis* referem-se à resposta imune humoral ou celular dos hospedeiros à presença das larvas nos tecidos, ou à inoculação de extratos larvais. Dessa forma, MOTA et al. (1980) relatam a presença de anticorpos precipitantes em coelhos imunizados com extratos larvais e concluem que as substâncias imunogênicas presentes nesses extratos são um complexo protéico com mobilidade eletroforética semelhante. Nesse mesmo ano, PERAÇOLI et al. (1980) relatam que os níveis de anticorpos precipitantes são mais elevados em coelhos imunizados com extratos larvais do que em coelhos submetidos à infestação artificial, atribuindo esse fato ao contato precário das substâncias imunogênicas, que no caso das infestações ficariam contidas pela cutícula do parasita.

Anticorpos específicos anti-*D. hominis* são produzidos por coelhos (LELLO & PERAÇOLI, 1993) e por bovinos (OLIVEIRA-SEQUEIRA et al., 1996), mas não existem evidências de que estes anticorpos desempenhem papel protetor nas infestações, à semelhança do que ocorre para outras miíases (SOULSBY, 1987).

No que se refere à resposta tissular, os estudos com diferentes espécies de hospedeiros, evidenciam que as pequenas diferenças relacionadas aos constituintes do exsudato inflamatório, estão relacionadas à espécie e à ocorrência de exposições prévias ou não dos hospedeiros (LELLO & de ROSSIS, 2003; PEREIRA & LEITE, 2002; PEREIRA et al., 2001; GROGAN et al., 1987).

Em bovinos e coelhos, a presença das larvas de *D. hominis* causa uma resposta tecidual caracterizada por um infiltrado inflamatório constituído predominantemente de eosinófilos, basófilos e mastócitos ao redor de uma área de necrose que circunda a larva (OLIVEIRA-SEQUEIRA et al., 1996; LELLO et al., 1999). Estas células se distribuem, também, ao longo de um trajeto fistuloso que se estende desde o local de alojamento da larva no tecido subcutâneo até a epiderme, o qual possibilita a conexão da larva com o meio externo.

OLIVEIRA- SEQUEIRA et al. (1996) utilizaram antígenos larvais de *D. hominis* e os métodos imunistoquímicos na investigação da resposta tissular de bovinos às larvas de *D. hominis*. A imunomarcagem obtida possibilitou a verificação de que a penetração na pele dos bovinos e a manutenção do trajeto que permite a respiração traqueal das larvas envolvem a secreção ou excreção de antígenos solúveis pelo parasita. A utilização de anticorpos monoclonais anti-imunoglobulinas de bovinos evidenciaram que a despeito da resposta imune do hospedeiro, muitas larvas se desenvolvem completando o ciclo de vida parasitária, graças a mecanismos que garantem a evasão da resposta imune que também parecem estar relacionados à excreção/secreção de substâncias durante a alimentação das larvas.

Por isso, além dos aspectos relacionados à resposta imune dos hospedeiros, o conhecimento da origem e da natureza das substâncias imunogênicas produzidas pelas larvas é de fundamental importância para a compreensão da resposta imune contra as larvas produtoras de miíases (BARON & COLWELL, 1991).

Atualmente, vários pesquisadores têm se dedicado a investigar as substâncias secretadas e/ou excretadas pelas larvas de dípteros produtores de miíases com o intuito de identificar as melhores fontes de imunógenos para fins do desenvolvimento de vacinas contra esses parasitas.

Estudos realizados com PE/S de larvas de primeiro estágio de *Hypoderma lineatum* culminaram com a caracterização de três proteases do grupo serina, denominadas Hipodermina A (HA), Hipodermina B (HB) e Hipodermina C (HC) que são produzidas durante a migração das larvas de primeiro estágio e estão envolvidas na digestão extra-intestinal (BELINSKAYA, 1973). A utilização dessas proteases purificadas na imunização de bovinos propiciou níveis de proteção superiores a 90% (BARON & COLWELL, 1991). Além de estarem envolvidas no desenvolvimento da resposta imune efetiva, verificou-se que algumas dessas proteases, principalmente HA, estão envolvidas nos mecanismos de evasão da resposta imune (LEID et al., 1987), tais como a clivagem de imunoglobulinas e degradação de proteínas do sistema de complemento (PRUETT, 1993) e inibição da proliferação de linfócitos (MOIRÉ, 1998).

Em *Lucilia cuprina*, a maioria das proteases secretadas e/ou excretadas pelas larvas são do tipo serina-proteases e incluem enzimas como tripsina, quimiotripsina (SANDEMAN et al., 1990) e enzimas com atividade

colagenolítica (BOWLES et al., 1988) que são consideradas importantes na digestão dos tecidos cutâneos de ovinos que constituem o substrato para nutrição e desenvolvimento dessas larvas. A constatação de que a inibição dessas proteases pode provocar a morte das larvas (BOWLES et al., 1990) e de que anticorpos contra essas moléculas podem afetar a sobrevivência das larvas “in vitro” (SANDEMAN et al., 1990) constituíram a base para que fosse avaliada a possibilidade de se utilizar essas proteases na imunização de animais. Com isso, TELLAM et al. (1994) purificaram duas quimiotripsinas a partir dos PE/S de larvas de primeiro estágio e verificaram que, embora essas proteases induzissem a uma significativa produção de anticorpos, essa resposta não foi capaz de prevenir a infestação dos animais imunizados. Além disso, verificaram que o soro dos animais vacinados não teve atividade sobre as larvas nos ensaios “in vitro”, concluindo que essas proteases não são candidatas viáveis a vacinação.

INNOCENTI et al. (1995) verificaram que os polipeptídeos presentes nas glândulas salivares de *Oestrus ovis* constituem a principal fonte de imunógenos para ovinos infestados. Posteriormente, TABOURET et al. (2001) demonstraram que os produtos de excreção/secreção liberados pelas larvas de *O. ovis* são produzidos no tubo digestivo e glândulas salivares e que a principal fração antigênica está presente nas glândulas salivares de larvas, sendo constituída por um complexo protéico de 28 kDa. A caracterização dos PE/S dessas larvas revelou que a maioria das enzimas são proteases do grupo serina secretadas no tubo digestivo das larvas. Além de estarem envolvidas na atividade tóxica das larvas, estas proteases foram relacionadas à evasão da resposta imune (TAUBORET et al., 2003).

Proteases do tipo tripsina também predominam nos PE/S de larvas de *Chrysomya bezziana* (MUHARSINI et al., 2000). De acordo com estes autores, além de estarem envolvidas no desenvolvimento das lesões nos tecidos dos animais, algumas podem constituir potenciais alvos para o desenvolvimento de vacinas, pois quando utilizadas como imunógenos produzem redução do crescimento larval em ovinos.

As proteases ou enzimas proteolíticas são substâncias que catalizam a quebra das ligações peptídicas das proteínas (BOND & BUTLER, 1987). Estas enzimas têm sido identificadas em diferentes sistemas biológicos, desde vírus até vertebrados. Os estudos de seqüenciamento genômico têm revelado que as proteases correspondem a aproximadamente 2% dos genes expressos e que elas apresentam pequenas variações entre os organismos. Estas proteínas apresentam massas que variam de monômeros de 10 kDa a complexos de várias centenas de kDa. De acordo com a natureza da atividade catalítica utilizada no processo de hidrólise, as proteases são classificadas nos seguintes grupos: serina-proteases, aspartato-proteases, treonina-proteases, metalo-proteases e cisteína-proteases (SAJID & McKERROW, 2002).

No que diz respeito aos parasitas, sabe-se que eles podem apresentar diferentes classes de proteases e que elas estão envolvidas nos mais diversos processos fisiológicos como invasão tissular e celular, virulência e patogenicidade, encistamento e desencistamento, eclosão e muda e também nos processos de imuno-evasão. Embora exista homologia entre as proteases dos parasitas e de seus hospedeiros, elas apresentam diferenças estruturais e propriedades bioquímicas distintas, tais como pH ótimo e especificidade de substrato. Com isso, apesar das homologias, elas constituem um alvo potencial

para o desenvolvimento de métodos de diagnóstico, quimioterápicos e vacinas (McKERROW, 1999).

Sabe-se até o presente, que larvas de *D. hominis* induzem a produção de anticorpos específicos das classes IgM e IgG e que eles poderiam exercer papel importante contra as larvas mediando a ação das células efetoras pelo mecanismo de ADCC (Citotoxicidade Celular Dependente de Anticorpos).

Entretanto, no infiltrado que circunda as larvas vivas, estas imunoglobulinas se distribuem externamente ao infiltrado leucocitário, não se ligando às larvas. A presença dessas imunoglobulinas nas estruturas larvais foi observada em duas situações: primeiro, quando ocorre a morte das larvas, as imunoglobulinas são vistas aderidas às estruturas externas e internas do parasita; entretanto não se sabe se isto é causa ou conseqüência da morte larval. Segundo, durante o processo de muda quando, temporariamente, ocorre a interrupção do processo alimentar e conseqüentemente a produção dos PE/S; nessa circunstância, as imunoglobulinas são detectadas aderidas à cutícula de L1 (OLIVEIRA-SEQUEIRA et al., 1996). Estes autores postularam que a distribuição das imunoglobulinas nessas duas situações poderia constituir a manifestação morfológica do processo de evasão da resposta imune e que estaria relacionado ao processo de alimentação das larvas e liberação de produtos de excreção/secreção.

Diante do que foi exposto, fica evidente a probabilidade de que os produtos de excreção/secreção constituam um elemento importante na relação parasita-hospedeiro em *D. hominis*. Com isso, a caracterização desses produtos constitui o primeiro passo para que se possa elucidar o papel que eles

desempenham tanto nos processos de penetração e nutrição das larvas como nos mecanismos de evasão da resposta imune. Com isso, foram propostos os seguintes objetivos no presente trabalho:

- 1- Caracterizar por SDS- PAGE o perfil eletroforético dos produtos de excreção/secreção de larvas de primeiro, segundo e terceiro estágios de *D. hominis*;
- 2- Investigar a atividade proteolítica dos produtos de excreção/secreção de larvas de *D. hominis* em géis contendo gelatina como substrato;
- 3- Caracterizar as proteases por meio do tratamento das enzimas com inibidores específicos de proteases em géis contendo gelatina como substrato;
- 4- Avaliar a cinética e a inibição específica da proteólise dos PE/S das larvas em ensaios com substratos cromóforos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Laboratórios

As atividades laboratoriais foram realizadas nos Laboratórios do Departamento de Parasitologia do Instituto de Biociências, UNESP, Campus Botucatu.

3.2. Obtenção de larvas de *D. hominis*

Larvas de segundo (L2) e de terceiro (L3) estágios de *D. hominis* foram obtidas por compressão manual de nódulos parasitários de bovinos, naturalmente infestados, em fazendas da região de Botucatu, SP.

As larvas de primeiro estágio (L1) foram obtidas em laboratório por meio do cultivo de larvas de terceiro estágio, da seguinte maneira: larvas de terceiro estágio, maduras, foram selecionadas e acondicionadas em caixas plásticas contendo terra peneirada e úmida, estéril, e mantidas em estufa tipo BOD (“Biological Oxygen Demand”) a 26 °C e umidade superior a 70%, para puparem. Após a emergência, os insetos adultos foram colocados em gaiolas teladas, junto com adultos de *Musca domestica* para obtenção de posturas. As massas de ovos aderidas aos insetos veiculadores foram recolhidas e colocados em estufa BOD, sob as mesmas condições de temperatura e umidade descritas para a pupação. Nessas condições, seis a oito dias após a postura, as larvas de primeiro estágio encontravam-se completamente desenvolvidas e aptas a eclodir. (LELLO et al., 1980)

3.3. Obtenção dos produtos de excreção/secreção das larvas de *D. hominis*

Para a obtenção dos PE/S das larvas de primeiro estágio, a eclosão das larvas foi induzida colocando-se os ovos em contato com meio estéril a 26,5°C em placas de Petri. O meio que se mostrou mais apropriado para a manutenção das larvas de primeiro estágio consistiu em uma mistura, volume a volume, de gelatina (solução a 1% em água destilada estéril) e meio essencial RPMI, contendo Vancomicina[®]. Grupos de 12 larvas foram colocadas em 3 ml desse meio e mantidas por 24 horas a 26,5°C. Após esse período as larvas foram descartadas e os PE/S recolhidos.

