

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS

TESE

PROTEINASES LARVARES DE
***Dermatobia hominis* (Linnaeus Jr., 1781)**
(DIPTERA: CUTEREBRIDAE)

Fabiano Araujo Pires

2007



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**PROTEINASES LARVARES DE
Dermatobia hominis (Linnaeus Jr., 1781)
(DIPTERA: CUTEREBRIDAE)**

Fabiano Araujo Pires

Sob a Orientação do Professor
Gonzalo Efraín Moya-Borja

e Co-orientação dos Professores
Carlos Roberto Alves; e
Jairo Dias Barreira

Tese submetida como requisito parcial
para obtenção do grau de **Doutor em**
Ciências, no Curso de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias, Área de
Concentração em Parasitologia
Veterinária

Seropédica, RJ
Abril de 2007

636.089696

P667p

T

Pires, Fabiano Araujo, 1970

Proteinases Larvares de *Dermatobia hominis* (Linnaeus Jr., 1781)
(Díptera: Cuterebridae) / Fabiano Araujo Pires – 2007.

53 f.

Orientador: Gonzalo Efraín Moya Borja.

Tese (doutorado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro,
Instituto de Veterinária.

Bibliografia: f. 45-52.

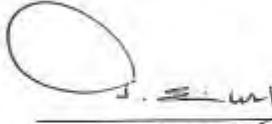
1. Parasitologia veterinária – Teses. 2. *Dermatobia hominis* –
Teses. 3. Serina proteinases – Teses. I. Moya Borja, Gonzalo
Efraín, 1935. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
Instituto de Veterinária. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

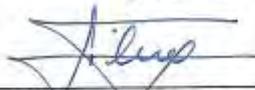
FABIANO ARAUJO PIRES

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de Concentração em Parasitologia Veterinária.

TESE APROVADA EM 26/04/2007.


Gonzalo Efraim Moya Borja, Ph.D., UFRRJ
(Orientador)


Carlos Roberto Alves, Dr., FIOCRUZ
(Co-orientador)


Carlos Eugênio Silva, Ph.D., UFRGS


Reginaldo Peçanha Brazil, Dr., FIOCRUZ


Saulo Cabral Bourguignon, Dr., UFF

DEDICATÓRIA

A **Deus**,

a meus Pais (**Álvaro** e **Marisa**),

a meus sobrinhos :

Júlia (Jurubeba), **Rafaela** (Rafinha) e **Augusto** (Guto),

e a meus **amigos** pela compreensão, apoio, carinho e amizade durante essa minha jornada..

*“Os covardes nunca tentaram, os fracos não conseguiram e somente os fortes chegaram até o fim”
(E.E.Aer., 1989).*

(In Memoriam)

De meus Primos,

Sandra e Rodrigo

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Carlos Roberto Alves, em especial, por me receber (quase que de pára-quadras) em seu laboratório, pelo seu interesse sempre constante nos trabalhos, e por sua dedicação, amizade e orientação mais que oportunas para realização desta tese.

Ao Professor Doutor Gonzalo Efraín Moya-Borja, pela sincera amizade, apoio, orientação e pelo “exemplo diferencial” que este proporciona a todos que o conhecem e tem o privilégio de serem seus alunos.

A Professora Dra. Constança Britto, por sua sinceridade, amizade e acolhida em seu laboratório.

A Professora Dra. Claudia Masini d`Avila Levy, por sua ajuda nos resultados finais, amizade sincera, e por me “entender” como poucos !!

A Dra. Rosa Teixeira Pinho, pela correção do trabalho e ajuda nos experimentos.

Ao Professor Doutor Jairo Dias Barreira por sua co-orientação.

A Mestre e Tecnóloga Luzia, que me guiou no obscuro “mundo dos géis”, tornando-os rotineiros, e por ser verdadeiramente a “ Mamãe-Ganso” do laboratório !!

Ao Professor Mestre, Jorge Luis Alves, meu irmão e anjo nas horas vagas, sempre aparecendo quando preciso!!

Ao mestrando Francisco, meu companheiro de bancada, e amigo pra todas as horas.

