

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DO PRODUTO DE EXCREÇÃO/
SECREÇÃO DE LARVAS DE *Cochliomyia hominivorax* (DIPTERA:
CALLIPHORIDAE)**

**BIOCHEMISTRY CHARACTERIZATION OF EXCRETION / SECRETION
PRODUCT OF *Cochliomyia hominivorax* LARVAE (DIPTERA :
CALLIPHORIDAE)**

Denise Gonçalves Teixeira^{1*}
Lígia Miranda Ferreira Borges¹
Thiago de Araújo Mastrângelo²
Valdirene Neves Monteiro³

¹Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brasil

²Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil

³Universidade Estadual de Goiás, Anápolis, GO, Brasil

*Contato para correspondência - denisegteixeira@gmail.com

Resumo

A espécie *Cochliomyia hominivorax*, conhecida popularmente como mosca da bicheira, é um parasita obrigatório de animais de sangue quente e sua distribuição geográfica estende-se por toda a América do Sul, excetuando-se o Chile. O parasitismo por esta mosca provoca perdas econômicas significativas e tem grande importância no Brasil. São poucos os estudos com foco nos produtos de excreção e secreção desta espécie e este trabalho teve como objetivo estudar as enzimas presentes no produto de secreção e excreção (E/S) dos três estádios larvais de *C. hominivorax*. O perfil de proteínas foi obtido por eletroforese em gel de poli(acrilamida) e a atividade proteolítica foi analisada utilizando-se gelatina, azocaseína e Na-benzoil-arginina-nitroanilida (BAPNA) como substrato. Nos produtos de E/S dos três estádios, as proteínas foram detectadas com um peso molecular aparente que variou entre 116 e 20 kDa. No ensaio de azocaseína, em diferentes faixas de pH, a maior atividade proteolítica ocorreu em pH 7,5 para todos os estádios larvais. Os ensaios foram realizados usando-se estes mesmos substratos e as amostras foram tratadas com os inibidores Benzamidina, Pepstatin A, 4-(2-aminoetil)benzenosulfonil fluoreto hidrocloreto (AEBSF), N- α -tosil-L-lisina clorometil cetona (TLCK), N- α -tosil-L-fenilalanina clorometil cetona (TPCK), Ácido etilenodiamino tetra acético (EDTA), Leupeptina e Trans-epoxysuccinyl L-leucylamido-4-guanidino butano (E-64). As proteinases presentes nos produtos E/S de L1 são em sua maioria serina proteases do tipo tripsina e quimotripsina, enquanto que para os produtos E/S de L2 e L3 foi evidenciada a presença de serina proteases e aspartil proteases.

Palavras-chave: enzima; miíase; mosca; parasitas.

Abstract

The species *Cochliomyia hominivorax*, also known as screwworm fly, is an obligate parasite of warm-blooded animals and its geographic range extends throughout South America, except Chile. This fly causes significant economic losses and has great importance in Brazil. Few studies have focused on the excretion and secretion products of this species, and this research aimed to study the enzymes present in the secretion and excretion (E/S) products of the three larval instars of *C. hominivorax*. The E/S profile of proteins was obtained by polyacrylamide gel electrophoresis and proteolytic activity was analyzed using gelatin, azocasein and Na-benzoyl-arginine-nitroanilide as substrates. In E/S products of the three instars, proteins were detected with an apparent molecular weight

ranging between 116 and 20 kDa. In the azocasein assay, at different pH ranges, the major proteolytic activity occurred at pH 7.5 for all larval instars. Assays were performed using the same substrates in which the samples were treated with the inhibitors Benzamidine, Pepstatin A, 4-(2-Aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride (AEBSF), N- α -tosyl-L-lysine chloromethyl ketone (TLCK), N- α -tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone (TPCK), Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), and Leupeptin-trans-Epoxy succinyl-leucylamido(4-guanidino) butane (E-64). Proteinases present in the E/S product of first larvae instar are mostly serine trypsin and chymotrypsin proteases, whereas for second and third instars serine proteases and aspartyl proteases were predominantly observed. Biochemical characterization of E/S products of all larval stages of *C. hominivorax* helps to improve the understanding of the physiology and the interaction of this parasite with host tissues.

Keywords: Enzyme; fly; myiasis; parasites.

Enviado em: 13 agosto 2015

Aceito em: 01 abril 2016

Introdução

Cochliomyia hominivorax faz parte da família Calliphoridae, Ordem Diptera, e é agente causador de miíase primária obrigatória em animais de sangue quente. É um dos principais parasitas que causam injúria na população de animais domésticos e silvestres em países sul americanos, exceto no Chile⁽¹⁾. No Brasil, os prejuízos causados por esta mosca, ocorridos pela queda de produtividade, pelos custos dos medicamentos para o tratamento, como também pela mão de obra para o manejo de bovinos susceptíveis e/ou doentes, somam 340 milhões de dólares por ano⁽²⁾.

Em estudos com vários dípteros que causam miíases, verificou-se que a produção de enzimas excretadas e/ou secretadas (E/S) pelas larvas é responsável pelo estabelecimento e sobrevivência desses parasitas nos hospedeiros⁽³⁾.

Estudos realizados com produtos E/S de larvas de primeiro estágio de *Hypoderma lineatum* permitiram a caracterização de três proteases do grupo serina, denominadas hipodermina A, hipodermina B e hipodermina C, que são produzidas durante a migração das larvas de primeiro estágio e estão envolvidas na digestão extra-intestinal^(4,5). A utilização dessas proteases purificadas na imunização de bovinos propiciou níveis de proteção superiores a 90%⁽⁵⁾.

Kerlin e East⁽⁶⁾ demonstraram que o extrato total contendo a secreção e excreção de *Lucilia cuprina* tem a capacidade de suprimir a proliferação de linfócitos *in vitro* e a produção de anticorpos em ovelhas. Testes de diagnóstico utilizando este mesmo extrato foram usados para a seleção de ovelhas resistentes à infestação por *L. Cuprina*⁽⁷⁾. Em outros estudos feitos com *L. cuprina*, foi verificado que a maioria das proteases secretadas e/ou excretadas pelas larvas são do tipo serina proteases, incluindo tripsina e quimotripsina⁽⁸⁾, além de enzimas com atividade colagenolítica⁽⁹⁾. Casu et al.⁽¹⁰⁾ purificaram duas quimotripsinas a partir dos E/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.