Para a obtenção dos PE/S das larvas de 2º e 3º estágios, as L2 e L3 foram lavadas em solução de hipoclorito a 10% (três trocas) e em seguida em água destilada estéril. Após isso, grupos de cinco larvas foram colocadas em placas de Petri contendo 15 ml de meio RPMI com Vancomicina[®] e mantidas em estufa BOD a 26,5°C. Os produtos de excreção/secreção foram recolhidos após 48 horas de incubação.

Os meios contendo os PE/S das larvas de *D. hominis* foram centrifugados a 6000g por 20 minutos a 4°C, recolhendo-se o sobrenadante. A uma parte desse material foram adicionados os seguintes inibidores de proteases: TPCK, TLCK e PMSF, na concentração de 1 mM. Alíquotas com volume de 200 µl do sobrenadante, tratado e não tratado com inibidores agora denominados produtos de excreção/secreção, foram distribuídas em microtubos devidamente identificados e estocadas em freezer a -80 °C, até o momento do uso.

3.4. Dosagem de proteínas dos produtos de excreção/secreção

A dosagem das proteínas totais presentes nos PE/S de larvas de segundo e terceiro estágios de *D. hominis* foi realizada pelo método do ácido bicinconínico (BCA-1- Protein Assay Reagent Kit – Pierce), de acordo com as instruções do fabricante, utilizando soroalbumina bovina (BSA) como padrão.

Como os PE/S das larvas de primeiro estágio foram obtidos em meio contendo gelatina, não foi realizada a dosagem de proteínas totais dessas amostras. Para essas amostras os ensaios foram realizados utilizando como parâmetro o volume da amostra.

3.5. Perfil protéico dos produtos de excreção/secreção de larvas de *D. hominis*

3.5.1. Eletroforese das proteínas dos produtos de excreção/secreção

Para a determinação do perfil protéico, os PE/S de larvas de primeiro, segundo e terceiro estágio de *D. hominis*, previamente tratados com inibidores de proteases, foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), sob condições redutoras e em sistemas descontínuo, segundo metodologia descrita por LAEMMLI (1970). Para se determinar a concentração de acrilamida que permitisse a melhor separação das proteínas foram testados géis nas seguintes concentrações de acrilamida: 7, 10, 12 e 15% e gradiente de 7-14%, optando-se pela concentração de 14%.

Para a realização das eletroforeses, foram testadas as concentrações de 5, 10, 15, 20 e 30 µg de proteínas dos PE/S das larvas de segundo e terceiro estágios de *D. hominis* e os volumes de 15, 20, 30 e 50 µl dos PE/S das larvas de primeiro estágio.

Para a aplicação no gel, as preparações de proteínas foram diluídas, volume a volume, em tampão da amostra (Tris-HCl 500 mM pH 6,8; SDS 1%; 2-mercaptoetanol 128 mM; glicerol 10%; azul de bromofenol 0,05%).

As corridas eletroforéticas foram realizadas em sistema vertical, usando aparelho Mini-VE (Amershan Bioscience), empregando-se tampão de corrida com a seguinte composição: Tris-HCl 25 mM; glicina 192 mM; SDS 0,1%; pH 8,6. As corridas eletroforéticas foram realizadas em temperatura ambiente usando-se corrente constante de 30 mA. Um padrão de peso molecular (SDS – 6H; Sigma), composto pelas proteínas: miosina (205 kDa), β-galactosidase (116 kDa), fosforilase B (97 kDa), albumina bovina (66 kDa), albumina de ovo (45 kDa) e anidrase carbônica (29 kDa), foi incluído em todas as corridas a fim de se estimar comparativamente os pesos moleculares aparentes das proteínas da amostra.

O cálculo dos pesos moleculares aparentes das proteínas presentes nas amostras foi feito pela análise em sistema de fotodocumentação Image Máster VDS (Amershan Bioscience).

Amostras de PE/S de L1, L2 e L3 não tratadas com inibidores de proteases (PMSF, TPCK e TLCK) foram submetidas à eletroforeses em géis de SDS-PAGE, nas mesmas condições descritas para as amostras tratadas.

3.5.2. Coloração dos géis para visualização das proteínas

Para a visualização dos polipeptídeos fracionados por SDS-PAGE, os géis foram corados com nitrato de prata (WRAY et al., 1981), da seguinte maneira: após a corrida eletroforética, os géis foram colocados em metanol a 50% por 1 hora, reidratados em solução de formaldeído a 0,037% em água e lavados duas vezes (10 min/lavagem) em água destilada; em seguida, foram incubados em solução de prata amoniacal, sob agitação lenta e constante e na ausência de luz, durante 20 minutos; após esse período, os géis foram lavados em água destilada por 20 minutos (quatro trocas) e colocados em solução reveladora (citrato de sódio 2,5%; formaldeído 37%) por 5 a 10 minutos; a reação foi interrompida pela adição de solução constituída de metanol: ácido acético: água, 45:10:45 (v/v/v).

3.6. Atividade proteolítica dos produtos de excreção/secreção de larvas de *D. hominis*

3.6.1. Zimograma em géis de SDS-PAGE copolimerizado com gelatina

O perfil de hidrólise das proteases dos PE/S de larvas de *D. hominis* foi analisado em géis de SDS-PAGE segundo a metodologia descrita por WILLIAMS & COOMBS (1995), com modificações. Cada uma das amostras sem tratamento prévio com inibidores de protease foi diluída (v/v) em tampão

da amostra (Tris-HCl 500 mM pH 6,8; SDS 1%;, 2-mercaptoetanol 128 mM; glicerol 10%; azul de bromofenol 0,05%) e aplicadas ao gel.

As amostras obtidas de L2 e L3 foram aplicadas na concentração de 2 µg de proteínas e as de L1 no volume de 30 µl por canaleta.

A eletroforese foi realizada aplicando-se as amostras em gel de acrilamida a 7% copolimerizado com gelatina a 0,2% (p/v) e a corrida foi realizada sob corrente de 70 V a 4 °C. Após a corrida, os géis foram incubados em triton X-100 (2,5% - v/v) a 37°C, durante 30 min., sob agitação constante. Para detectar a atividade proteolítica, os géis foram incubados em tampão Tris-HCl pH 8,15 contendo: CaCl₂ 1 mM; ditioneitol (DTT Sigma) 1 mM, durante 15 h, a 37 °C (YOUNG et al., 1995). Para a visualização das bandas de proteólise, os géis foram corados com Amido Black 0,1% em metanol: ácido acético: água (30:10:60) durante 1 hora e descorados neste mesmo solvente (BONALDO et al.,1991).

3.6.1.1. Efeito de inibidores de proteases sobre os produtos de excreção/secreção de larvas de *D. hominis*

A inibição da atividade proteolítica dos PE/S de larvas de *D. hominis* foi analisada em géis de acrilamida a 7% copolimerizado com gelatina a 0,2%, nos quais as amostras foram aplicadas após incubação prévia com diferentes inibidores de proteases.

Os inibidores de proteases e as respectivas concentrações empregadas no presente trabalho estão relacionados no quadro abaixo:

| Inibidores de proteases | Sigla | Concentração | Atividade |
|--|---------|--------------|--------------------|
| Phenilmetilsulfonil fluoride | PMSF | 20 mM | serina |
| 3,4-dicloroisocumarina | 3,4-DCI | 10mM | serina |
| Tosil lisil clorometil cetona | TLCK | 1 mM | tripsina |
| Tosil fenilalanil clorometil cetona | TPCK | 1 mM | quimiotripsina |
| N-[N-(L-3-transcarboxirano-2-carbonil)-L-leucil]-agmatina | E-64 | 0,1 mM | cisteína |
| Leu-(Cap)-Gln-Ala-al (elastatinal) | ELA | 1 mM | serina (elastase) |
| N-acetil-Leu-Leu-Arg-al (leupeptina) | LEU | 0,1 mM | serina |
| 1,10-fenantrolina | FEN | 10 mM | metalo-proteases |
| Ácido etileno-diamino-tetracético | EDTA | 10 mM | metalo-proteases |
| [(S)-1-carboxi-2-feniletil]-carboil-Arg-Val-Arg-al (antipainá) | A-P | 0,1 mM | serina |

(BEYNON & BOND, 1990)

Cada uma das amostras, contendo 2 µg de proteína (L2 e L3) ou 30 µl (L1), foi incubada por 1 hora a 37 °C com cada um dos inibidores em suas respectivas concentrações. Após a incubação com cada um dos inibidores, as amostras foram diluídas (v/v) em tampão da amostra (Tris-HCl 500 mM pH 6,8; SDS 1%; 2 - mercaptoetanol 128 mM; glicerol 10%; azul de bromofenol 0,05%,) e aplicadas ao gel. A corrida eletroforética foi realizada sob corrente de 70 V a 4 °C. Após a corrida eletroforética os géis foram submetidos aos mesmos procedimentos descritos para a detecção da atividade proteolítica.

3.6.2. Ensaio enzimático com substrato cromóforo

3.6.2.1. Ensaio com Azocaseína

Para avaliar a atividade proteolítica dos PE/S de larvas de *D. hominis* sobre a azocaseína, cada amostra, em triplicata, foi incubada com o substrato a 37 °C e a atividade proteolítica foi avaliada após 2, 4, 8, 12 e 24 horas de incubação. Dois controles, também em triplicata, foram incluídos em cada ensaio, da seguinte forma:

- Controle da enzima: em cada microtubo foram adicionados em seqüência 12 µl de cada amostra, 20,3 µl de azocaseína e 81 µl de TCA a 10%.
- Controle do reagente: em cada microtubo foram adicionados 20,3 µl de azocaseína e 15 µl de tampão Tris-HCl pH 8,15 contendo CaCl₂ 1 mM.

O seguinte protocolo (LA PEYRE et al., 1995), realizado em triplicata, foi adotado para o ensaio de clivagem de azocaseína:

- Em cada microtubo (15/amostra) foram colocados 12 µl da amostra e adicionados 20,3 µl de azocaseína a 3% em tampão Tris-HCl pH 8,15 contendo CaCl₂ 1 mM;
- Após homogeneização, os microtubos foram mantidos sob incubação a 37 °C;
- Após cada intervalo de tempo (2, 4, 8, 12 e 24 horas), em um microtubo de cada amostra foram adicionados 81 µl de TCA e transferidos para geladeira por 15 min;

- Após esse período o material foi centrifugado a 8.000g, a 4 °C, por 5 min;
- O sobrenadante foi transferido para um outro microtubo ao qual se adicionou 94,5 µl de NaOH 1M;
- 100 µl da solução de cada microtubo foram transferidos para microplacas de polipropileno e a leitura de densidade óptica foi realizada em leitor de microplacas de ELISA, usando filtro de 405 nm.

3.6.2.1.1. Efeito de inibidores de protease sobre a clivagem enzimática da azocaseína pelos produtos de excreção/secreção de larvas de *D. hominis*

Para a avaliação do efeito dos inibidores de proteases sobre a clivagem enzimática da azocaseína pelos produtos de excreção/secreção de larvas de *D. hominis* foram realizados ensaios, em triplicata, empregando-se o seguinte protocolo (LA PEYRE et al., 1995):

- Em microtubos contendo 25 µl da amostra e 25 µl de azocaseína a 3% foram adicionados os seguintes inibidores de proteases em suas respectivas concentrações: PMSF (20 mM); TLCK (1 mM); TPCK (1 mM); DCI (10 mM); E-64 (0,1 mM); leupeptina (0,1 mM); elastatinal (1 mM); fenantrolina (10 mM); EDTA (10 mM) e antipainá (0,1 mM);
- Os microtubos foram incubados a 37 °C por 16 horas (“overnigth”);

- Após a incubação, em cada microtubo foram adicionados 120 μl de TCA a 10% e transferidos para geladeira por 15 min;
- O material foi então centrifugado a 8.000g por 5 min a 4°C;
- O sobrenadante foi transferido para um outro tubo ao qual foram adicionados 140 μl de NaOH para interromper a reação;
- 100 μl da solução de cada microtubo foram transferidos para microplacas de polipropileno e a leitura densidade óptica foi realizada em leitor de microplacas de ELISA, usando filtro de 405 nm.

Microtubos contendo os PE/S de cada estágio larval (em triplicata) sem adição de inibidores foram submetidos aos mesmos procedimentos para controle das reações.