Ao Doutor Gil Vicente Oliveira da Silva que apesar de não ter me mencionado em sua tese, se encontra neste trabalho.

Aos pesquisadores e amigos do Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas, José Baptista, Daniela (Dani), Bernardo (Ovelha), Karina Matropasqua (*XuXu*), Bruno (“Cobra-cuspideira” ou “Carol da PUC” etc), Wellington, Natália e a todos que direta ou indiretamente me ajudaram neste trabalho.

Ao Instituto Oswaldo Cruz e a FIOCRUZ, que me acolheu como minha segunda casa.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, a qual me proporcionou este aprendizado.

Professores e funcionários do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias que diretamente ou indiretamente são fundamentais no desenvolvimento do curso por mim realizado.

A toda a minha família e amigos, por compreenderem a minha ausência.

E a todos os animais, por servirem de fonte inspiradora para a escolha de minha profissão.

Ao CNPq pelas bolsas de estudo até hoje concedidas a mim e pelos recursos financeiros que viabilizaram este trabalho.

BIOGRAFIA

FABIANO ARAUJO PIRES, filho de ALVARO PIRES e MARISA ARAUJO PIRES, nascido em 23 de março de 1970, na Cidade do Rio de Janeiro, Estado do Rio de Janeiro. Coursou o primeiro grau no Colégio Municipal Brigadeiro Faria Lima, Água Santa, Rio de Janeiro, do período de 1976 a 1981, de onde saiu com a 4ª série concluída, e no Colégio Pedro II, Engenho Novo, Rio de Janeiro, onde concluiu o 1º grau em 1985. Posteriormente ingressou no Colégio Miguel Couto, Rio de Janeiro, onde cursou e concluiu o segundo grau em 1988. Em 1990, ingressou na Escola de Material Bélico, formando-se 3º Sargento do Exército Brasileiro no Rio de Janeiro, escolhendo servir em Salvador, Bahia, solicitando no ano de 1995, sua retirada do serviço ativo para cursar sua graduação em Medicina Veterinária. Em março de 1996, ingressou no Curso de Graduação em Medicina Veterinária na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Município de Seropédica, Rio de Janeiro. Durante a graduação foi Estagiário do Laboratório de Protozoologia – Departamento de Parasitologia Animal - Instituto de Biologia –UFRRJ, no período de setembro de 1996 a março de 1998. Foi Monitor da Disciplina de Zoologia Médica e Parasitologia I do Departamento de Parasitologia Animal, do Instituto de Biologia – UFRRJ, tendo sido aprovado no Processo Seletivo do programa de Monitoria, realizado em 23/03/1998, em 1º lugar, exercendo a função de monitor da disciplina, no ano letivo de 1998. Foi Bolsista de Iniciação Científica, Convênio UFRRJ/CNPq-PIBIC, desenvolvendo o Projeto: “Análise Ecológica da Helmintofauna em Caprinos SRD da região do semi-árido nordestino, abatidos no matadouro público de Patos – PB”, no período de 1998 e 1999. Bolsista de Iniciação Científica Convênio UFRRJ/CNPq-PIBIC, desenvolvendo o Projeto: “Avaliação Hematológica, Bioquímica e Anátomo-Histopatológica de Cães Positivos para *Hepatozoon canis* (James, 1905)”, no período de 1999 e 2000. Ingressou no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias – Parasitologia Veterinária, em Março de 2001, sob orientação do Prof Dr Carlos Luiz Massard, desenvolvendo a Dissertação de Mestrado intitulada: “Aspectos Biológicos de *Hepatozoon* (Miller, 1908), Avaliação Hematológica e Bioquímica Sérica da Infecção Natural por *Hepatozoon canis* (James, 1905) em Cães de Áreas Rurais no Estado do Rio de Janeiro. Posteriormente, ingressou neste Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, em Março de 2003, sob orientação dos Profs. Drs. Gonzalo Efraín Moya-Borja e Carlos Roberto Alves, trabalhando em colaboração com o Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, desenvolvendo esta Tese de Doutorado.

RESUMO

PIRES, Fabiano Araujo. **Proteinases Larvares de *Dermatobia hominis* (Linnaeus Jr., 1781) (DIPTERA: CUTEREBRIDAE)**. Seropédica: UFRRJ, 2007, 53 p (Tese–Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2007.