Estudos com *Lucilia sericata* investigaram o efeito dos seus produtos E/S em fibroblastos, utilizando modelos *in vitro* com o colágeno e a fibronectina como substratos. Foi demonstrado que o produto E/S desempenha um papel importante em processos como a proliferação celular, remodelação e reepitelização do tecido⁽¹¹⁾.

Uma caracterização bioquímica preliminar com larvas de *Oestrus ovis* utilizando gelatina-SDS-PAGE e análise da sensibilidade aos inibidores demonstrou a presença de pelo menos seis serina proteinases, principalmente “tripsina-like”, secretadas do tubo digestório das larvas⁽¹²⁾.

Brant⁽¹³⁾ analisaram os produtos E/S de larvas de *Dermatobia hominis* e concluíram que nos produtos de larvas de primeiro estágio predominam proteases da classe metalo proteases, enquanto que

as serina proteases predominam em larvas de segundo e terceiro estádios. Nas larvas de terceiro estádio, a atividade de proteases do tipo tripsina mostrou-se mais expressiva.

Estudos com *C. hominivorax* são ainda incipientes, o que torna importante a realização de pesquisas com esta mosca, já que esta é uma espécie presente no Brasil e que causa danos econômicos significativos à agropecuária nacional.

A análise do perfil bioquímico dessas substâncias, além de auxiliar na ampliação do conhecimento sobre o mecanismo parasitário, pode levar à aplicação dessas enzimas no contexto da Medicina Veterinária e Humana. Este trabalho teve como objetivo, portanto, estudar as enzimas presentes no produto de secreção e excreção (E/S) dos três estádios larvais de *C. Hominivorax*, obtendo o perfil de proteínas e avaliando-se também a atividade proteolítica dos produtos E/S das larvas.

Material e Métodos

Larvas de terceiro estádio foram coletadas de bezerros naturalmente infestados de fazendas próximas ao município de Caiapônia, Goiás e colocadas em recipientes de polipropileno contendo vermiculita e tampados com tecido *voile* até a pupação⁽¹²⁾. Após emergência dos adultos, uma colônia desta espécie foi mantida para obtenção de larvas de primeiro, segundo e terceiro estádios. Foram utilizados substratos à base de mel, ovo em pó e água para os adultos e para o estágio larval uma dieta à base de sangue *spray dried*, carne moída (corte patinho), ovo em pó e leite em pó desnatado. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Goiás pelo protocolo de número 006/14.

Quatrocentas larvas de primeiro estádio (L1), 300 de segundo (L2) e 110 de terceiro (L3) foram lavadas em solução de hipoclorito a 10% e, em seguida, em água destilada estéril. Após as lavagens, as larvas de L1, L2 e L3 foram incubadas à temperatura ambiente em 1, 2 e 10 mL, respectivamente, de meio composto de água milli-Q estéril contendo 1% de penicilina/estreptomicina⁽¹⁴⁾. As L1 foram incubadas por 16 horas, as L2 por 24 h, enquanto as L3 permaneceram no meio por 48 horas. Após o período de incubação, as larvas foram descartadas e o meio contendo o produto E/S foi recolhido, centrifugado a 7000g por 20 minutos a 4 °C e o sobrenadante recolhido (Microcentrífuga 5417 EPPENDORF®). Os produtos E/S foram estocados em freezer a -80 °C até o momento do uso. Para quantificar as proteínas totais presentes nas amostras, foi utilizado o método de Bradford⁽¹⁵⁾. A curva padrão foi construída com albumina de soro bovino.

Para se avaliar a atividade proteolítica dos produtos E/S de larvas de *C. Hominivorax*, utilizou-se a azocaseína como substrato⁽¹⁶⁾. Em tubos de microcentrífuga, 20 µL da amostra, 40 µL de azocaseína a 0,25% e 40 µL de tampão foram incubados a 37 °C por 1h. Foram utilizados os tampões Tris-HCl (50mM) pH 7,5; fosfato (50mM) pH 6,0; acetato de sódio pH 5,0 e pH 4,0. Após a incubação, foram adicionados em cada tubo 100 µL de ácido *tricloraacético* (TCA) a 10% e os tubos foram estocados a 4 °C por 10 minutos. Decorrido este intervalo, os tubos foram centrifugados a 2500 g por 30 minutos. Após centrifugação, 100 µL do sobrenadante foram transferidos para microplaca contendo 100 µL de NaOH (1M). A absorbância de cada amostra foi lida em leitor de ELISA a 450 nm. O ensaio foi realizado em duplicata assim como os controles, que foram preparados substituindo-se as amostras pelo tampão equivalente. Uma unidade proteolítica foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir uma variação da absorbância por mL de amostra por minuto, sob condições padrões.

Foram feitos ensaios de inibição com os seguintes inibidores: benzamidina a 10 mM, pepstatin a 100 mM, 4-(2-aminoetil)benzenosulfonil fluoreto hidrocloreto-AEBSF a 10 mM, N- α -tosil-L-fenilalanina clorometil cetona-TPCK a 1 mM, N- α -tosil-L-lisina clorometil cetona - TLCK a 1 mM, ácido etileno diamino tetra acético - EDTA a 10 mM, trans-epoxysuccinyl L-leucylamido-4-guanidino butano - E-64 a 0,1 mM e leupeptina a 0,1 mM. Em microtubos contendo 20 µL da amostra

e 20 µL de azocaseína a 3%, foram adicionados 60 µL dos inibidores citados acima e incubados a 37 °C por 15 horas. Após incubação, aos microtubos foram adicionados 120 µL de TCA a 10% e transferidos para a geladeira por 15 minutos. Após esse intervalo, o material foi centrifugado a 9000 g por cinco minutos a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para outro microtubo, ao qual foram adicionados 100 µL de NaOH para interromper a reação. Em seguida, 100 µL da solução de cada microtubo foram transferidos para microplacas de polipropileno e a leitura foi realizada em leitor de ELISA a 405 nm. Microtubos contendo os produtos E/S de cada estágio larval, sem adição de inibidores, foram submetidos aos mesmos procedimentos para controle das reações. O controle foi realizado em duplicata, assim como o ensaio com inibidores.