3.6.2.2. Ensaio com Na-benzoil-DL-Arg-p-nitroanilida (BAPNA)

Ensaio utilizando o substrato sintético N α -benzoil-DL-Arg-p-nitroanilida (BAPNA) (Sigma Chemical) foram realizados para investigar a cinética da atividade enzimática específica sobre tripsina dos PE/S de larvas de *D. hominis* de acordo com CAROCI et al. (2003), com algumas modificações.

Os ensaios foram realizados em placas de polipropileno em cujos poços foram adicionados 190 μl de solução do substrato (BAPNA 3 mM em tampão Tris-HCl pH 8,15; CaCl₂ 1mM,) e 10 μl de cada amostra dos produtos de excreção/secreção das larvas. A absorvância foi medida usando-se filtro de 405 nm e as leituras foram registradas a cada 10 min durante 4,5 horas. Para cada amostra foram realizadas reações em triplicata e os resultados foram

expressos em termos da média de leitura de absorvância. O controle negativo (branco) da reação foi realizado incluindo poços em que se adicionou apenas o substrato, também em triplicata.

3.6.2.2.1. Efeito de inibidores de protease sobre a clivagem enzimática de Na- benzoil-DL-Arg-p-nitroanilida (BAPNA) pelos produtos de excreção/secreção de larvas de *D. hominis*

A inibição da atividade proteolítica dos PE/S de larvas de *D. hominis* sobre o BAPNA foi avaliada apenas para L2 e L3, uma vez que não se detectou a atividade enzimática em L1 no ensaio anterior. Os ensaios foram realizados em placas de polipropileno em cujos poços foram adicionados em seqüência: 10 µl dos PE/S de cada amostra, os inibidores de proteases (nas mesmas concentrações utilizadas nos ensaios com azocaseína) e 190 µl de solução do substrato (BAPNA 3 mM em tampão Tris-HCl pH 8,15; CaCl₂ 1mM.). As reações foram feitas em triplicata assim como o controle negativo (apenas substrato) das reações e o controle positivo (amostra mais substrato).

Uma curva padrão de p-nitroanilina foi utilizada para determinar a concentração dos produtos de clivagem nesses ensaios. Os resultados foram expressos em miliunidades (mU), sendo esta unidade definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 nmol de produto por minuto.

4. RESULTADOS

4.1. Perfil protéico dos produtos de excreção/secreção de larvas de *D. hominis*

4.1.1. Eletroforese das amostras pré-tratadas com inibidores (PMSF, TPCK, TLCK)

Os perfis protéicos dos PE/S das larvas de primeiro, segundo e terceiro estágios de *D. hominis*, previamente tratados com PMSF, TPCK e TLCK estão apresentados na Figura 1. A análise desse perfil revela a presença de um padrão complexo de proteínas no que se refere às larvas de segundo e terceiro estágios. Em L1, observa-se a presença de um padrão mais simples no qual se distinguem claramente apenas duas bandas de proteínas com pesos moleculares aparentes de 72 e 62 kDa.

A análise do perfil dos PE/S das larvas de segundo estágio revela a presença de proteínas cujas bandas encontram-se distribuídas entre 134 e 14 kDa. Nesse perfil, destacam-se bandas com os seguintes pesos moleculares aparentes: 134, 72, 62, 50, 45, 36, 30, e 14 kDa. Nos PE/S de larvas de terceiro estágio visualizam-se proteínas distribuídas na região acima de 97 kDa até 11 kDa. As proteínas mais evidentes incluem a banda de peso molecular aparente maior que 97 kDa e as de aproximadamente 62, 51, 34, 30, 28 e 16 kDa.

Comparativamente, observa-se que as bandas de proteínas de pesos moleculares aparentes de aproximadamente 72 e 62 kDa, presentes em L1, se mantêm em L2, enquanto que somente esta última se preserva em L3.

Quando se comparam os perfis de L2 e L3, além da banda de 62 kDa, nota-se a coincidência da banda de 30 kDa, porém mais evidente em L3.

Não se observa diferença no padrão de migração das proteínas dos PE/S das larvas de segundo e terceiro estágios nas duas concentrações protéicas empregadas (20 e 30 $\mu\text{g/ml}$).

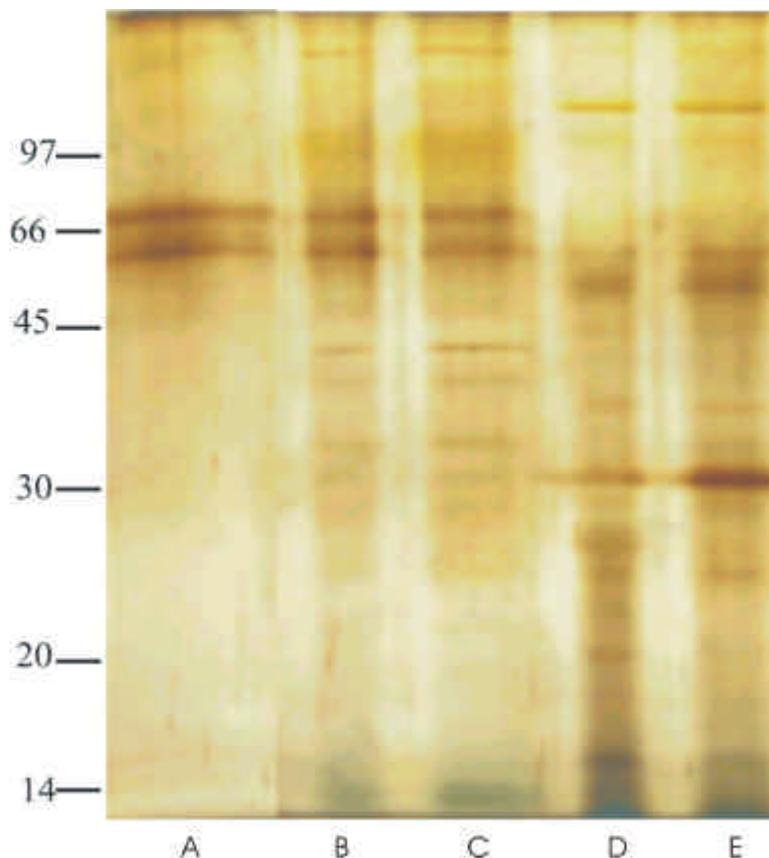


Figura 1. Perfis protéicos dos produtos de excreção/secreção de larvas de primeiro, segundo e terceiro estágios de *D. hominis*, previamente tratados com PMSF, TPCK e TLCK: A - L1 (30 μl); B - L2 (20 μg); C - L2 (30 μg); D - L3 (20 μg); E - L3 (30 μg). Padrão de peso molecular aparente (kDa) indicado à esquerda (SDS-PAGE – Prata).

4.1.2. Eletroforese das amostras não tratadas com inibidores

Os perfis eletroforéticos dos PE/S de larvas de primeiro, segundo e terceiro estágios de *D. hominis*, estão apresentados na Figura 2. Em L1, evidencia-se a presença de uma banda de peso molecular aparente superior a 97 kDa e duas bandas, de aproximadamente 19 e 16 kDa que podem ser visualizadas em meio a uma zona de arraste de proteínas que se inicia na região de aproximadamente 86 kDa e se estende até o final do gel (< 14 kDa).

As bandas de proteínas identificadas nos PE/S de larvas de segundo estágio distribuem-se na faixa de pesos de acima de 97 kDa até o final do gel (< 14 kDa). Na zona correspondente a proteínas de alto peso molecular visualizam-se cinco bandas de proteínas sendo uma de 86 kDa e quatro com mais de 97 kDa. Em um segundo grupo, também constituído por cinco bandas, são evidentes as proteínas com pesos moleculares aparentes de 44, 34, 28, 23, 16 e uma menor que 14 kDa.

Nas larvas de terceiro estágio, a faixa de distribuição das proteínas é semelhante à observada em L2. As bandas evidentes incluem as de pesos moleculares aparentes de 52, 44, 28 e 16 kDa, três bandas maiores que 97 kDa e uma banda menor que 14 kDa.

Não se observa diferença no padrão de migração das proteínas dos PE/S das larvas de segundo e terceiro estágios nas duas concentrações protéicas empregadas (20 e 30 µg/ml), bem como para os diferentes volumes empregados para L1 (15 e 30 µl).

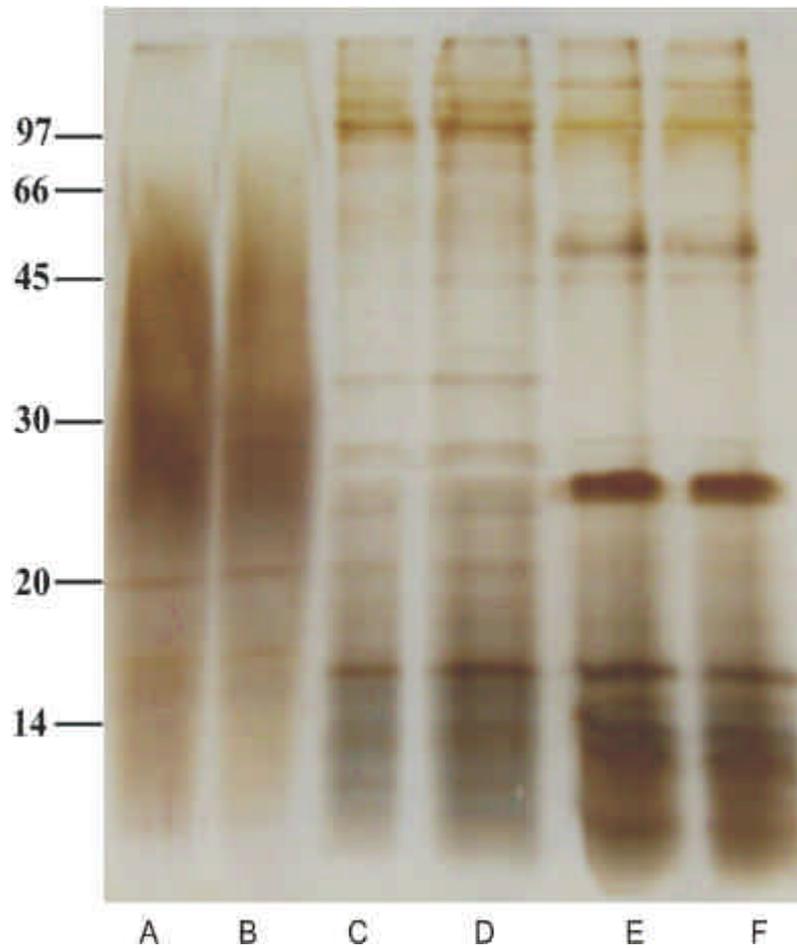


Figura 2. Perfis protéicos dos produtos de excreção/secreção de larvas de primeiro, segundo e terceiro estágios de *D. hominis*, não tratadas com inibidores: A - L1 (15 μ l); B - L1 (30 μ l); C - L2 (20 μ g); D - L2 (30 μ g); E - L3 (20 μ g); F- L3 (30 μ g). Padrão de peso molecular aparente (kDa) indicado à esquerda (SDS-PAGE – Prata).

4.2. Atividade proteolítica dos produtos de excreção/secreção de larvas de *D. hominis*.

4.2.1. Zimograma em géis de SDS-PAGE copolimerizado com gelatina

A utilização dos PE/S de larvas de *D. hominis* em diferentes concentrações não produziu nenhuma alteração no padrão de migração das enzimas, porém quando utilizados em concentrações maiores do que as referidas nos géis, produziram hidrólise ainda mais intensa do substrato.

Como pode ser observado na linha F das Figuras 3 e 4, os PE/S de L1 produziram uma zona difusa de hidrólise que se estende desde o início do gel (acima de 220 kDa) até à faixa correspondente a 135 kDa.

Em relação ao perfil de hidrólise de L2 (Figura 5 - linha K), foi observada uma zona difusa de proteólise que se estende desde o início do gel (acima de 220 kDa) até a região correspondente a 80 kDa. Nesta região pode ser identificada uma zona de hidrólise mais evidentes na região correspondente a 100-80 kDa. Além dessa, uma zona de hidrólise se destaca na região correspondente a 45 kDa.

O padrão de hidrólise produzido por L3 (Figura 6 - linha K) compreende uma zona difusa de hidrólise que se estende desde o início do gel (faixa acima de 220 kDa) até à região correspondente a 55 kDa. Destacam-se uma zona de hidrólise mais evidente na região de 107-92 kDa e outra na região de 60-55 kDa.