Neste trabalho foram realizados ensaios de atividade de proteinase em solução e com proteínas imobilizadas em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio copolimerizado com gelatina, para detecção e quantificação das proteinases presentes nos extratos larvares de segundo (L2) e terceiro (L3) estágios de *Dermatobia hominis*. Nos ensaios quantitativos, utilizou-se um painel de peptídeos sintéticos específicos para as principais classes de proteinases. Verificamos que o substrato *pGlu-Phe-Leu p-nitroanilide* foi hidrolisado pelo extrato total de L2 ($3,0 \pm 0,2$ nmoles hora⁻¹ mg de proteína⁻¹) e L3 ($7,7 \pm 0,1$ nmoles hora⁻¹ mg de proteína⁻¹) e que ambas atividades foram parcialmente inibidas pelo *trans-epoxysuccinyl-L-leucylamido-(4-guanidino)butane*, 15 % e 3 % respectivamente. Também, demonstramos que o substrato *Na-p-Tosyl-L-Arg methyl ester* foi hidrolisado pelos extratos totais de L2 (117 ± 24 nmoles hora⁻¹ mg de proteína⁻¹) e L3 (111 ± 10 nmoles hora⁻¹ mg de proteína⁻¹), sugerindo uma predominância da atividade esterásica nestes extratos. A atividade específica de serino-proteinases foi totalmente inibida pelo *phenylmethylsulphonyl fluoride* nos extratos de L3, enquanto que somente 10 % desta atividade foi inibida nos extratos de L2. Além disso, nós detectamos que o extrato total das larvas L2 ($K_m = 7,59$) tem maior afinidade ao *Na-p-Tosyl-L-Arg methyl ester* do que o extrato total das larva de L3 ($K_m = 35,75$). Os resultados do ensaio qualitativo com géis de substrato sugerem que os extratos larvares L2 e L3 expressam serino-proteinases com similares (13 kDa e 22 kDa) e distintas (50 kDa em L2 e 30 kDa em L3) massas moleculares relativas. Adicionalmente, isolamos uma atividade esterásica enriquecida do extrato total de L3 utilizando sucessivas cromatografias em colunas de Aprotinina-Agarose e DEAE-Sephacell. Com esta estratégia, detectamos somente uma banda de proteinase de 50 kDa neste extrato total. Estes resultados contribuem para a caracterização das proteinases larvares de *D. hominis*.

Palavras-chave: *Dermatobia hominis*. Proteinases. Serino-proteinases.

ABSTRACT

PIRES, Fabiano Araujo. *Dermatobia hominis* (Linnaeus Jr., 1781) (DIPTERA: CUTEREBRIDAE) Larvae Proteinases. Seropédica: UFRRJ, 2007, 53 p (Thesis Doctor Science in Veterinaries Sciences). Veterinary Institute, Animal Parasitology Department, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2007.

We performed a combination of proteinase assay, either in solution or immobilized in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel copolymerized with gelatin, to detect and quantify proteinases of *Dermatobia hominis* second (L2) and third (L3) instar larvae. In quantitative assays, we examined proteinase activity by hydrolysis of a panel of peptide bonds specific for the main proteinase classes. We verified that the pGlu-Phe-Leu p-nitroanilide substrate was hydrolyzed by crude extracts of L2 (3.0 ± 0.2 nmoles hour⁻¹ mg of protein⁻¹) and L3 (7.7 ± 0.1 nmoles hour⁻¹ mg of protein⁻¹) and that both activities were partially inhibited by trans-epoxysuccinyl-L-leucylamido-(4-guanidino)butane, 15 % and 3 % respectively. Also, we demonstrated that the Na-p-Tosyl-L-Arg methyl ester substrate was hydrolyzed by crude extracts of L2 (117 ± 24 nmoles hour⁻¹ mg of protein⁻¹) and L3 (111 ± 10 nmoles hour⁻¹ mg of protein⁻¹), suggesting a predominance of esterase activity in the crude larval preparation. Interestingly, the specific activity of serine-proteinases was totally inhibited by Phenylmethylsulphonyl fluoride in the L3 crude extract, while only 10 % of this enzyme class activity was inhibited in the L2 crude extract. Also, we have detected crude extract L2 ($K_m = 7,59$) larvae have more affinity than L3 larvae ($K_m = 35,75$) to Na-p-Tosyl-L-Arg methyl ester. The results of the qualitative assays with substrate gels suggested that L2 and L3 larvae express serine-proteinases with similar (13 kDa and 22 kDa) and distinct (50 kDa in L2 and 30 kDa in L3) relative molecular masses. Additionally, we have isolated an enriched esterase activity from L3 crude extract using successive chromatographies in Aprotinine-Agarose and DEAE-Sephacell columns. By this strategy we detected only one 50 kDa proteinase in this larvae crude extract. Finally, these findings contribute to the biochemical characterization of *D. hominis* L2 and L3 larvae.