Ensaio utilizando o substrato N- α -benzoil-L-anginil-p-nitroanilida (BAPNA) também foram realizados para se investigar a cinética da atividade enzimática específica para tripsina. Em placas de polipropileno, foram adicionados aos poços 190 µL de solução do substrato (BAPNA 3 mM em tampão Tris-HCl pH 8,15; CaCl₂ 1 mM) e 10 µL de cada amostra dos produtos E/S das larvas em seus diferentes estádios. A absorbância foi medida a 405 nm e as leituras foram registradas a cada 10 minutos durante quatro horas. Para cada amostra, foram realizadas reações em triplicata e os resultados foram expressos com as médias das absorbâncias. O controle negativo da reação também foi realizado em triplicata, incluindo nos poços apenas o substrato. Os tratamentos foram distribuídos seguindo o delineamento inteiramente casualizado. Para as variáveis com distribuição normal foi aplicado teste F à análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Skott-Knott ($P \leq 0,05$). As análises foram realizadas pelo software Assisat versão 7.7 beta.

Para a visualização do perfil eletroforético dos produtos E/S das larvas, foi realizada uma eletroforese em gel de poli(acrilamida) de acordo com a metodologia de Laemmli⁽¹⁷⁾, utilizando-se gel de acrilamida/bisacrilamida 12% na presença de dodecil sulfato de sódio 10% (SDS). Amostras contendo 15 µg de proteína para L1, 9 µg de proteína para L2 e 7 µg de proteína para L3, foram diluídas, volume a volume em tampão da amostra (Tris-HCl 500 mM, pH 6,8; SDS 10%; 2-mercaptoetanol 120 mM; glicerol 10%; azul de bromofenol 0,05%). Foram aquecidas à temperatura de 100 °C por dois minutos e em seguida aplicadas no gel num volume de 20 µL por canaleta. A corrida eletroforética foi realizada em temperatura ambiente, sob corrente de 120 V, 40 mA e 60 W, no equipamento Mini-Protean da marca Bio-Rad de acordo com as instruções do fornecedor. Os géis foram corados com nitrato de prata e *comassie blue*.

Para se analisar o perfil de hidrólise de proteases contidas nos produtos E/S das larvas, foi realizado zimograma em gel de SDS-PAGE de acordo com Williams e Coombs⁽¹⁸⁾, com algumas modificações. Cada amostra foi diluída (v/v) em tampão da amostra (Tris-HCl 500 mM, pH 6,8; SDS 10%; 2-mercaptoetanol 120 mM; glicerol 10%; azul de bromofenol 0,05%) e aplicadas num volume de 20 µL por canaleta. A eletroforese foi realizada aplicando-se as amostras em gel de acrilamida a 12%, copolimerizado com gelatina a 0,5% e a corrida foi realizada sob uma corrente de 80 V. Após a corrida, os géis foram incubados em Triton X-100 (2,5% - v/v) a 37 °C, por 30 minutos, sob agitação constante. Para detectar a atividade proteolítica, os géis foram incubados em tampão Tris-HCl pH 8,15 contendo CaCl₂ 1 mM e ditioneitol (DTT a 1 mM) durante 15 horas a 37 °C⁽¹⁹⁾. Para a visualização das bandas de proteólise, os géis foram corados com *comassie blue* (solução de Azul de Comassie G-250 0,1%, metanol 25%, ácido acético 5%) por uma hora e descorados com solução de ácido acético a 10%.

A inibição da atividade proteolítica dos produtos E/S foi analisada por meio de zimograma em géis de poli(acrilamida) a 12% copolimerizado com gelatina a 0,5%, nos quais as amostras foram aplicadas após incubação prévia com os inibidores de proteases. Amostras dos três estádios larvais, contendo o equivalente 30 µg de proteínas, foram incubadas por uma hora a 37 °C com cada um dos inibidores. Após a incubação, as amostras foram diluídas em tampão da amostra (Tris-HCl 500 mM, pH 6,8; SDS 10%; 2-mercaptoetanol 120 mM; glicerol 10%; azul de bromofenol 0,05%) e aplicadas no gel num volume final de 20 µL. A corrida eletroforética foi realizada sob corrente de 80V. Após a corrida, os géis foram submetidos aos mesmos procedimentos descritos para o zimograma.

Resultados

A atividade proteolítica dos produtos E/S dos três estádios larvais de *C. hominivorax* utilizando a azocaseína como substrato mostrou-se variável em todas as faixas de pH. Para larvas de primeiro e segundo estágio, essa variação foi diferente em todos os níveis de pH testados, sendo que em pH 7,5 verificou-se a maior atividade proteolítica. Para produto E/S de larvas de terceiro estágio, a atividade proteolítica em pH 7,5 foi igual estatisticamente à atividade observada em pH 6,0, mas maiores do que no pH 5,0 e 4,0 os quais não diferiram significativamente ($P > 0,05$) (Figura 1).

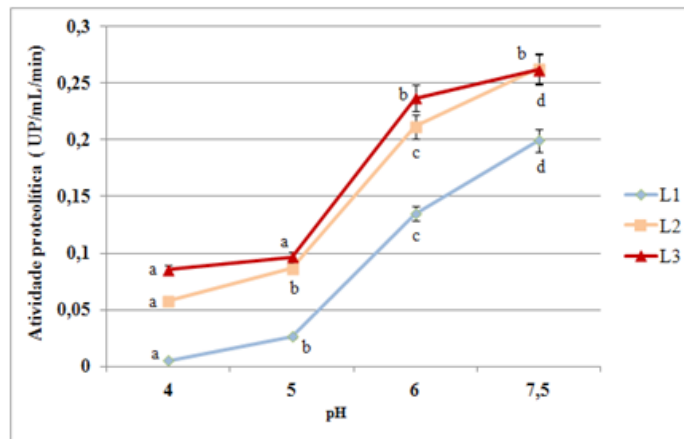


Figura 1. Atividade proteolítica dos produtos E/S de larvas de primeiro, segundo e terceiro estádios (L1, L2 e L3) de *C. hominivorax* sobre a azocaseína em diferentes faixas de pH. Cada marcador indica a média da absorbância obtida nas duplicatas. Letras iguais representam que não houve diferença estatística significativa entre as médias (ANOVA seguida de Scott-Knott, $p < 0,05$).