4.2.2. Efeito de inibidores de proteases sobre os produtos de excreção/ secreção de larvas de *D. hominis*

Nas Figuras 3 e 4 encontram-se os perfis de hidrólise de gelatina produzidos pelos PE/S de larvas de primeiro estágio (L1) de *D. hominis*, tratados com os diferentes inibidores de proteases (linhas A a E) e na linha F o perfil de hidrólise da amostra não tratada.

Comparando-se os padrões de hidrólise produzidos pelas amostras de L1 com e sem tratamento com os inibidores, notam-se as seguintes alterações no padrão de hidrólise: o inibidor que produziu maior inibição da atividade enzimática foi o EDTA, inibindo fortemente a atividade proteolítica de L1; uma banda de hidrólise de 78 kDa, não presente na amostra controle (sem tratamento com inibidor), foi visualizada na amostra tratada com fenantrolina.

Nas amostras tratadas com os inibidores PMSF, TLCK, TPCK, DCI, E-64, leupeptina, elastatinal e antipaína o padrão de hidrólise foi semelhante ao da amostra não tratada.

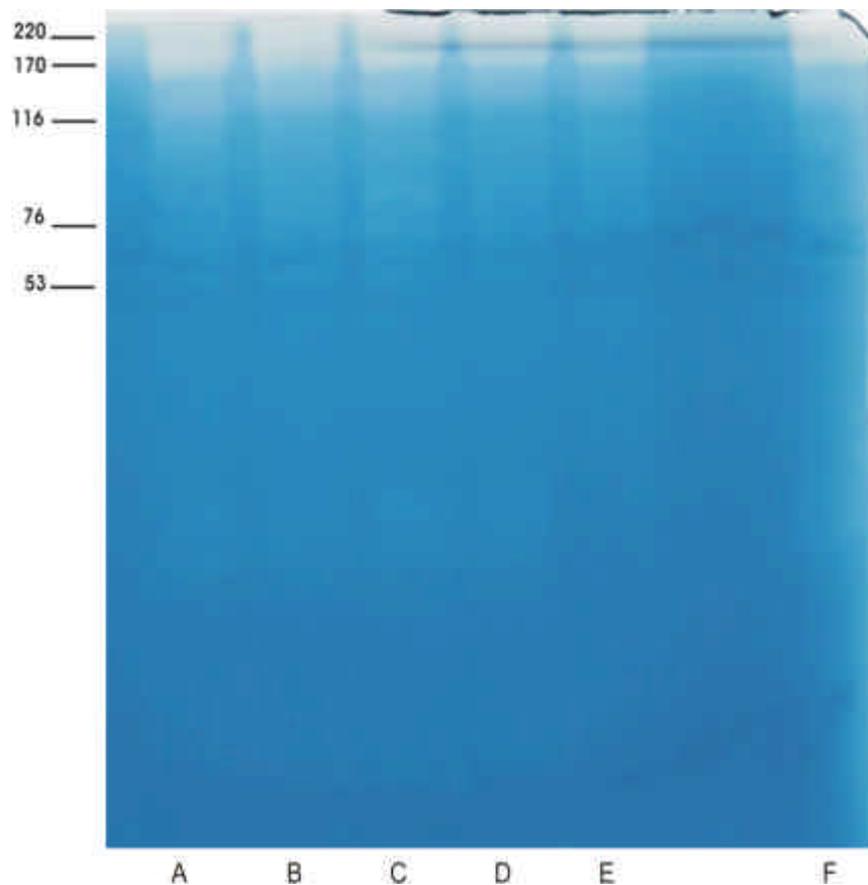


Figura 3. Gel de atividade proteolítica dos PE/S de larvas de primeiro (L1) estágio de *D. hominis*. Amostras tratadas com inibidores: (A) - PMSF; (B) – TLCK; (C) - TPCK; (D) - DCI; (E) - E64. Amostra não tratada: (F). Padrão de peso molecular aparente (kDa) indicado à esquerda. (SDS-PAGE-Gelatina – Amido Black)

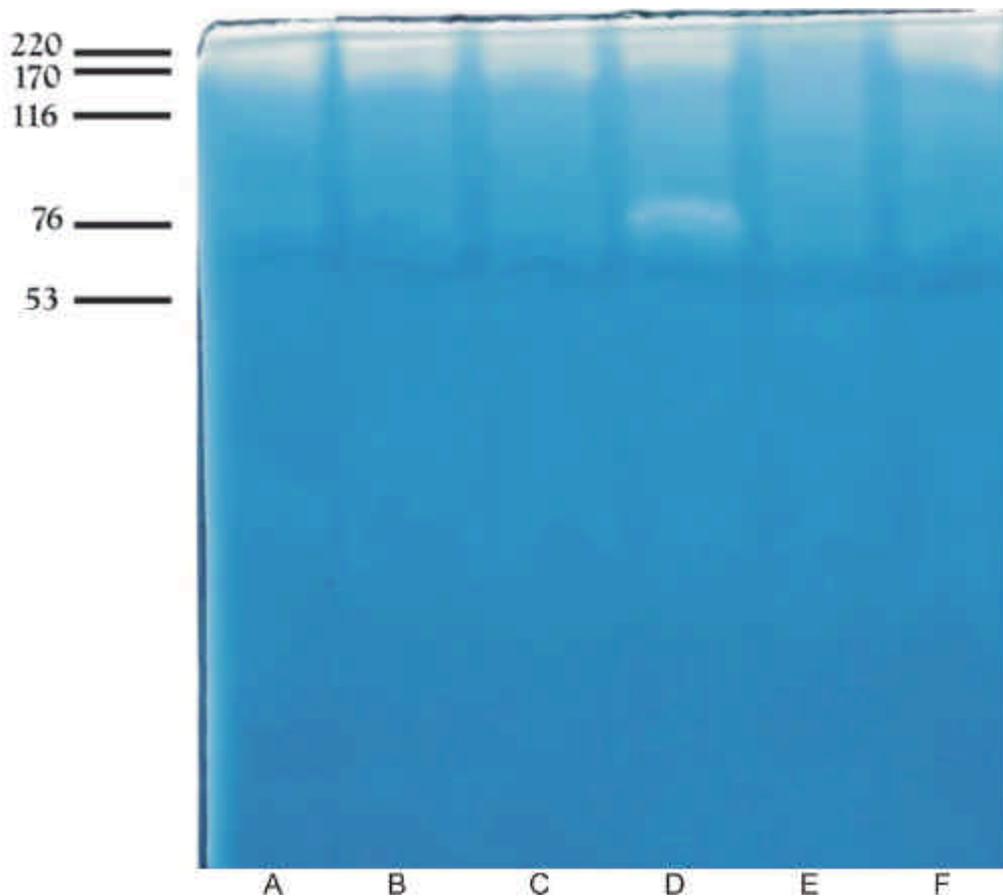


Figura 4. Gel de atividade proteolítica dos PE/S de larvas de primeiro estágio (L1) de *D. hominis*. Amostras tratadas com inibidores: (A) - leupeptina; (B) - elastatinal; (C) – antipaína; (D) – fenantrolina ; (E) - EDTA. Amostra não tratada: (F). Padrão de peso molecular aparente (kDa) indicado à esquerda. (SDS-PAGE-Gelatina – Amido Black).

Na Figura 5 encontram-se os perfis de hidrólise de gelatina produzidos pelos PE/S de larvas de segundo estágio (L2) de *D. hominis*, tratados com os diferentes inibidores de proteases (linhas A a J) e o perfil de hidrólise da amostra não tratada (linha K).

Comparando-se os padrões de hidrólise produzidos pela amostra de L2 com e sem tratamento com os inibidores, nota-se que o inibidor que produziu maior inibição da atividade enzimática foi PMSF, inibindo praticamente toda a atividade proteolítica de L2. Em seguida tem-se a maior inibição produzida por DCI, que produziu marcante atenuação da proteólise, inclusive nas zonas de hidrólise que se apresentavam mais evidentes na amostra controle.

A inibição parcial de hidrólise é observada nas amostras tratadas com TLCK, TPCK, leupeptina e elastatinal. A banda de 45 kDa foi completamente inibida apenas por PMSF e leupeptina. A zona de hidrólise de 100 a 80 kDa foi parcialmente inibida por leupeptina e elastatinal, porém evidenciaram outras duas outras zonas de hidrólise na região correspondente a 70 e 60 kDa, respectivamente.

O padrão de hidrólise observado nas amostras tratadas com E-64 antipaína, EDTA e fenantrolina foi semelhante ao da amostra não tratada.

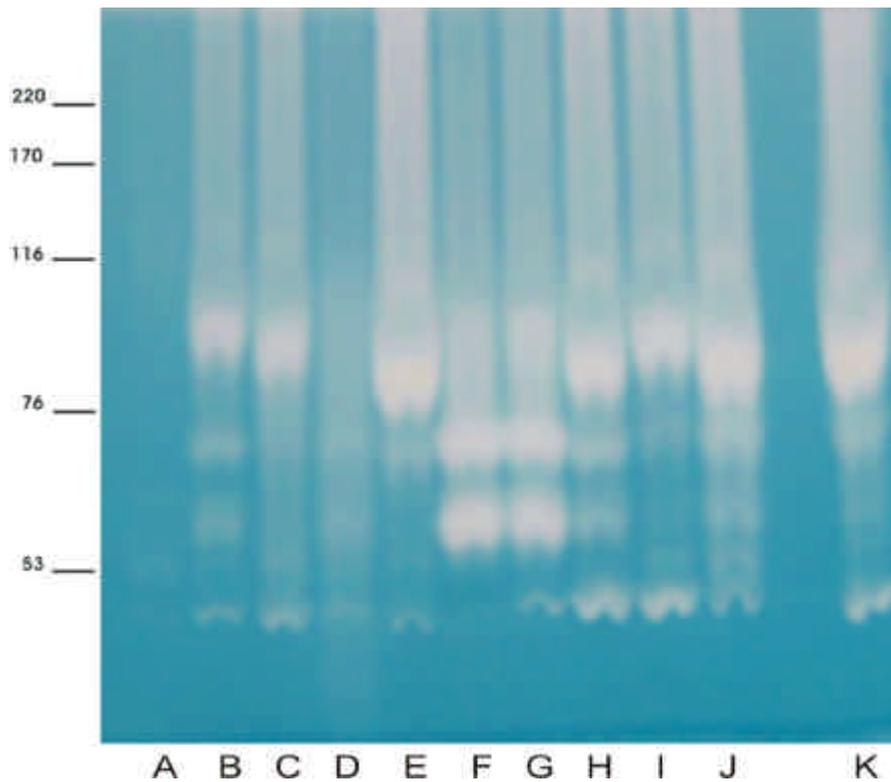


Figura 5. Gel de atividade proteolítica dos PE/S de larvas de segundo estágio (L2) de *D. hominis*. Amostras tratadas com inibidores: (A) - PMSF; (B) – TLCK; (C) - TPCK; (D) - DCI; (E) – E-64; (F) – leupeptina; (G) – elastatinal; (H) – fenantrolina; (I) – EDTA; (J) – antipain. Amostra não tratada: (K). Padrão de peso molecular aparente (kDa) indicado à esquerda. (SDS-PAGE-Gelatina – Amido Black).

Na Figura 6 encontram-se os perfis de hidrólise de gelatina produzidos pelos PE/S de larvas de terceiro estágio (L3) de *D. hominis*, tratados com os diferentes inibidores de proteases (linhas A a J) e na linha K o perfil de hidrólise da amostra não tratada.

O inibidor que produziu maior inibição da atividade dos PE/S de L3 foi PMSF, inibindo praticamente toda a atividade proteolítica de L3. Em seguida tem-se a maior inibição produzida por TLCK que inibiu praticamente todas as enzimas que produziram hidrólise na região abaixo de 107 kDa e atenuou a hidrólise na zona acima de 107 kDa. Na amostra tratada com DCI a zona de hidrólise foi apenas parcialmente atenuada, enquanto que leupeptina inibiu completamente a zona de hidrólise de 60-55 kDa.

Nas amostras tratadas com TPCK, fenantrolina e EDTA, o padrão de hidrólise foi semelhante ao da amostra não tratada. Nas amostras tratadas com os inibidores E-64, elastatinal e antipaína é evidente a alteração no padrão de hidrólise, mas aparentemente não produziram inibição da atividade proteolítica.