Key words: *Dermatobia hominis*. Proteinases. Serine-proteinases.

LISTA DE ABREVIACOES

(E-64)	[<i>trans-epoxysuccinyl L-leucylamido- (4-guanidino) butano</i>];
(o-phe)	<i>1,10-phenanthroline</i> ;
(CHAPS)	<i>3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propanesulfonate</i> ;
(DTT)	dithiothreitol;
(Bzn)	<i>Benzamidine hydrochloride hydrate</i> ;
(D.O.)	densidade 33tica;
(DEAE-Sephacell)	<i>diethylaminoethyl-Sephacell</i> ;
(N-FALGPA)	<i>N-(3-[2-Furyl]acryloyl)-Leu-Gly-Pro-Ala</i> ;
(BAPNA)	<i>N-Benzoyl-D-L-Arg-p-Nitroanilide</i> ;
(BTNA)	<i>N-Benzoyl-L-Tyr-p-Nitroanilide</i>
(N-Cbz-PFHLLVYSNHNap)	<i>N-Cbz-Pro-Phe-His-Leu-Leu-Val-Tyr-Ser-4-methoxy- b-Naphthylamide</i> ;
(TAME)	<i>Na-p-Tosil-L-Arg metil ester hydrochloride</i> ;
(pep A)	pepstatina A;
(pEFLpNan)	<i>pGlu-Phe-Leu-p-Nitroanilide</i> ;
(PMSF)	<i>phenylmethylysulphonyl fluoride</i> ;
(kDa)	Quilo Daltons ;
(SDS-PAGE)	sodium dodecyl sulphate-polyacrilamide gel electrophoresis; e
(TX-100)	triton X-100.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1	Míases	2
2.1.1	Definição	2
2.1.2	História de Descoberta	2
2.1.3	Classificações de míases	2
2.1.4	Moscas causadoras de míases	3
2.1.5	Importância	4
2.1.6	Espécies afetadas	5
2.1.7	Distribuição geográfica	5
2.1.8	Controle	5
2.2	<i>Dermatobia hominis</i> (Linnaeus Jr., 1781)	6
2.2.1	História	6
2.2.2	Posição Taxonômica:	7
2.2.3	Distribuição geográfica	7
2.2.4	Ciclo de Vida	8
2.2.5	Hospedeiros	11
2.2.6	Importância econômica	12
2.2.7	Controle	12
2.3	Enzimas	12
2.3.1	Proteases	15
2.3.2	Funções das enzimas proteolíticas	23
2.3.3	Proteinases na interação parasito-hospedeiro	23
2.3.4	Aplicação das Proteases	24
2.3.5	Proteinases como alvos quimioterápicos em doenças parasitárias	24
2.3.6	Proteinases descritas em dípteros	26
3	MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1.	Obtenção das larvas de segundo e terceiro estágios de <i>Dermatobia hominis</i> :	27
3.2.	Extração de proteína de larvas de <i>Dermatobia hominis</i>	27
3.3.	Cromatografia em coluna de afinidade	27