O ensaio com BAPNA mostrou que, nos produtos E/S de larvas de primeiro estágio, a atividade enzimática específica para tripsina é pequena, mas cresce com o decorrer do tempo. Para os produtos E/S de larvas de segundo estágio, a atividade enzimática específica se mostrou maior do que para larvas de primeiro estágio e se manteve praticamente constante com o decorrer do tempo. A atividade enzimática específica para tripsina teve seu pico aos 60 minutos para larvas de terceiro estágio e, com o decorrer do tempo, foi diminuindo, ficando constante após as duas primeiras horas de incubação (Figura 2).

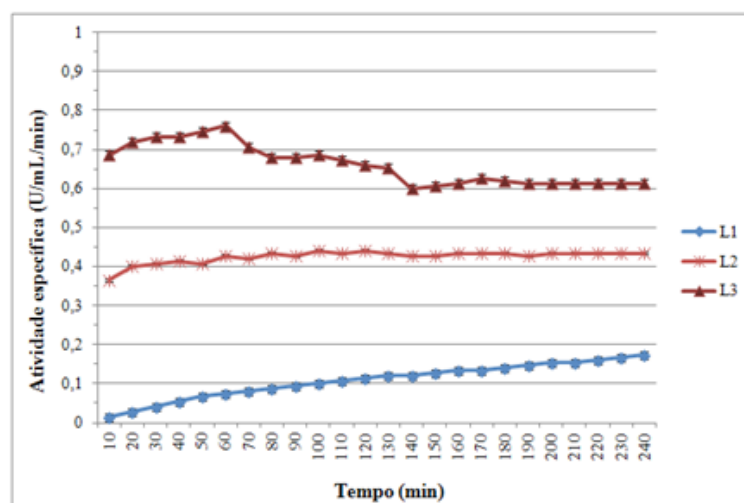


Figura 2. Ensaio de atividade específica dos produtos E/S de larvas de primeiro, segundo e terceiro estádio (L1, L2 e L3) sobre o substrato BAPNA ao longo de quatro horas.

No geral, os perfis da taxa de inibição da atividade proteolítica foram semelhantes para os produtos E/S dos três estádios larvais (Figura 3).

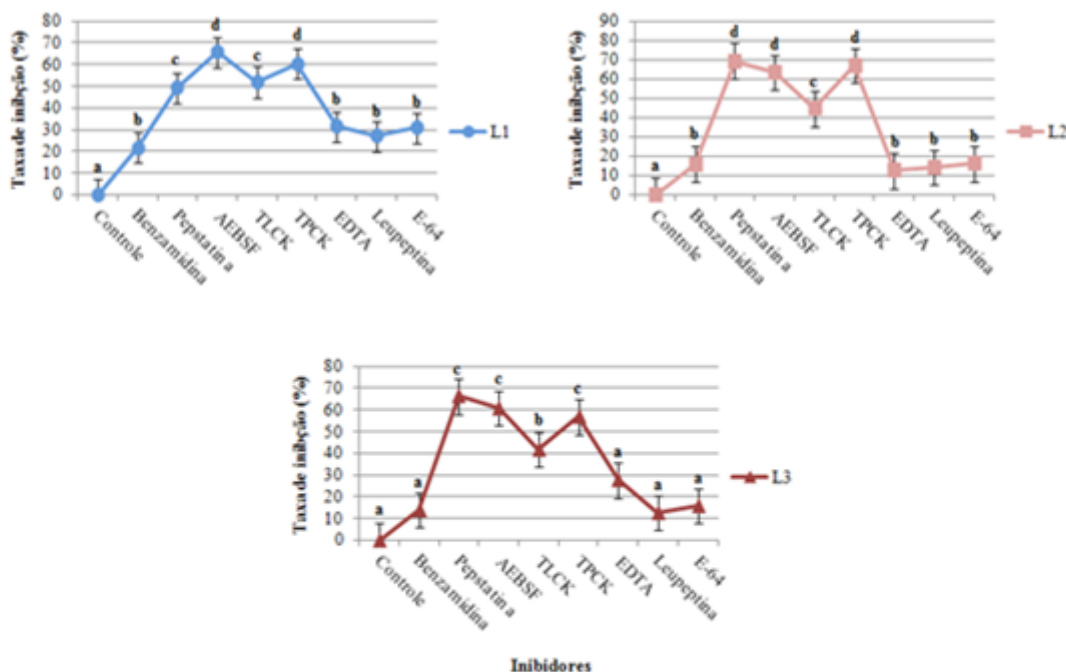


Figura 3. Taxa de inibição da atividade proteolítica obtidos pela incubação da azocaseína com os produtos E/S de L1 (A), L2 (B), L3 (C) tratados com diferentes inibidores de proteases. Cada marcador indica a média da taxa de inibição obtida com a incubação dos inibidores. Letras minúsculas iguais representam que não houve diferença significativa entre as médias (ANOVA seguida de Scott-Knott, $p < 0,05$).

Os dados obtidos pela incubação dos produtos E/S de larvas de primeiro estágio com os inibidores de proteases mostraram que os reagentes AEBSF e TPCK inibiram similarmente a atividade proteolítica. Em seguida, os inibidores Pepstatin-A e TLCK inibiram em cerca de 50% a atividade proteolítica dessas larvas, não diferindo significativamente entre si ($P > 0,05$). Benzamida, EDTA, Leupeptina e E-64 inibiram a atividade proteolítica de forma igual, porém em porcentagem inferior aos demais inibidores. Para produtos E/S de larvas de segundo estágio, a incubação com Pepstatin-A, AEBSF e TPCK causou a maior redução da atividade proteolítica, não tendo diferença significativa entre os três inibidores. O reagente TLCK inibiu a atividade dos produtos E/S dessas larvas de forma intermediária e o restante dos inibidores não diferiram entre si ($P > 0,05$), inibindo de forma bastante inferior em comparação com os três inibidores anteriores. Incubando os produtos E/S de larvas de terceiro estágio com Pepstatin A, AEBSF e TPCK, também se verificou maior inibição da atividade proteolítica, seguido do TLCK, que inibiu em menor porcentagem a atividade proteolítica desse produto. Para este último estágio larval, os demais inibidores não diferiram do controle ($P > 0,05$).