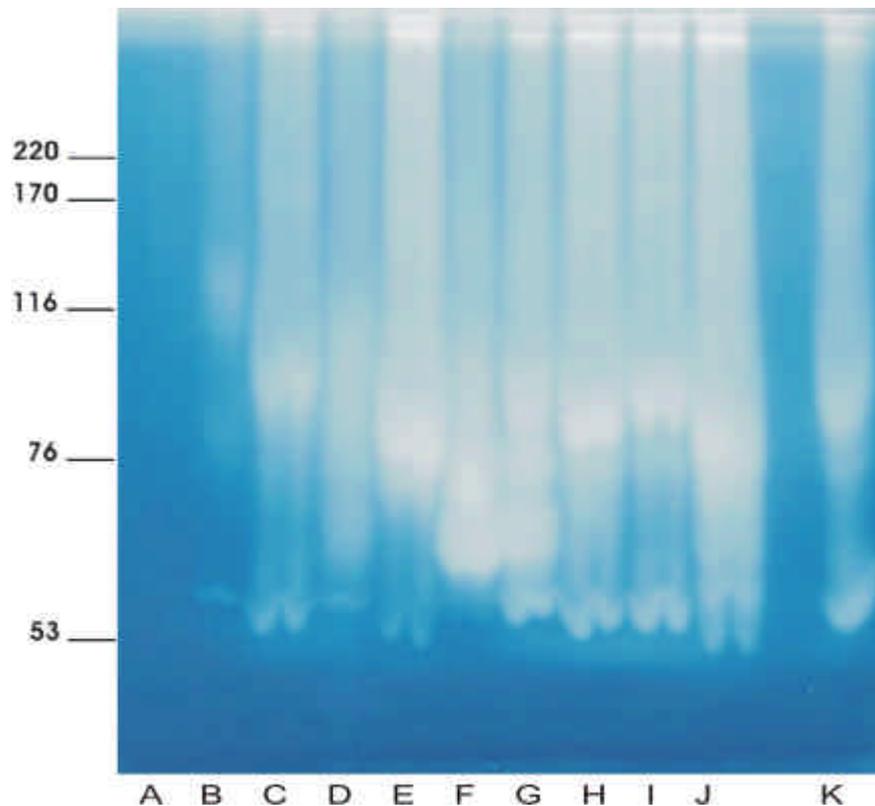


Figura 6. Gel de atividade proteolítica dos PE/S de larvas de terceiro estágio (L3) de *D. hominis*. Amostras tratadas com inibidores: (A) - PMSF; (B) – TLCK; (C) - TPCK; (D) - DCI; (E) – E-64; (F) – leupeptina; (G) – elastatinal; (H) – fenantrolina; (I) – EDTA; (J) – antipainá. Amostra não tratada: (K). Padrão de peso molecular aparente (kDa) indicado à esquerda. (SDS-PAGE-Gelatina – Amido Black).

4.2.3. Atividade proteolítica dos produtos de excreção/secreção de larvas de *D. hominis* sobre a azocaseína

A atividade proteolítica dos PE/S de L1, L2 e L3 medida em diferentes tempos de incubação com a azocaseína, está apresentada na Figura 7. Na equação da reta: $y = ax + b$, os valores de “a” (inclinação da reta) obtidos para L1 (0,0023), L2 (0,013) e L3 (0,021) revelam que a velocidade de degradação do substrato em L3 é 1,6 vezes maior que em L2 e 9 vezes maior que em L1.

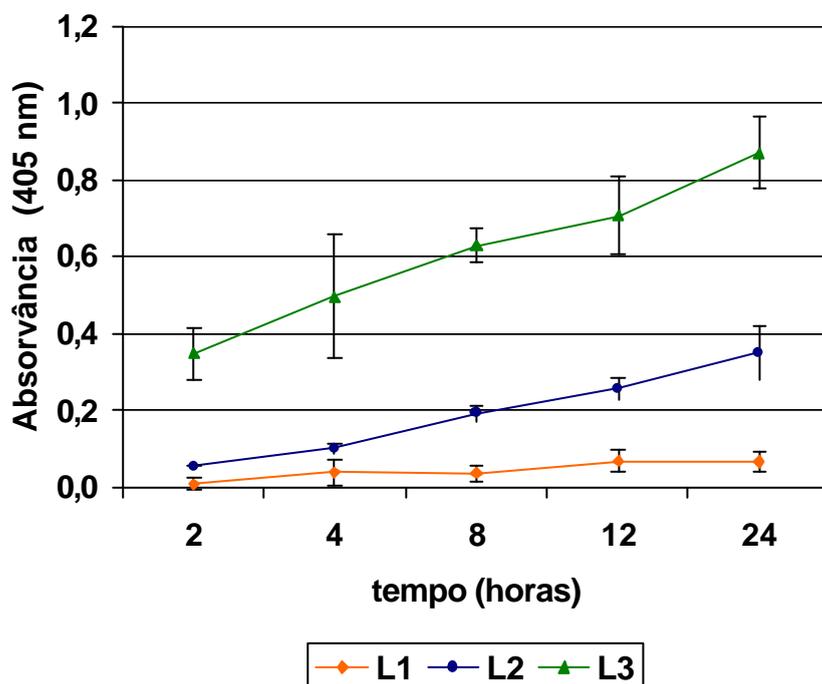


Figura 7. Cinética da Atividade proteolítica dos PE/S de larvas de primeiro, segundo e terceiro estágios de *D. hominis* sobre a azocaseína.

4.2.4. Efeito de inibidores de protease sobre a clivagem enzimática da azocaseína pelos produtos de excreção/secreção de larvas de *D. hominis*

Na Figura 8 encontram-se os resultados (valores de absorvância) obtidos pela incubação da azocaseína com os PE/S de L1, com e sem tratamento com inibidores de proteases. A maior inibição da atividade proteolítica foi observada na amostra tratada com EDTA e em seguida nas amostras tratadas com PMSF, fenantrolina e antipaína, em ordem decrescente de inibição. Aparentemente, não houve inibição da proteólise pelo tratamento com DCI, TLCK, TPCK e elastatinal, enquanto que a inibição produzida por leupeptina e E-64 foi bastante discreta.

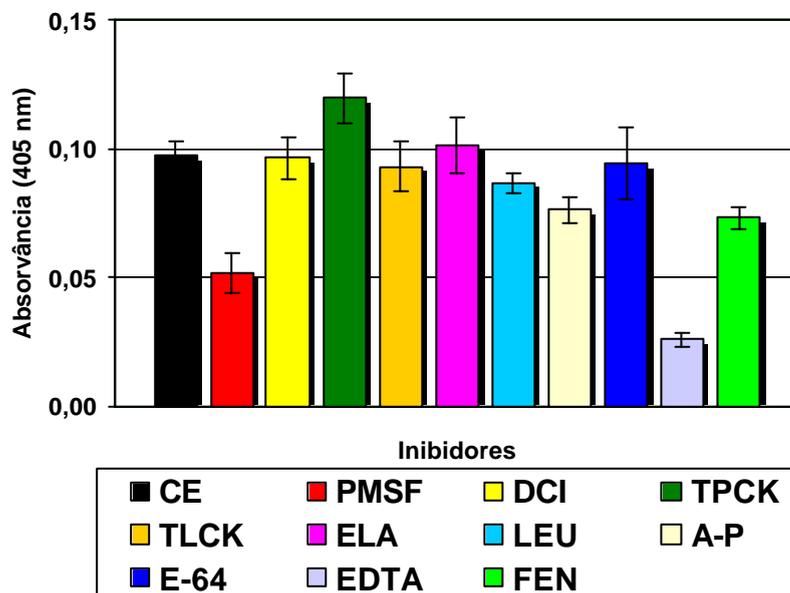


Figura 8. Hidrólise da azocaseína pelos PE/S de larvas de primeiro estágio (L1) de *D. hominis*, tratados e não tratado (CE) com inibidores de protease.

Para L2, (Figura 9), o inibidor que produziu inibição mais expressiva da hidrólise da azocaseína foi PMSF, seguido dos inibidores: TLCK, leupeptina e antipaína. Os inibidores DCI, elastatinal, E-64 e EDTA não promoveram inibição da proteólise, enquanto que TPCK e fenantrolina tiveram um efeito bastante discreto na inibição da proteólise desse substrato.

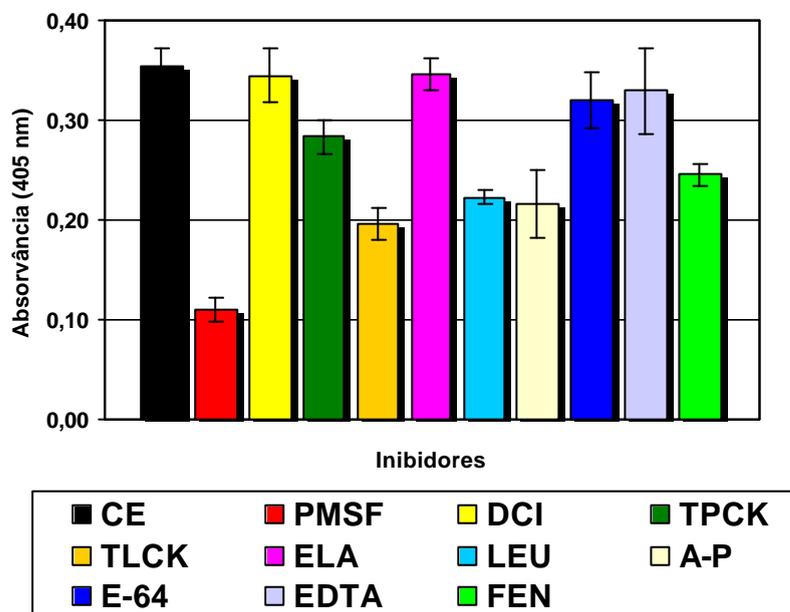


Figura 9. Hidrólise da azocaseína pelos PE/S de larvas de segundo estágio (L2) de *D. hominis*, tratados e não tratado (CE) com inibidores de protease.

Na Figura 10 encontram-se os resultados (valores de absorvância) obtidos pela incubação da azocaseína com os PE/S de L3, com e sem tratamento com inibidores de proteases. O efeito dos inibidores de protease foi semelhante ao observado com os PE/S de L2. Dessa forma, PMSF, TLCK, leupeptina e antipaína produziram redução da hidrólise desse substrato, entretanto a inibição foi mais expressiva na amostra tratada com PMSF. fenantrolina produziu discreta inibição da hidrólise da azocaseína e, aparentemente, DCI, TPCK, elastatinal, E-64 e EDTA não inibiram a proteólise.

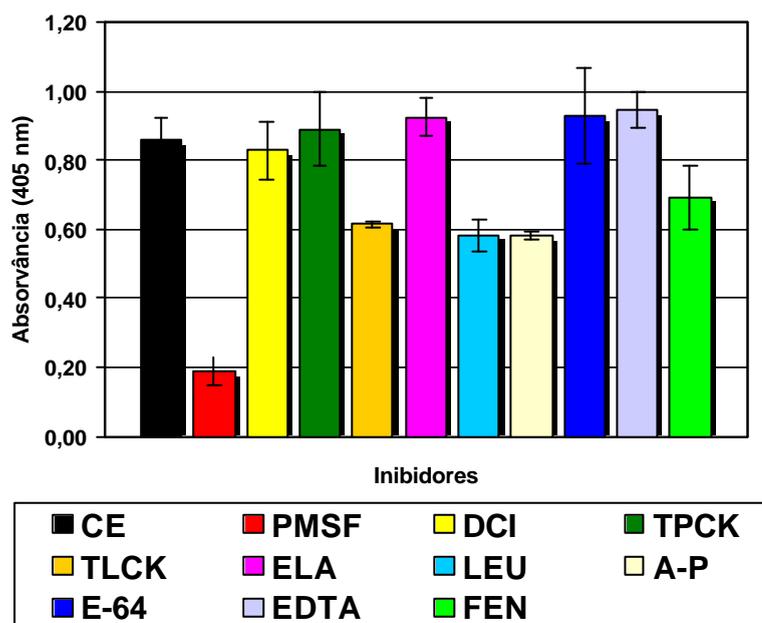


Figura 10. Hidrólise da azocaseína pelos PE/S de larvas de terceiro estágio (L3) de *D. hominis*, tratados e não tratado (CE) com inibidores de protease.