3.4 Cromatografia em coluna de DEAE-Sephacell	27
3.5 Determinação da atividade de proteinase em solução com substratos peptídicos	28
3.6 Detecção de atividade para serino-proteinase em ensaios de cromatografia	28
3.7 Determinação do Km aparente para serino-proteinase nos extratos larvares	28
3.8 Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)	29
3.9 Ensaio de enzimografia	29
3.10 Determinação da concentração de proteínas	29
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5 CONCLUSÕES	44
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
7 ANEXO	53

ÍNDICE DE TABELAS E FIGURAS

- Tabela 1 Atividades de Proteinases de extratos larvares de L2 e L3 em painel de peptídeos sintéticos.
- Tabela 2 Atividade de inibidores de proteinases dos extratos das larvas L2 e L3.
- Tabela 3 Rendimento das etapas de fracionamento de serino-proteinase de L3.
- Figura 1 Formas evolutivas, habitat e hospedeiro parasitado por *D. hominis*.
- Figura 2 Formas adultas, larvares e foréticos de *Dermatobia hominis*.
- Figura 3 Classificação das enzimas peptidases, divididas em endopeptidases e exopeptidases.
- Figura 4 Classificação das proteases, adaptado de (BEYNOM & BOND, 2001).
- Figura 5 Mecanismo catalítico das serino-proteinases, adaptado de (<http://delphi.phys.univ-tours.fr/Prolysis/introprotease.html>).
- Figura 6 Mecanismo catalítico das metalo-proteinases, adaptado de (<http://delphi.phys.univ-tours.fr/Prolysis/introprotease.html>).
- Figura 7 Mecanismo catalítico das cisteíno-proteinases, adaptado de (<http://delphi.phys.univ-tours.fr/Prolysis/introprotease.html>).
- Figura 8 Mecanismo catalítico das aspártico-proteinases, adaptado de (<http://delphi.phys.univ-tours.fr/Prolysis/introprotease.html>).
- Figura 9 Atividade enzimática dos extratos larvares de L2 e L3 de *D. hominis* sobre substrato cromogênico TAME.
- Figura 10 Perfil de proteínas das larvas de *Dermatobia hominis*.
- Figura 11 Atividade de Proteases larvares de *Dermatobia hominis* em gelatina-SDS-PAGE.
- Figura 12 Fracionamento por cromatografia em DEAE-Sephacell das proteínas de L3 de *Dermatobia hominis*.
- Figura 13 Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida das frações de L3 eluídas da coluna de troca iônica.
- Figura 14 Enzimografia das frações com atividade esterásica eluídas da coluna de troca iônica.
- Figura 15 Cromatografia em Coluna de Aprotinina-agarose das proteínas com atividade esterásica de L3 eluídas da coluna de troca iônica.
- Figura 16 Análises por eletroforese das proteínas de L3 eluídas da coluna de Aprotinina-agarose.

1 INTRODUÇÃO

Dermatobia hominis (Linnaeus Jr. 1781) é um inseto da ordem Díptera, família Cuterebridae. É um inseto holometabólico, que faz a dispersão de seus ovos através de foresia e produz larvas do tipo biontófagas, que realizam parasitismo obrigatório em vertebrados (MARCONDES, 2001). No Brasil, onde é conhecida popularmente como “berne”, a mosca ocorre em quase todos os Estados da Federação, excluindo as zonas secas do Nordeste; com maior ocorrência nos Estados do Rio de Janeiro, Espírito Santo, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, Bahia, Goiás e Minas Gerais (SANAVRIA et al., 2002).

A miíase nodular cutânea, provocada pela larva da *D. hominis* já foi descrita em vários hospedeiros homeotérmicos, domésticos e silvestres. A doença também ocorre no homem, apresentando maior importância entre os bovinos, onde pode causar queda na produção de carne e leite, e depreciação do couro (NEIVA & GOMES, 1917; CREIGHTON & NEEL, 1952; NEEL et al., 1955; MAIA & GUIMARÃES, 1985). Em zonas de alta infestação, o homem é parasitado com frequência.