Os perfis proteicos dos produtos E/S de larvas de primeiro estágio de *C. hominivorax* estão apresentados na Figura 4. Em larvas de primeiro estágio, evidenciou-se a presença de bandas de proteínas com pesos moleculares aparentes variando entre 115 kDa a 24 kDa. O perfil protéico dos produtos E/S de larvas de segundo estágio revelou a presença de proteínas cujas bandas encontram-se distribuídas entre 116 e 20 kDa. Nos produtos E/S de larvas de terceiro estágio visualizam-se proteínas entre 116 kDa e 23 kDa, destacando-se dentro deste intervalo bandas com 68, 65, 38 e 35 kDa.

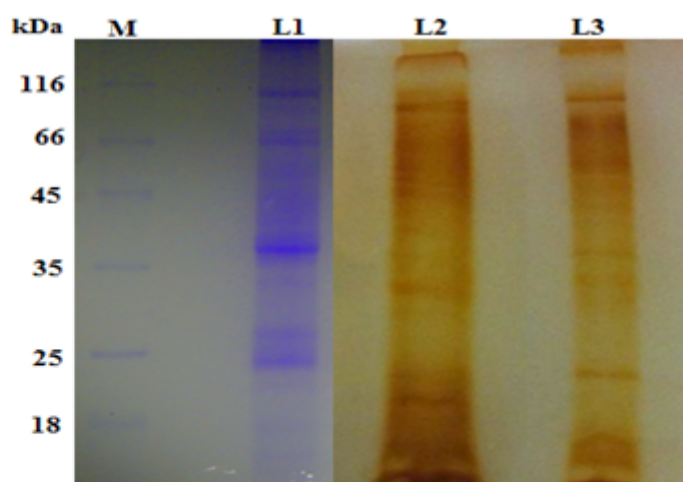


Figura 4. Perfil proteico dos produtos de excreção/secreção de larvas de primeiro, segundo e terceiro estádios (L1, L2 e L3) de *C. hominivorax*. Marcador molecular (M) e padrão de peso molecular aparente (kDa) indicado à esquerda (SDS-PAGE –Comassie Blue/Prata).

A análise do zimograma mostra o perfil de hidrólise da gelatina produzidos por amostras dos produtos E/S de L1, L2 e L3, nas concentrações de 10, 20, 30 e 50 μg . Em maiores concentrações, houve maior degradação do substrato, com a formação de um número maior de bandas de hidrólise para amostras de produto E/S de L3 (Figura 5).

Na Figura 6, encontram-se os perfis de hidrólise de gelatina produzidos pelos produtos E/S de larvas de L1, L2 e L3. Para o produto E/S de larvas de L1, os inibidores que produziram maior inibição da atividade enzimática foram AEBSF, TLCK e EDTA. Comparando-se os padrões de hidrólise produzidos pela amostra de L2 tratadas com os inibidores, notou-se que os inibidores que produziram maior inibição da atividade enzimática foram AEBSF e TLCK, inibindo boa parte da atividade proteolítica dessas larvas. A análise do gel em que os inibidores de proteases foram adicionados à amostra dos produtos E/S de L3 permitiu observar o desaparecimento de bandas quando utilizados os inibidores AEBSF e TLCK.

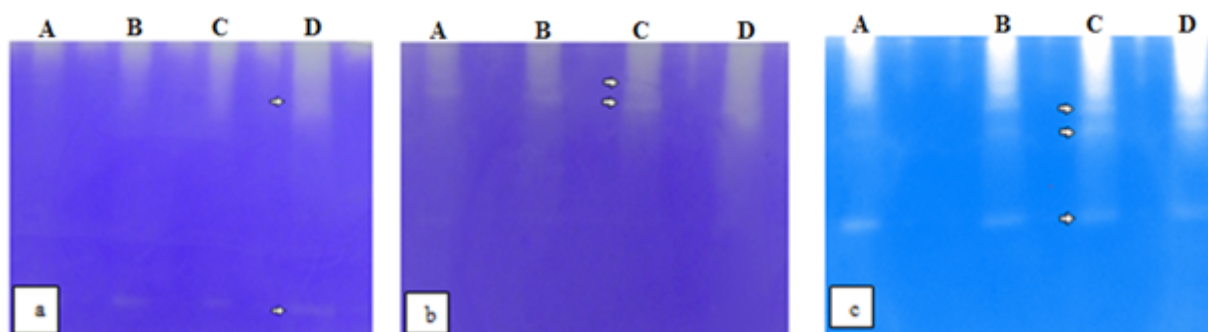


Figura 5. Gel de atividade proteolítica dos produtos E/S de larvas de primeiro, segundo e terceiro estádios de *C. hominivorax*. Concentração de proteinases em ordem crescente: (A) 10 μg ; (B) 20 μg ; (C) 30 μg ; (D) 50 μg . Estádios larvares: a- L1, b- L2, c- L3. Bandas de hidrólise mais evidentes são indicadas pelas setas.

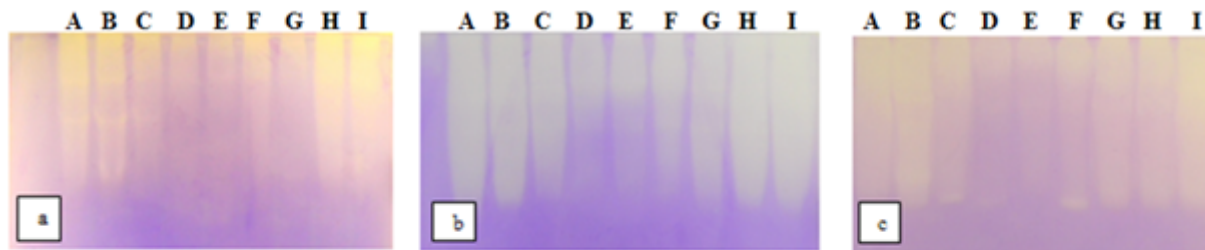


Figura 6. Efeito dos inibidores de proteases sobre a atividade proteolítica dos produtos E/S de primeiro, segundo e terceiro estádios de *C. hominivorax*. a- Proteases de L1; b- Proteases de L2; c- Proteases de L3. Amostra não tratada com inibidores de proteases - controle: (A). Amostras tratadas com inibidores de proteases: (B)-Benzamidina; (C)-Pepstatin A; (D)-AEBSF; (E)-TLCK; (F)-TPCK; (G)-EDTA; (H)-Leupeptina; (I)-E-64.