4.2.5. Atividade trípica dos produtos de excreção/secreção de larvas de *D. hominis* sobre BAPNA

Os dados obtidos pela incubação dos PE/S de larvas de primeiro, segundo e terceiro estágios de *D. hominis* com o substrato sintético BAPNA ao longo de 4,5 horas estão representados na Figura 11.

Na equação da reta: $y = ax + b$, os valores de “a”, que indicam a velocidade de degradação do substrato, obtidos para L1 (0,0062) foram inferiores aos obtidos para L2 (0,0078) e que de L3 (0,1). Comparando-se os três estágios larvais verifica-se que a atividade trípica dos PE/S de *D. hominis* é expressiva em L3.

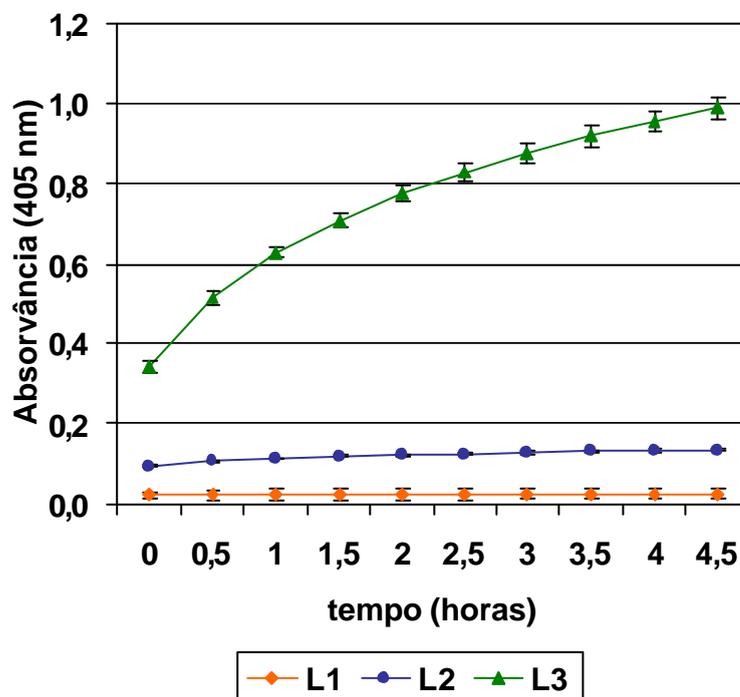


Figura 11. Cinética da Atividade hidrolítica dos PE/S de larvas de primeiro, segundo e terceiro estágios de *D. hominis* sobre a BAPNA.

4.2.6. Efeito de inibidores de protease sobre a clivagem enzimática de Na-benzoil-DL-Arg-p-nitroanilida (BAPNA) pelos produtos de excreção/secreção de larvas de segundo e terceiro estágios de *D. hominis*

Nas Figuras 12 e 13 estão apresentados os resultados da atividade sobre BAPNA dos PE/S de L2 e L3, respectivamente, para amostras tratadas e não tratadas com inibidores de proteases, em termos de unidades de enzima (nmol/min).

Para L2, a inibição completa da atividade trípica foi verificada nas amostras tratadas com PMSF e DCI. Antipaína e leupeptina produziram 84% de inibição da atividade enzimática, enquanto que para as amostras tratadas com TLCK, E-64, fenantrolina e elastatinal os percentuais de inibição foram, respectivamente, de 70, 60, 37 e 29%. TPCK e EDTA não inibiram a hidrólise desse substrato.

Para L3, somente PMSF aboliu completamente a atividade hidrolítica dos PE/S; entretanto, reduções da ordem de 99, 98, 96 e 90% da atividade hidrolítica foram obtidas, respectivamente, para os seguintes inibidores: antipaína, leupeptina, DCI e TLCK. A inibição promovida por E-64 foi da ordem de 87% e de fenantrolina, de 34%; os inibidores TPCK e elastatinal promoveram percentuais de inibição inferiores a estes. Nas amostras tratadas com EDTA não houve inibição da atividade enzimática.

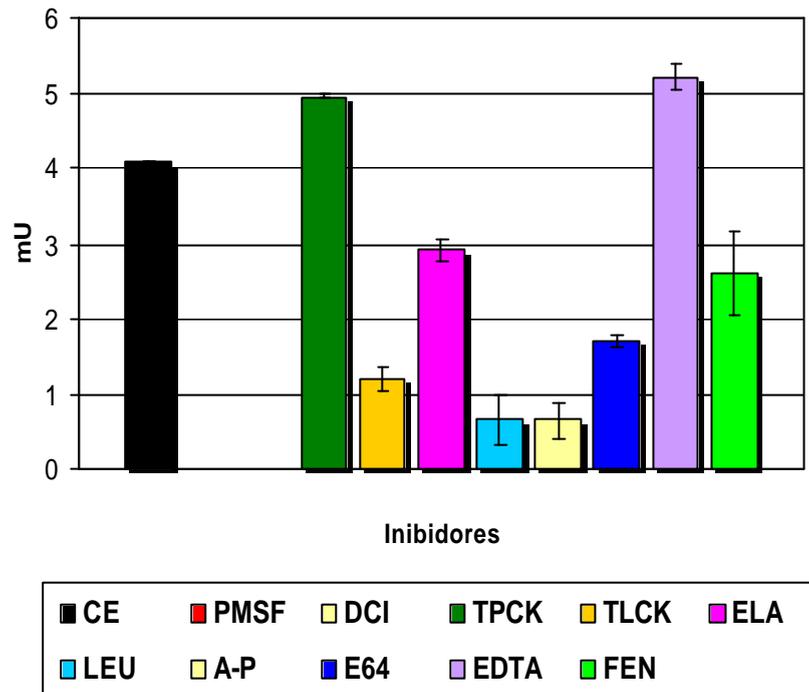


Figura 12. Atividade proteolítica dos PE/S de larvas de segundo estágio (L2) de *D. hominis*, tratados e não tratados (CE) com inibidores de proteases, sobre BAPNA.

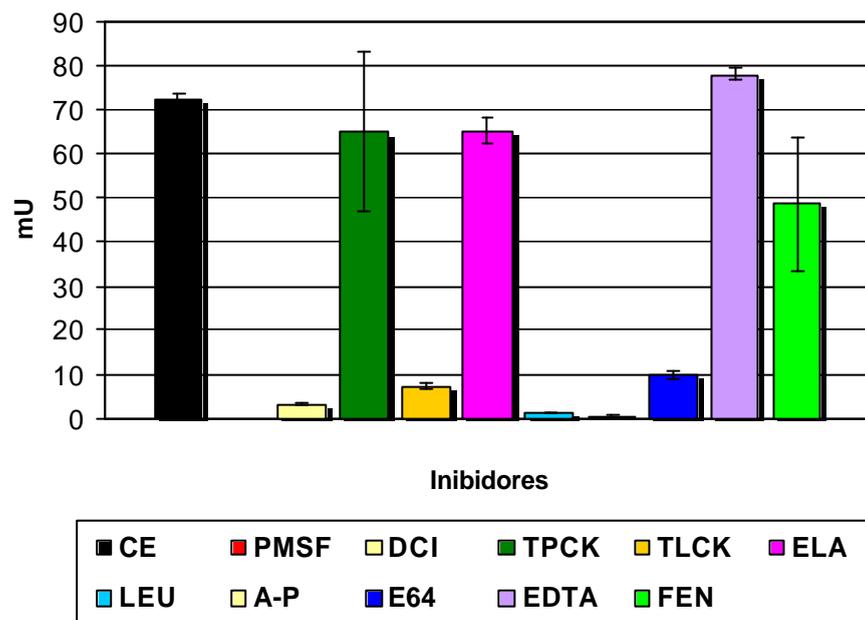


Figura 13. Atividade proteolítica dos PE/S de larvas de terceiro estágio (L3) de *D. hominis*, tratados e não tratados (CE) com inibidores de proteases, sobre BAPNA.

5. DISCUSSÃO

A presença de produtos de excreção/secreção das larvas de *Dermatobia hominis* nas lesões da dermatobiose foi inicialmente identificada pela detecção imunistoquímica de antígenos solúveis do parasita nos locais de penetração das larvas de primeiro estágio na pele de bovinos, quando se sugeriu o envolvimento desses produtos em diferentes aspectos do desenvolvimento das larvas, como no processo de penetração, na manutenção do trajeto fistuloso que assegura a respiração traqueal das larvas, e no seu provável envolvimento na evasão da resposta imune do hospedeiro (OLIVEIRA-SEQUEIRA et al., 1996). Para algumas espécies de dípteros cujas larvas produzem miíases, notadamente, *Hypoderma lineatum*, *Lucilia cuprina*, *Chrysomya bezziana* e *Oestrus ovis*, os estudos dos constituintes dos PE/S das larvas possibilitaram a caracterização de diversas proteases e o estabelecimento do papel que desempenham tanto no estabelecimento e desenvolvimento larval como nos mecanismos de escape imunológico das larvas (SANDEMAN et al., 1990; PRUETT, 1993, MUHARSINI et al., 2000, TAUBORET et al., 2001, 2003). No que se refere a *D. hominis*, o presente trabalho constitui a primeira tentativa de se caracterizar bioquimicamente os produtos de excreção/secreção das larvas desse díptero.

A análise do perfil protéico dos PE/S das larvas de *D. hominis* revelou um padrão distinto de proteínas nos três estágios larvares, sendo este mais complexo nas larvas de segundo e terceiro estágios. Entretanto, pode-se verificar que pelo menos uma banda de proteína (62 kDa) se mantém nos três estágios. Estes resultados são em parte corroborados pelo fato de antígenos

solúveis, comuns a L1 e L2, haverem sido detectados em pele de bovinos infestados com larvas de *D. hominis* (OLIVEIRA-SEQUEIRA et al., 1996).

Uma diferença que se destaca no padrão eletroforético das proteínas presentes nos PE/S das larvas é a predominância de bandas com alto peso molecular (72 e 62 kDa) em L1, enquanto que em L2 e L3 as proteínas se distribuem em uma ampla faixa de massas moleculares apresentando, inclusive, proteínas de baixos pesos moleculares aparentes. Tendo em vista o fato de que foi detectada uma atividade proteolítica muito mais expressiva nos PE/S de L2 e L3, uma primeira possibilidade seria atribuir à degradação protéica a razão para a ocorrência de bandas de baixos pesos molecular nessas amostras (MUHARSINI et al., 2000). Entretanto, é mais provável que essas proteínas tenham sido de fato secretadas e ou excretadas pelas larvas de segundo e terceiro estágios, pois proteínas de baixos pesos moleculares também estavam presentes nas eletroforeses de amostras que foram previamente tratadas com PMSF, TPCK e TLCK. A constatação de que nos PE/S de L2 e L3 há uma predominância absoluta de serina-proteases e de que PMSF, TPCK e TLCK são inibidores dessas proteases, cuja efetividade foi demonstrada nos ensaios de inibição da proteólise, reforçam a possibilidade de que, diferentemente de L1, as L2 e L3 produzam uma ampla variedade de proteínas, inclusive de pesos moleculares mais baixos.

YOUNG et al. (1996) também observaram que em *L. cuprina* há uma modificação no padrão de proteínas durante o curso do desenvolvimento das larvas em meio de cultura passando de um padrão em que predominam proteínas de alta massa molecular para um que inclui proteínas de massas inferiores à medida que ocorre o desenvolvimento larval. De acordo com estes

autores, o padrão de proteínas secretadas pelas larvas muda dramaticamente e que o aparecimento e desaparecimento de certas moléculas refletem a função que essas moléculas desempenham em diferentes estágios de desenvolvimento.

Por outro lado, na eletroforese dos PE/S de L1, não previamente tratados com inibidores, constatou-se a presença de um “arraste” de proteínas, característico da degradação das proteínas.

A hidrólise de gelatina pelos PE/S de larvas de *D. hominis*, caracterizada por uma extensa zona de hidrólise, especialmente no que se refere a L2 e L3, indicam uma atividade proteolítica mais ampla que a observada em L1. A cinética da atividade proteolítica da azocazeína na qual, tanto a velocidade de degradação quanto a quantidade de cromóforo liberado foram substancialmente inferiores em L1, reforçam essa constatação. A maior atividade proteolítica nos PE/S de larvas de terceiro estágio de *O. ovis* (TAUBORET et al., 2003) foi interpretada pelos autores como relacionada ao grande crescimento da larva de terceiro estágio que já no início do terceiro estágio adquire cerca de 45% do seu peso final. Considerando a proximidade filogenética de *O. ovis* e *D. hominis* e também o fato de que em ambas o crescimento larval é semelhante, pode-se sugerir que a maior atividade proteolítica dos PE/S das larvas de segundo e terceiro estágios de *D. hominis* esteja relacionada à maior intensidade trófica, já que alta taxa de crescimento é consequência da maior ingestão de nutrientes (CEPEDA-PALACIOS et al., 1999).