Os prejuízos causados pelo berne na América Latina têm sido estimados em 260 milhões de dólares por ano como resultado da diminuição na produção do leite, carne e a desvalorização das peles (GRISI et al., 2002). Nas áreas de alta infestação os animais jovens susceptíveis podem chegar a infestar-se com mais de 1.000 larvas, infestação que pode ser letal. No Panamá, durante o biênio de 1928 a 1929, morreram mais de 1.000 bovinos devido ao ataque do berne. Em certas ocasiões quando as infestações de *D. hominis* são altas, as feridas deixadas pelas larvas demoram a cicatrizar, facilitando a infestação com larvas de *C. hominivorax*. No Brasil sete milhões de peles de bovinos por ano são declaradas peças de baixa qualidade, devido ao alto número de perfurações provocadas pelas larvas do berne. Estudos brasileiros relacionados com as perdas de peso dos animais infestados, não demonstraram uma ação prejudicial do berne (MAGALHÃES & LESSKIU, 1982).

Métodos de controle utilizando-se do MIP (manejo integrado de pragas) devem ser desenvolvidos e avaliados criteriosamente a fim de controlar-se efetivamente esta ectoparasitose nos animais de produção (MOYA BORJA, 2003). Dentro deste contexto o presente trabalho tem como base a detecção de alvos moleculares, como as proteinases, para o desenvolvimento futuro de drogas mais eficazes ao controle desta parasitose.

II – OBJETIVO GERAL

Identificação de proteinases de *D. hominis* presentes nos extratos larvares de L2 e L3, possivelmente relacionadas com os mecanismos de infestação.

III - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinação qualitativa e quantitativa de proteinases dos estágios larvares de *D. hominis*; e
- Isolamento de uma fração enriquecida com serino-proteinase do extrato de L3 desta ectoparasitose.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Miíases

2.1.1 Definição

O termo miíase (*nyia* do grego = mosca) foi usado num sentido mais amplo por Esperança, em 1840, no artigo de revisão "On insects and their larvae occasionally found in the human body". Miíase tem sido então, definida como, "infestação de animais vertebrados vivos com larvas de dípteros que ao menos durante certo período de tempo, alimentam-se de tecidos vivos ou mortos do hospedeiro, de suas substâncias corporais líquidas, ou de alimento não digerido". Sendo vulgarmente chamadas de "bicheiras" (ZUMPT, 1965).

2.1.2 História de Descoberta

Larvas de inseto têm um importante papel na história da biologia, sendo fundamentais nas experiências que rejeitaram a teoria de geração espontânea. No século XVII, os cientistas europeus acreditavam que carne podre, por si só, daria origem a larvas de insetos e moscas. Em 1668, o poeta e médico italiano Francisco Redi (1626-1697) elaborou a seguinte experiência, sendo um dos primeiros a utilizar controles apropriados: ele colocou amostras de carne em duas séries de jarros, metade deles fechada e a outra metade aberta, e observou o apodrecimento da carne e o surgimento de larvas e moscas. A carne nos jarros fechados começou a apodrecer, mas, não tendo tido nenhum contato com a mosca adulta, não produziu larvas de insetos, enquanto que, a carne ao ar livre, os jarros foram visitados por moscas adultas, e infestados com larvas de moscas, e eventualmente foram produzidos mais moscas adultas. Redi julgou corretamente que, as larvas de inseto desenvolveram-se de ovos, muito pequenos, que foram depositados nas amostras de carne pelas moscas adultas (REDI, 1671).

2.1.3 Classificações de miíases

Há dois sistemas principais para a classificação das miíases. A primeira, em termos anatômicos, baseada na parte do corpo do hospedeiro que é infestada, e secundariamente, em termos parasitológicos, de acordo com o tipo de relação parasita-hospedeiro (PATTON, 1922). Na classificação parasitológica, as larvas produtoras de miíases, podem ser classificadas em dois grupos biologicamente distintos: parasitas obrigatórios ou parasitas facultativos.

Parasitas obrigatórios são espécies de dípteras, cujas larvas normalmente desenvolvem-se dentro ou sob tecidos vivos de vertebrados. Todos os requerimentos nutricionais de suas fases adultas (moscas) são retirados dos seus hospedeiros durante as fases larvares (HALL & WALL, 1995).