Discussão

Poucos estudos foram realizados com as espécies causadoras de miíases mais importantes no Brasil quanto à caracterização dos produtos E/S. Neste estudo, caracterizou-se o perfil bioquímico de algumas proteinases produzidas por larvas de diferentes estádios de *C. hominivorax*. A maior atividade frente à azocaína dos produtos E/S de *C. hominivorax* foi observada no pH 7,5 o que é semelhante ao observado em outros dípteros que produzem miíases. Por exemplo, em *O. ovis*, a atividade enzimática máxima dos produtos E/S de L3 foi observada em pH 8,0⁽²⁰⁾. O pH ótimo observado para as proteases oriundas de produtos E/S de *L. sericata*, *L. cuprina* e *Oxysarcodexia thornax* esteve entre 7,0 e 9,5^(9,21,22). Ainda em *L. cuprina*, Guerrini et al.⁽²³⁾ relataram que o maior crescimento e sobrevivência das larvas foi conseguido com pH 8,0-9,0 em ovelhas infestadas artificialmente. Hipodermina (A) e (B) produzidas por *H. lineatum* tiveram atividade ótima em pH 8,5^(24,25) e ainda o pH ótimo de collagenase ficou entre 8,0 e 8,5⁽²⁶⁾. Em contraste ao mencionado anteriormente, a atividade de tripsina e quimotripsina de produtos de excreção e secreção de larvas de *C. bezziana* foi alta sobre uma ampla gama de pH, variando entre 5,0 a 10,0⁽³⁾.

Segundo Brant et al.⁽¹³⁾, a atividade proteolítica dos produtos E/S de *D. hominis* foi muito baixa para larvas de primeiro estágio emanteve-se constante no decorrer de 24 horas, uma atividade intermediária foi observada em larvas de segundo estágio e a maior atividade foi obtida para larvas de terceiro estágio, o que é similar ao encontrado no presente estudo para *C. hominivorax*.

A análise do SDS-PAGE dos produtos E/S de larvas de *C. hominivorax* revelou a presença de proteínas cujas bandas encontram-se distribuídas entre 116 e 20 kDa para os três estádios larvais. Em estudos feitos com produtos E/S de *D. Hominis*, foram identificadas bandas protéicas que se situavam em uma faixa de distribuição entre 100 e 14 kDa⁽¹³⁾ e, a partir de sobrenadante de macerado total de larvas de *D. hominis* em SDS-PAGE a 12% corado por prata, foram reveladas proteínas entre 94 a 14 kDa em larvas de segundo estágio e 63 a 21 kDa em larvas de terceiro estágio⁽²⁷⁾, resultados que se assemelham aos valores de pesos moleculares encontrados para os produtos E/S de larvas de *C. hominivorax*. Estudos com produtos E/S de outros dípteros, como *S. magellanica*, revelaram o perfil de proteínas produzidas por larvas de terceiro estágio caracterizado por bandas de 63 kDa a 23 kDa⁽²⁸⁾. Para *C. bezziana*, foram identificadas bandas entre 65 e 14 kDa⁽³⁾. Analisando o SDS-PAGE dos produtos E/S de larvas de segundo e terceiro estádios de *O. ovis*, verificou-se a presença de um complexo conjunto de bandas de proteínas que variaram em peso molecular de 79,0 a 14,6 kDa⁽²⁹⁾. A análise de produtos E/S de larvas de terceiro estágio de *C. megacephala* produziu uma única banda a 16 kDa, uma banda entre 16 kDa e 23 kDa e uma ampla faixa entre 23 kDa e 45 kDa⁽¹⁴⁾. Comparando os pesos moleculares das proteínas identificadas nos produtos E/S desses dípteros, notou-se que as espécies biontófagas como *C. hominivorax*, *D. hominis*, *O. ovis* e *C. bezziana*, produzem proteínas

com massas moleculares superiores às espécies necrobiontófagas. É provável que essa diferença esteja relacionada à biologia destas espécies, já que espécies necrobiontófagas geralmente não penetram ativamente nos tecidos, alimentando-se superficialmente.

As proteinases presentes no produto E/S de larvas de primeiro estágio, evidenciadas tanto pela clivagem da azocaseína quanto pelo zimograma, indicam que elas são em sua maioria serina proteases do tipo quimotripsina. Os resultados corroboram os obtidos por vários autores que estudaram parasitas invasores de tecidos⁽³⁰⁾, incluindo as principais espécies causadoras de miíases. Em *H. lineatum*, a degradação de proteínas (C3) do sistema complemento⁽³¹⁻³⁴⁾ foi atribuída a uma enzima digestiva produzida pelas larvas de primeiro estágio e caracterizada como uma protease da classe das serinaproteases. Em *O. ovis*⁽³⁾ e em *L. cuprina*⁽³⁵⁾, a clivagem de IgG foi atribuída a uma protease digestiva identificada como serina protease. Estudos realizados por Cuervo et al.⁽²²⁾ identificaram também que as principais proteases expressas por *O. thornax* pertencem à classe de serina proteases. Pires et al.⁽²⁷⁾ detectaram atividades de cisteína e serina proteinases em larvas de segundo e terceiro estágios de *D. hominis* e mostraram uma maior atividade de serina proteinase quando comparada à atividade de cisteína proteinase para esta espécie.