De forma semelhante ao observado no perfil protéico dos PE/S, no perfil de hidrólise de gelatina verificou-se a produção de proteases de alto peso

molecular (168 kDa - > 220 kDa) em L1. Já o perfil de hidrólise de gelatina de L2 e L3, inclui maior número de proteases, inclusive de massas moleculares inferiores. Há que se ressaltar que as larvas de primeiro estágio utilizadas para a obtenção dos PE/S eram larvas recém-eclodidas que ainda não haviam se alimentado. Considerando que as proteases são produzidas em função dos requerimentos fisiológicos do parasita, pode-se suspeitar que estas larvas, cuja função imediata é a penetração na pele do hospedeiro, apresentem um repertório de enzimas mais restrito. Provavelmente, quando estas larvas iniciam a alimentação esse repertório de proteases sofra profundas alterações. As observações de YOUNG et al (1996) com relação a *L. cuprina* corroboram esta suposição.

As diferenças de L1 em relação aos demais estágios foram também verificadas no que se refere ao tratamento das amostras com inibidores de proteases com o objetivo de se identificar as classes de proteases produzidas pelos três estágios larvares. Nos ensaios em que se utilizou gelatina como substrato, a atividade proteolítica dos PE/S de L1 foi fortemente inibida pelo EDTA, indicando a presença de metalo-proteases. Esta observação é corroborada pelos resultados obtidos com azocazeína em que a redução da atividade proteolítica foi obtida não só com EDTA, mas também com fenantrolina, outro inibidor de metalo-proteases. Além dessas, a presença de serina-proteases em L1 pode ser verificada pela redução da proteólise da azocazeína pelo PMSF.

De acordo com McKERROW (1989) as proteases secretadas por parasitas que invadem os tecidos pertencem a duas classes: metalo-proteases ou serina-proteases. Para os helmintos cuja infecção se dá por via cutânea, as

metalo-proteases foram identificadas como as responsáveis pela penetração de *Ancylostoma* spp. (HOTEZ et al., 1990; HAWDON et al., 1995) e de *Strongyloides stercoralis* (BRINDLEY et al., 1995), enquanto que as serina-proteases o foram para *Schistosoma mansoni* (McKERROW, 1989). No que se refere aos dípteros produtores de miíases, a maioria dos autores se refere à presença de serina-proteases nas larvas de primeiro estágio, embora CHAMBERS et al. (2003) se refiram à presença de metalo-proteases em larvas de *Lucilia sericata*. É provável que tais discrepâncias em relação aos dípteros produtores de miíases estejam relacionadas às diferenças na biologia das larvas. Isto porquê, larvas de *C. bezziana* e *O. ovis* não penetram nos tecidos, alimentando-se superficialmente. De acordo com CASU et al. (1996) apesar das larvas de *L. cuprina* apresentarem um amplo repertório de serina-proteases nos PE/S, as larvas não têm a capacidade de promover solução de continuidade na pele de ovinos. Por outro lado, para as larvas de *H. lineatum*, que à semelhança de *D. hominis* penetram ativamente na pele íntegra dos animais, a caracterização das proteases foi realizada a partir dos produtos de excreção/secreção de larvas colhidas do esôfago (BARON & COWELL, 1991, PRUETT, 1993). Com isso, apesar de continuarem a migração pelos tecidos, as larvas quando estão no esôfago já iniciaram a ingestão e a digestão extracorpórea de nutrientes. Em função dessas diferenças, o confronto desses achados em relação às larvas de primeiro estágio de *D. hominis* com os disponíveis para essas outras espécies de dípteros fica comprometido.

Embora não se possa precisar qual classe de protease é responsável pela penetração de L1 de *D. hominis* na pele dos hospedeiros, os resultados do presente trabalho reforçam as suposições de OLIVEIRA-SEQUEIRA et al.

(1996) de que as lesões produzidas no ponto de penetração das larvas na pele devem envolver tanto a ação mecânica dos ganchos orais da larva como a liberação de substâncias proteolíticas.

Além de darem início ao processo de infestação do hospedeiro pela desrupção dos tecidos cutâneos, o outro desafio imposto às larvas infestantes de *D. hominis* é se defender da resposta imune do hospedeiro. A observação de que já nas primeiras 24 horas de infestação dos bovinos as L1 apresentavam-se envolvidas por tecido necrótico e pela reação tissular e que as imunoglobulinas (IgG e IgM) se distribuem externamente a esse infiltrado inflamatório foi interpretada como a manifestação morfológica do mecanismo de evasão da resposta imune do hospedeiro na qual os anticorpos eram impedidos de se ligar à larva em desenvolvimento, provavelmente, pela ação dos PE/S das larvas (OLIVEIRA-SEQUEIRA et al., 1996). Em *H. lineatum*, a degradação de proteínas (C3) do sistema complemento (BOULARD, 1989; BARON, 2003) e de IgG (PRUETT, 1993) foi atribuída a uma enzima digestiva produzida pelas larvas de primeiro estágio e caracterizada como uma protease (HyA) da classe das serina-proteases. Em *O. ovis* (TAUBORET et al., 2003) e em *L. cuprina* (ELVIN et al., 1994), a clivagem de IgG foi atribuída a uma protease digestiva identificada como serina-protease.

A clivagem de imunoglobulinas constitui uma das formas pelas quais os parasitas subvertem a resposta imune do hospedeiro. No caso de *D. hominis* (OLIVEIRA-SEQUEIRA et al., 1996) e de *O. ovis* (TAUBORET et al., 2003) a modulação da resposta imune foi atribuída à impossibilidade dos eosinófilos exercerem seus efeitos sobre as larvas pelo mecanismo da Citotoxicidade Celular Dependente de Anticorpos (ADCC).

De acordo com os resultados obtidos em relação aos PE/S das larvas de primeiro estágio, a presença de proteases do grupo das metalo-proteases e das serina-proteases, à semelhança do que ocorre em outros parasitas não fagocitáveis, poderiam estar envolvidas na penetração e no escape imunológico, garantindo o desenvolvimento e sobrevivência do parasita, no início da fase parasitária.

Os PE/S de larvas de segundo e terceiro estágios produziram um amplo espectro de hidrólise de gelatina que aparece sob forma de zonas não resolvidas cuja inibição pelo PMSF revela a predominância de proteases da classe das serina-proteases. A redução de cerca de 50% da atividade enzimática na proteólise da azocaseína promovida por este inibidor reforçam este resultado. A produção de grande diversidade de serina-proteases parece ser bastante freqüente nas larvas de dípteros que produzem miíases, como *O. ovis* (TAUBORET et al., 2003), *C. bezziana* (MUHARSINI et al., 2001) e *L. cuprina* (ELVIN et al., 1994). De acordo com estes últimos autores, larvas de primeiro estágio de *L. cuprina* expressam de 125 a 220 genes para serina-proteases.

A inibição da proteólise da gelatina e da azocaseína pelo TPCK, que inibe a atividade de serina-proteases do tipo quimiotripsina revela que a atividade dessas proteases nos PE/S de L2 e de L3, apesar de presente, é consideravelmente menos significativa que o de proteases do tipo tripsina, revelada pela utilização dos inibidores TLCK, leupeptina e antipaína.

Em função desses resultados, foram realizados ensaios utilizando substrato sintético específico para a detecção de atividade trípica (BAPNA). A cinética da atividade dos PE/S medida ao longo de 4,5 horas de incubação com

este substrato revelou que a atividade tríptica está de fato presente em L2 e L3, sendo, entretanto, mais pronunciada nas larvas de terceiro estágio. Estes resultados refletem a maior atividade trófica das larvas de terceiro estágio o que é compatível com o expressivo desenvolvimento que ocorre nesse estágio larval. A atividade tríptica dos PE/S de L2 e L3 sobre BAPNA, fortemente inibida pelos inibidores TLCK, leupeptina e antipaína, confirma a predominância de proteases do tipo tripsina, nesses produtos. A inibição produzida pelo E-64, cuja atividade específica é frequentemente referida como sendo sobre proteases do tipo cisteína, diferentemente de sugerir a presença de proteases do tipo tripsina. Embora na maioria dos relatos sobre este inibidor não se encontre a referência de atividade sobre outras classes de proteases, SREEDHARAN et al., (1996) demonstram que esse inibidor é um dos mais efetivos inibidores da hidrólise de tripsina.

Os estudos relacionados às proteases presentes nas larvas de dípteros produtores de miíases têm sido realizados em espécies que comprometem a produtividade animal em países desenvolvidos e já culminaram em perspectivas promissoras especialmente para o controle das infestações. Para as espécies que atualmente ocorrem exclusivamente na América Latina, como é o caso de *Cochliomya hominivorax* e *D. hominis*, estes estudos não foram sequer iniciados. Entretanto, os resultados apresentados no presente trabalho evidenciam que em larvas de *D. hominis* as proteases presentes nos PE/S devem estar envolvidas nos processos de penetração, nutrição e na subversão da resposta imune do hospedeiro, assim como já demonstrado para outras larvas de dípteros. Estas semelhanças descortinam a possibilidade de que o aprofundamento dessas investigações, com a

purificação e caracterização dessas enzimas, possa culminar no melhor entendimento da biologia desse parasita bem como no encontro de alternativas para seu controle.

6. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados da presente investigação, pode-se concluir:

- Nos produtos de excreção/secreção de larvas de primeiro estágio de *D. hominis* predominam proteínas de alto peso molecular aparente, enquanto que nos PE/S de L2 e L3 as proteínas se distribuem em uma ampla faixa de pesos moleculares.
- As proteases presentes nos PE/S em larvas de *D. hominis*, apresentam perfil eletroforético mais complexo nas de larvas de segundo e terceiro estágios.
- Nos PE/S de L1 predominam proteases da classe metalo-proteases enquanto que as serina-proteases predominam em larvas de segundo e terceiro estágios.
- A atividade de proteases do tipo tripsina é significativamente mais expressiva nas larvas de terceiro estágio.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARON, R.W., COLWELL, D.D. Enhanced resistance to cattle grub infestation (*Hypoderma lineatum*, de Vill.) in calves immunized with purified hypodermin A, B and C plus monophosphoril lipid A (MPL). **Vet. Parasitol.**, v.38, p.185-97, 1991.
- BARON, R.W. Cleavage of purified bovine complement component C3 in larval *Hypoderma lineatum* (Díptera:Oestridae) hypodermins. **J. Med. Entomol.**, v.27, p.899-904, 2003
- BELINSKAYA, V.Z. Permeability of integuments of the first stage larvae of *Hypoderma bovis* (De Geer) for amino acid tagged with radioactive isotopes. **Parazitologiya**, v.7, p.116-22, 1973.
- BEYON, R.J., BOND, J.S. Proteolytic Enzymes.A Practical Approach. **PAS The Practical Approach Series.**, 1990.
- BONALDO, M.C., d'ESCOFFIER, L.N., SALLES, J.M., GOLDENBERG, S. Characterization and expression of proteases during *Trypanosoma cruzi* matacyclogenesis. **Exp. Parasitol.**, v.73, p.44-51, 1991.
- BOND, J.S., BUTLER, P.E. Intracellular Protease. **Ann. Rev. Biochem.**, v.56, p.333-64, 1987.
- BOULARD, C. Degradation of bovine C3 by serine proteases from parasites *Hypoderma lineatum* (Diptera, Oestridae). **Vet Immunol Immunopathol.**, v 20, p 387-98, 1989.
- BOWLES, V.M., CARNEGIE, P.R., SANDEMAN, R.M., Characterization of proteolytic and collagenolytic enzymes from the larvae of *Lucilia cuprina*, the sheep blowfly. **Aust. J. Biol. Sci.**, v 41, p 269-78. 1988.