Esta classificação é subdividida de acordo com o local de predileção destas, nos hospedeiros em:

- (a) nasofaringe (i.e., relativo à ou afetando nariz e faringe) e cavidades de mamíferos herbívoros (Oestridae);
- (b) dérmica ou tecidos da hipoderme de certos mamíferos (Hypodermatidae e Cuterebridae (*Dermatobia hominis*), e Calliphoridae (*Cochliomyia hominivorax*);

- (c) tecidos cutâneos e subcutâneos de algumas espécies de aves (gênero *Philornis*, Muscidae); e
- (d) o tubo digestório de cavalos e outros mamíferos (Gasterophilidae).

As larvas podem ser encontradas na pele, em cavidades corporais (canais nasal, auditivo e sinusal) e nos tratos naturais (gastrointestinal, urinário etc). A infestação da pele é a forma mais comum e pode apresentar-se como: furuncular (nódulo grande doloroso e purulento), principalmente por *Dermatobia hominis* e *Cordylobia* spp., ou cavitária (por *Gasterophilus* spp.), de progressão lenta com áreas eritematosas. Infestações por moscas do gênero *Hypoderma* são caracterizadas por apresentarem sinais e sintomas gerais como: febre, prurido, artromialgia, hipereosinofilia, seguida pelo aparecimento de miíases furunculares ou rastejantes.

Parasitas facultativos, composto de dípteras em que o desenvolvimento larval é feito em materiais orgânicos em decomposição ou tecidos necróticos de animais vivos. Sendo que ambas as suas fases adultas e larvares se alimentam.

Há outras espécies de larvas de dípteros que podem acidentalmente desenvolver-se em alimentos ou líquidos, e assim, chegam até o trato digestório de animais passivamente, vivos ou mortos, não podendo, entretanto, serem consideradas como produtoras de miíases, visto que, estas não apresentam um modo de vida parasita durante certo período de tempo. A presença destas larvas no trato digestório do hospedeiro, contudo, pode causar certas reações patológicas de maior ou menor gravidade, sendo denominadas como miíase acidental ou pseudomiíase (GUIMARÃES & PAPAVERO, 1999).

2.1.4 Moscas causadoras de miíases

Moscas, ao contrário da maioria dos outros insetos, têm somente um único par de asas funcionais, sendo o outro afuncional. Eles são classificados como Dípteras, (di + pteron) "duas-asas" uma palavra cunhada por Aristóteles no século IV AC. Varejeiras (Calliphoridae) e "Fleshflies" (Sarcophagidae) são larvas de moscas, comumente responsáveis nas infestações por larvas de insetos, uma vez que, provavelmente compartilham de uma origem saprofágica comum, pois ambas as famílias desenvolvem-se em carne em putrefação do hospedeiro, especialmente em carcaças de vertebrados. Durante milênios, houve uma grande diversificação dos hábitos de procriação destas duas famílias que agora incluem espécies que são especializadas, pois se reproduzem em esterco ou como parasitóides de insetos, minhocas, lesmas, caracóis e anfíbios. Algumas espécies evoluíram ao longo do que é hipotetizado como sendo um caminho evolutivo particular de saprofagia, para espécies que são parasitas facultativos (desenvolvem-se em materiais orgânicos em decomposição ou tecidos necróticos de animais vivos), ou para parasitas obrigatórios de mamíferos, inclusive humanos e de pássaros. As estratégias de localização do hospedeiro pelas fêmeas adultas das espécies parasitas estão relacionadas intimamente às estratégias usadas pelas espécies que se criam em carne em decomposição, que localizam corpos de animais mortos, baseados na resposta aos odores de infecção e apodrecimento tecidual (HALL & SMITH, 1995).

As maiorias das moscas causadoras de miíases pertencem a uma das quatro famílias principais: Calliphoridae, Sarcophagidae, Oestridae ou Cuterebridae, embora também sejam conhecidos representantes de outras famílias, como Muscidae e Phoridae, como causadoras de miíases. Existem aproximadamente 150 espécies de Oestridae, sendo que todas causam miíases; aproximadamente mais de 1000 espécies de Calliphoridae e 2000 espécies de Sarcophagidae, sendo reportadas somente cerca de 80 espécies como causadoras de miíases. As famílias Oestridae e Cuterebridae (*Dermatobia hominis*) são todos parasitas obrigatórios,