A análise do efeito dos inibidores sobre a clivagem da azocaseína pelos produtos E/S de segundo e terceiro estágios permitiu concluir que as proteases de L2 e L3 são em sua maioria aspártico e serina proteases. A presença de aspartil proteases em secreções larvais também foi verificada para *L. sericata*, em que foram detectadas quatro enzimas proteolíticas, compreendendo duas serina proteases, uma aspartil proteinase e uma metalo proteinase, com pesos moleculares que variavam de 20 a 40 kDa e atividade ao longo de uma ampla faixa de pH⁽²¹⁾. Assim como verificado no presente trabalho, vários autores observaram diferença de proteases entre os diferentes estágios. Para a espécie *D. hominis*, foram detectadas metalo proteases em produto E/S de larvas de primeiro estágio e serina proteases em larvas de segundo e terceiro estágios⁽¹³⁾. Young et al.⁽³⁶⁾ verificaram que há uma modificação no padrão de proteínas durante o desenvolvimento larval de *L. cuprina*, passando de uma predominância de proteínas com alta massa molecular para um padrão com proteínas de massas inferiores à medida que ocorre o desenvolvimento larval. Esses autores também inferiram que o padrão de proteínas secretadas por larvas desta espécie muda dramaticamente e o aparecimento e desaparecimento de certas moléculas refletem a função que estas desempenham em diferentes estágios de desenvolvimento.

A hidrólise de gelatina pelos produtos E/S de larvas de *C. hominivorax*, caracterizada por maiores bandas de hidrólise, especialmente nas larvas de terceiro estágio, indicam uma atividade proteolítica mais intensa do que a observada em larvas de primeiro estágio. A cinética da atividade proteolítica da azocaseína, na qual a quantidade de cromóforo liberado foi significativamente inferior em larvas de primeiro estágio, reforçam essa constatação. Essa maior atividade proteolítica observada nas larvas de segundo e terceiro estágios também foi verificada nos produtos E/S de larvas de *D. hominis*⁽¹³⁾ e de *O. ovis*⁽¹²⁾. Esta maior atividade foi interpretada pelos últimos autores como relacionada ao grande crescimento da larva de terceiro estágio, a qual adquire cerca de 45% do seu peso final já no início do seu desenvolvimento. Levando em conta que as proteases são produzidas em função de requerimentos fisiológicos do parasita, pode-se inferir que as larvas de segundo e terceiro estágios de *C. hominivorax* apresentam um repertório de enzimas maior em decorrência da maior necessidade de ingestão de nutrientes oriundos da digestão do tecido de seus hospedeiros.

No presente estudo, observou-se que a atividade tríptica está presente em todos os estágios larvais, sendo que em larvas de primeiro estágio é baixa, porém aumenta com o decorrer do tempo. A atividade em larvas de segundo estágio é intermediária e tende a estabilizar-se com o tempo. A atividade tríptica é maior para larvas de terceiro estágio e tende a decair com o tempo. Estes resultados são similares aos encontrados para a espécie *D. hominis*⁽¹³⁾ e refletem a maior atividade trófica das larvas de terceiro estágio para as duas espécies, o que é compatível com o expressivo desenvolvimento que ocorre nesse estágio.

A caracterização bioquímica dos produtos E/S de todos os estágios larvais de *C. hominivorax* pode contribuir para investigações futuras sobre a fisiologia desse parasita e sua interação com o hospedeiro. Também poderá auxiliar outros estudos sobre específicos da atividade hidrolítica destas enzimas,

sejam de origem sintética ou natural, os quais poderão constituir ferramentas importantes para o desenvolvimento de novas moléculas que inibam proteases essenciais na fisiologia do parasita, bem como nos processos patológicos por ele gerados.

Conclusão

Os produtos E/S de larvas de primeiro e segundo estágio de *C. hominivorax* apresentam maior atividade proteolítica em pH neutro. Para larvas de terceiro estágio, a atividade proteolítica se mostrou estatisticamente igual em pH 7,5 e 6,0 e diminuiu proporcionalmente com a redução do pH.

Os perfis proteicos dos produtos E/S dos três estádios larvais mostra a presença de bandas de proteína com pesos moleculares aparentes variando de 20 a 116 kDa. O zimograma evidencia maiores bandas de hidrólise para PE/S de larvas de terceiro estágio.

As proteinases presentes no produtos E/S de larvas de primeiro estágio são em sua maioria serina proteases do tipo quimotripsina. Para larvas de segundo e terceiro estádios as proteinases são em geral serina e aspártico proteases.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

Referências

1. Lopes AM, de Carvalho RA, de Azeredo-Espin AM. Glutamate-gated chloride channel subunit cDNA sequencing of *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae): cDNA variants and polymorphisms. *Invert Neurosci*. 2014 Sep;14(2):137-146.
2. Grisi L, Leite RC, Martins JRDS, Barros ATM De, Andreotti R, Cançado PHD, et al. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* [Internet]. 2014; 23(2):150-6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25054492>.
3. Muharsini S; Sukarsih GR, Partoutomo S, Hamilton S, Willadsen P, Wijffels G. Identification and characterization of the excreted/secreted serine proteases of larvae of the Old World Screwworm Fly, *Chrysomya bezziana*. *Int J Parasitol*. 2000;30(6):705-14.
4. Casais R, Martín-Alonso JM, Boga JA, Parra F. *Hypoderma lineatum*: expression of enzymatically active hypodermin C in *Escherichia coli* and its use for the immunodiagnosis of hypodermosis. *Exp Parasitol*. 1998 Sep;90(1):14-19.
5. Baron RW, Colwell DD. 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*. 1991;38:185-97.
6. Kerlin RL, East IJ. Potent immunosuppression by secretory/excretory products of larvae from the sheep blowfly *Lucilia cuprina*. *Parasite Immunol*. 1992 Nov;14(6):595-604.
7. Sandeman RM, Feehan JP, Chandler RA, Bowles VM. Tryptic and chymotryptic proteases released by larvae of the blowfly, *Lucilia cuprina*. *Int J Parasitol*. 1990 Dec;20(8):1019-23.
8. Bowles VM, Feehan JP, Sandeman RM. Sheep plasma protease inhibitors influencing protease activity and

growth of *Lucilia cuprina* larvae in vitro. Int J Parasitol. 1990 Apr;20(2):169-74.