- BOWLES, V.M., FEEHAN, J.P., SANDEMAN, R.M. Sheep plasma protease inhibitors influencing protease activity and growth of *Lucilia cuprina* larvae *in vitro*. **Int. J. Parasitol.**, v.20, p.169-74, 1990.
- BRINDLEY, P.J., GAM, A.A., MCKERROW, J.H., NEVA, F.A. Ss40: the zinc endopeptidase secreted by infective larvae of *Strongyloides stercoralis*. **Exp. Parasitol.**, v.80, p.1-7, 1995.
- CAROCCI, A.S., CALVO, E.G., RIBOLLA, P.E.M., BIANCHI, A.G., MARINOTTI, O. Two trypsins occur in three species of neotropical anophelines. **J. Med. Entomol.**, v.40, p.991-95, 2003
- CASU, R.E., EISEMANN, C.H., VUOCOLO, T., TELLAM, R.L. The major excretory/secretory protease from *Lucilia cuprina* larvae is also a gut digestive protease. **Int. J. Parasitol.**, v.26, p.623-28, 1996.
- CATTS, E.P. Biology of New World bot flies. Cuterebridae. **Ann. Rev. Entomol.**, v.27, p.313-38, 1982.
- CEPEDA-PALACIOS, R., ÁVILA, A., RAMÍREZ-ORDUÑA, R., DORCHIES, Ph. Estimation of the growth patterns of *Oestrus ovis* L. larvae hosted by goats in Baja California Sur, México. **Vet. Parasitol.**, v.86, p.273-319, 1999.
- CHAMBERS, L., WOODROW, S., BROWN, A.P., HARRIS, P.D., PHILLIPS, D., HALL, M., CHURCH, J.C.T., PRITCHARD, D.I. Degradation of extracellular matrix components by defined proteinases from the greenbottle larva *Lucilia sericata* used for the clinical debridement of non-healing wounds. **Br. J. Dermatol.**, v.148, p.14-23, 2003.
- ELVIN, C.M., VUOCOLO, T., SMITH, W.J., EISEMANN, C.H., RIDDLES, P.W. An estimate of the number of serine protease genes expressed in

- sheep blowfly larvae (*Lucilia cuprina*). **Insect. Mo.I Biol.**, v.3, p.105-15, 1994.
- FREITAS, M.G., COSTA, H.M.A., COSTA, J.O, IIDE, P. **Entomologia e acarologia médica e veterinária**. Belo Horizonte: Rabelo e Brasil, p.253, 1978.
- GROGAN, T.M., PAYNE, C.M., PAYNE, T.B., SPIER, C., CROMEY, D.W., RANGEL, C., RICHTER, L. Cutaneous myiasis.Immunohistologic and ultrastructural morphometric features of a human botfly lesion. **Am. J. Dermatopathol.**, v.9, p.232-9, 1987.
- GUIMARÃES, J.H., PAPAVERO, N. **Myiasis in man and animals in the Neotropical Region**. São Paulo: Plêiade/Fapesp, 1999. 308p.(Bibliography database)
- GUIMARÃES, J.H., PAPAVERO, N. A tentative annotated bibliography of *Dermatobia hominis* (Linnaeus Jr.,1781) (Diptera: Cuterebridae). **Arq. Zool.**,v.4, p.223-94, 1996.
- HALL, M., WALL, R. Myiasis of humans and domestic animals. **Adv. Parasitol.**, v.35, p.257-334, 1995.
- HAWDON, J.M., JONES, B.F., PERREGAUX, M.A., HOTEZ, P.J. *Ancylostoma caninum*: metalloprotease release coincides with activation of infective larvae in vitro. **Exp. Parasitol.**, v.80, p.205-11, 1995.
- HENDRIX, C.M. **Diagnostic veterinary parasitology**. 2.ed. Philadelphia: Mosby, 1998. p.168-227.
- HORN, S.C., ARTECHE, C.C.P. Situação parasitária da pecuária no Brasil. **Hora Vet.**, v.23, p.12-32, 1985.

- HOTEZ, P., HAGGERTY, J., HAWDON, J., MILSTONE, L., GAMBLE, H.R., SCHAD, G., RICHARDS, F. Metalloproteases of infective *Ancylostoma* hookworm larvae and their possible functions in tissue invasion and ecdysis. **Infect. Immun.**, v.58, p.3883-92, 1990.
- INNOCENTI, L., MASETTI, M., MACCHIONI, F., GIORGI, F. Larval salivary gland proteins of the sheep nasal bot fly, (*Oestrus ovis* L.), are major immunogens in infested sheep. **Vet. Parasitol.**, v.60, p.273-82, 1995.
- JONSSON, N.N., MATSCHOSS, A.L., PEPPER, P., GREEN, P.E., ALBRECHT, M.S., HUNGERFORD, J., ANSELL, J. Evaluation of tickGARD (PLUS), a novel vaccine against *Boophilus microplus*, in lactating Holstein-Friesian cows. **Vet. Parasitol.**, v.88, p.275-85, 2000.
- LA PEYRE, J.F., SCHAFHAUSER, D.Y., RIZKALLA, E.H., FAISAL, M. Production of serine proteases by the oyster pathogen *Perkinsus marinus* (Apicomplexa) in vitro. **J. Euk. Microbiol.**, v.42, p.544-51, 1995.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural protein during the assembly of the bacteriophage T4. **Nature**, p. 277-80, 1970.
- LEID, R.W., SUQUET, C.M., TANIGOSHI, L. Parasite defense mechanism for evasion of host attack: a review. **Vet. Parasitol.**, v.25, p.147- 62, 1987.
- LELLO, E., DE ROSIS, A.M. Inflammatory reaction to the human bot-fly, *Dermatobia hominis*, in infested and reinfested mice. **Med. Vet. Entomol.**, v. 17, p.55-60, 2003.
- LELLO, E., OLIVEIRA-SEQUEIRA, T.C.G., PERAÇOLI, M.T.S. Inflammatory response in *Dermatobia hominis* infested rabbits. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v.8, p.87-91, 1999.

- LELLO, E., PERAÇOLI, M. T. S. Cell-mediated and humoral immune responses in immunized and/or *Dermatobia hominis*-infested rabbits. **Vet. Parasitol.**,v.47, p.129-38, 1993.
- LELLO, E., MOTA, N.G.S., PERAÇOLI, M. T. S. Reação inflamatória causada pelo berne, em coelhos imunizados ou não com extrato antigênico de *Dermatobia hominis* (Diptera: cuterebridae). **Cienc. Cult.**, V32, p 458-62, 1980.
- MATHEUS, V.G. Dermatobiosis. In: SEMINÁRIO NACIONAL SOBRE PARASITOSSES DOS BOVINOS, 1, 1979, Campo Grande. **Anais...Campo Grande: EMBRAPA**, 1979, p.315-29.
- MCKERROW, J.H. Molecular and biochemical studies of the cercarial proteinase of *Schistosoma mansoni*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.84 Supl. 1, p.209-10, 1989.
- MCKERROW, J.H. Development of cysteine protease inhibitors as chemotherapy for parasitic diseases: insights on safety, target validation, and mechanism of action. **Int. J. Parasitol.**,v.29, p.833-7, 1999.
- MORAES, F.R., COSTA, A. J., VASCONCELOS, O.T., ROCHA,U.F. Ensaio comparativo de susceptibilidade natural de zebrinos e taurinos a larva de *Dermatobia hominis* (Lineu Jr.,1781). **Ars. Vet.**,v.2, p.247-53, 1986.
- MOIRÉ, N. Hypodermin A and inhibition of lymphocyte proliferation. **Parasitol. Today**, v.14, p.755-7, 1998.
- MOTA, N.G.S., KIY, Y., REZKALLAH-IWASSO, M., PERAÇOLI, M.T.S. Humoral and cell-mediated immunity in large non-toxic multinodular goitre. **Clin. Endocrinol.**, v.13, p.173-80, 1980.

- MUHARSINI, S., DALRYMPLE, B., VUOCOLO, T., HAMILTON, S., WILLADSEN, P., WIJFFELS, G. Biochemical and molecular characterization of serine proteases from larvae of *Chrysomya bezziana*, the old world screwworm fly. **Insect. Biochem. Mol. Biol.**, v.11, p.1029-40, 2001.
- MUHARSINI, S., SUKARSIH, RIDING, G., PARTOUTOMO, S., HAMILTON, S., WILLADSEN, P., WIJFFELS, G. Identification and characterisation of the excreted/secreted serine protease of larvae of the Old World Screwworm Fly, *Chrysomya bezziana*. **Int. J. Parasitol.**, v.30, p.705-14, 2000.
- MUNIZ, R.A., CERQUEIRA-LEITE, R., CORONADO, A., SORACI, O., UMEHARA, O., MORENO, J., ERRECALDE, J. Efficacy of injectable doramectin in the therapy and control of *Dermatobia hominis* infestations in Latin América. **Vet. Parasitol.**, v.60, p.265-71, 1995.
- OLIVEIRA, W.F., ROCHA, U. F. Medidas aconselháveis para melhorar a qualidade dos couros salgados no Estado de São Paulo. **Couros e Calçados**, v.9, p.2-6, 1985.
- OLIVEIRA-SEQUEIRA, T.C.G., SEQUEIRA, J.L., SCHMITT, F.L., LELLO, E. Histological and immunological reaction of cattle skin to first-instar larvae of *Dermatobia hominis*. **Med. Vet. Entomol.**, v.10, p.323-30, 1996.
- PERAÇOLI, M.T.S., LELLO, E., MOTA, N.G.S. Comportamento da resposta imune humoral em coelhos imunizados com antígenos de *Dermatobia hominis*, Linnaeus, frente às larvas desse parasito (Diptera: Cuterebridae). **Ciênc. Cult.**, v.32, p.1537-41, 1980.
- PEREIRA, M.C., LEITE, A.C. Eosinophil and mast cell expression in host skin during larval development of the human bot fly *Dermatobia hominis*. **Parasite.**, v.9, p.333-9, 2002.

- PEREIRA, M.C., LEITE, V.H., LEITE, A.C. Experimental skin lesions from larvae of the bot fly *Dermatobia hominis*. **Med. Vet. Entomol.**,v.15, p.22-7, 2001.
- PRUETT, J.H. Proteolytic cleavage of bovine IgG by hypoermin A, a serine protease of *Hypodrema lineatum* (Diptera: Oestridae). **J. Parasitol.**,v.79, p.829-33, 1993.
- SAJID, M., MCKERROW, J.H. Cysteine proteases of parasitic organisms. **Mol. Biochem. Parasitol.**,v.120, p.1-21, 2002.
- SANCHO, E. *Dermatobia hominis*, the neotropical warble fly. **Parasitol.Today**, v.4, p.242-46, 1988.
- SANDEMAN, R.M., FEEHAN, J.P., CHANDLER, R.A., BOWLES, V.M. Tryptic and chymotryptic proteases released by larvae of the blowfly, *Lucilia cuprina*. **Int. J. Parasitol.**,v.20, p.1019-23, 1990.
- SOULSBY, E.J.L. The evasion of the immune response and immunological unresponsiveness: parasitic helminth infections. **Immunol. Lett.**, v.16, p.315-20, 1987.
- TABOURET,G., BRET-BENNIS., DORCHIES, Ph., JACQUIET, PH. Serine protease activity in excretory-secretory products of *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae) larvae. **Vet. Parasitol.**,v.114, p.305-14, 2003.
- TABOURET,G., PREVOT, F., BERGEAUD, J.P., DORCHIES, Ph., JACQUIET, P. *Oestrus ovis* (Diptera:Oestridae): sheep humoral immune response to purified excreted/secreted salivary gland 28 kDa antigen complex from second and third instar larvae. **Vet. Parasitol.** v.101, p.53-66, 2001

- TELLAM, R.L., EISEMANN, C.H., PEARSON, R.D. Vaccination of sheep with purified serine proteases from the secretory and excretory material of *Lucilia cuprina* larvae. **Int. J. Parasitol.**, v.24, p.757 - 64, 1994.
- WRAY, W., BOULIKAS, T., WRAY, V.P., KANCOL, J.R. Silver staining of proteins in polyacrilamide gels. **Anal. Biochem.**,v.118, p.197-203, 1981.
- WILLIAMS, A.G., COOMBS, G.H. Multiple protease activities in *Giardia intestinalis* trophozoites. **Int. J. Parasitol.**, v.25, p.771 - 8, 1995.
- YOUNG, A.R., MEEUSEN, E.N., BOWLES, V.M. Characterization of ES products involved in wound initiation by *Lucilia cuprina* larvae. **Int. J. Parasitol.**, v 26, p 245 - 52, 1996.
- ZUMPT, F. Myiasis in man and animals in the old world. London: Butterworth, 1965. 267 p.