9. Bowles, VM, Carnegie, PR, Sandeman, RM. Characterization of proteolytic and collagenolytic enzymes from the larvae of *Lucilia cuprina*, the sheep blowfly. Aust J Biol Sci. 1988, 41:269-78.
10. Casu RE, Pearson RD, Jarmey JM, Cadogan LC, Riding GA, Tellam RL. Excretory/secretory chymotrypsin from *Luciliacuprina*: purification, enzymatic specificity, and amino acid sequencededuced from mRNA. Insect Mol Biol. 1994 Nov;3(4):201-11.
11. Horobin AJ, Shakesheff KM, Pritchard DI. Promotion of human dermal fibroblast migration, matrix remodelling and modification of fibroblast morphology within a novel 3D model by *Lucilia sericata* larval secretions. J Invest Dermatol. 2006 Jun;126(6):1410-8.
12. Tabouret G, Bret-Bennis L, Dorchies P, Jacquiet P. Serine protease activity in excretory–secretory products of *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae) larvae. Vet Parasitol. 2003 Jun;114(4):305-14.
13. Brant MPR, Guimarães S, Souza-Neto J a., Ribolla PEM, Oliveira-Sequeira TCG. Characterization of the excretory/secretory products of *Dermatobia hominis* larvae, the human bot fly. Vet Parasitol. 2010;168(3-4):304–11
14. El-Ebiarie A, Taha N. Molecular characterization of serine proteases from both first and third larval instars of *Chrysomya megacephala*. Life Sci J. 2012;9(3):2086-93.
15. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein dye binding. Anal Biochem. 1976 May 7;72:248-54.
16. La Peyre JF, Schafhauser DY, Rizkalla EH, Faisal M. Production of serine proteases by the oyster pathogen *Perkinsus marinus* (Apicomplexa) in vitro. J Euk Microbiol. 1995 Sep;42(5):544-51.
17. Laemmli UK. Cleavage of structural protein during the assembly of the bacteriophage T4. Nature. 1970 Aug 15;227(5259):680-5.
18. Williams AG, Coombs GH. Multiple protease activities in *Giardia intestinalis* trophozoites. Int J Parasitol. 1995 Jul;25(7):771-8.
19. Terra WR, Ferreira C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. Comp Biochem Physiol. 1994 Sep;109(1):1-62.
20. Angulo-Valadez CE, Cepeda-Palacios R, Ascencio F, et al. Proteolytic activity in salivary gland products of sheep bot fly (*Oestrus ovis*) larvae. Vet Parasitol. 2007 Oct 21;149(1-2):117-125.
21. Chambers L, Woodrow S, Brown AP, Harris PD, Phillips D, Hall M, Church JC, and 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. 2003;148:14-23.
22. Cuervo P, Mesquita-Rodrigues C, d’Avila Levy CM, Britto C, Pires FA, Gredilha R, et al. Serine protease activities in *Oxysarcodexia thornax* (Walker) (Diptera: Sarcophagidae) first instar larva. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2008 Aug;103(5):504-6.
23. Guerrini VH, Murphy GM, Broadmeadow M. The role of pH in the infestation of sheep by *Lucilia cuprina* larvae. Int J Parasitol. 1988 Apr;18(3):407-9.
24. Lecroisey A, Boulard C, Keil B. Chemical and enzymatic characterization of the collagenase from the insect *Hypoderma lineatum*. Eur J Biochem. 1979 Nov;101(2): 385-393.
25. Lecroisey A, Gilles AM, De Wolf A, Keil B. Complete amino acid sequence of the collagenase from the insect *Hypoderma lineatum*. J Biol. 1987 Jun 5;262(16):7546-51.
26. Lecroisey A, Keil B. Specificity of the collagenase from the insect *Hypoderma lineatum*. Eur J Biochem. 1985 Oct 1;152(1):123-30.

27. Pires FA, Moya-Borja GE, Barreira JD, Pinho RT, Alves CR. The main proteinases in *Dermatobia hominis* second and third instars larvae are serine-proteinases. *Vet Parasitol.* 2007;145:326-31.
28. Pinilla YT, Moreno-Pérez D a., Patarroyo M a., Bello FJ. Proteolytic activity regarding *Sarconesiopsis magellanica* (Diptera: Calliphoridae) larval excretions and secretions. *Acta Trop [Internet]. Elsevier B.V.*; 2013;128(3):686-91.
29. Alborzi A, Jolodar A, Seyfi M, Shapouri A, Bagherian E. Isolation and identification of excretory-secretory and somatic antigens from the *Oestrus ovis* larvae by SDS-PAGE and immunoblotting. 2014;5(4):307-11.
30. Broutin-L'Hermite I, Ries-Kautt M, Ducruix A. 1.7 Å X-ray structure of space-grown collagenase crystals. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2000 Mar;56(Pt 3):376-8.
31. Boulard C. Degradation of bovine C3 by serine proteases from parasites *Hypoderma lineatum* (Diptera, Oestridae). *Vet Immunol Immunopathol.* 1989 Mar;20(4):387-98.
32. Casais R, Martí'n-Alonso JM, Boga JA, Parra F. *Hypoderma lineatum*: expression of enzymatically active hypodermin C in *Escherichia coli* and its use for the immunodiagnosis of hypodermosis. *Exp Parasitol.* 1998 Sep;90(1):14-19.
33. Baron RW, Colwell DD. 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.* 1991;38:185-97.
34. Khaznadji E, Boulard C, Moire N. Expression of functional hypodermin A, a serine protease from *Hypoderma lineatum* (Diptera, Oestridae), in Schneider 2 cells. *Exp Parasitol.* 2003;104:33-9.
35. Elvin CM, Vuocolo T, Smith WJ, Eisemann CH, Riddles PW. An estimate of the number of serine protease genes expressed in sheep blowfly larvae (*Lucilia cuprina*). *Insect Mol Biol.* 1994 May;3(2):105-15.
36. Young AR, Meeusen EN, Bowles VM. Characterization of ES products involved in wound initiation by *Lucilia cuprina* larvae. *Int J Parasitol.* 1996 Mar;26(3):245-52.