geralmente com alto grau de especificidade pelo hospedeiro. Igualmente, os Califórídeos, causadores de miíases obrigatórias, como os “screwworms” do Velho Mundo e Novo Mundo (*Cochliomyia hominivorax* e *Chrysomya bezziana*, respectivamente) são verdadeiramente parasitas, enquanto alimentam-se em tecido vivo. Dentre os sarcófagídeos, duas espécies parasitas obrigatórias de vertebrados, podem infestar os humanos: *Wohlfahrtia magnífica* e *W. vigil*. *Wohlfahrtia magnífica* são reconhecidas como causadoras de miíases humanas, particularmente na Europa Oriental, Israel, e Norte da África. Miíases por *Cochliomyia hominivorax* e *Dermatobia hominis* são os agentes causais mais comuns das miíases humanas nas Américas (GUIMARÃES & PAPAVERO, 1999).

Estas duas espécies, *Cochliomyia hominivorax* e *Dermatobia hominis*, são originais da América e constituem os parasitas mais importantes dos animais domésticos e selvagens (MOYA-BORJA, 2003). *C. hominivorax* foi erradicada do E.U.A. e da maioria dos países da América usando a técnica de liberação dos machos sexualmente estéreis (GRAHAM, 1985). Estas espécies foram introduzidas acidentalmente no Norte de África (Líbia) e poucos casos humanos eram registrados no período de 1988 a 1990; para evitar prejuízos inesperados nos animais domésticos, selvagens e com a população humana, mais de 600 milhões de moscas estéreis foram liberadas no Norte da África, sendo alcançada a erradicação de *C. hominivorax* em junho de 1991 (CUNNINGHAM, 1991). Na América do Sul, casos de miíases são ainda registrados, sendo provocados geralmente por *C. hominivorax*. Em geral, os pacientes atacados apresentam fatores predisponentes como: falta de higiene pessoal, respiração bucal durante o sono, desnutrição, retardo mental, alcoolismo, senilidade, hemiplegia e traumatismos (DURIGHETTO et al., 1995; STEPHAN & FUENTEFRIA, 1999 e GARCÍA et al., 2002).

2.1.5 Importância

“Screwworms” são larvas de moscas que se alimentam em tecido vivo. Estes parasitas podem infestar qualquer mamífero ou pássaro através de feridas tão pequenas quanto uma picada de carrapato. Infestações sem tratamento podem ser fatais. “Screwworms” foram erradicados de diversos países; porém, estes parasitos podem se restabelecer nestas regiões através da introdução de animais infestados com larvas. A infestação por “screwworm” se estabelece quando, uma mosca fêmea faz sua oviposição em uma ferida. Ocasionalmente, “screwworms” do Velho Mundo também ovipositam seus ovos sobre a pele, particularmente se houver sangue ou descargas mucosas nesta superfície. Os ovos após serem incubados, dão origem a larvas que, escavam a ferida ou a carne. Feridas infestadas por “screwworms” freqüentemente atraem outras moscas, e infestações múltiplas são comuns. Depois de alimentarem-se durante 5 a 7 dias aproximadamente, as larvas de “screwworm” deixam a ferida e caem ao chão, onde escavam a terra, para iniciar o processo de pupação. Os adultos que emergem alimentam-se dos fluidos de ferida e acasalam depois de 3-5 dias aproximadamente. O tempo de vida de uma mosca macho é aproximadamente 14 dias; e cerca de 30 dias de vida para as fêmeas, dependendo da espécie. A distância que uma mosca viajará pode variar de 10-20 km em ambientes tropicais com uma alta densidade de animais, para até 300 km em ambientes áridos. Miíases em áreas não-endêmicas acontecem freqüentemente quando são introduzidos animais com miíases ou quando são carregadas moscas adultas em veículos (REICHARD, 2002). A erradicação do “screwworm”, *Cochliomyia hominivorax*, dos E.U.A., América Central e o Norte de África foi alcançada criando e liberando-se no ambiente machos estéreis por irradiação. O “human botfly”, *Dermatobia hominis*, não foi erradicado de qualquer região, porque não existe até o momento, nenhuma técnica disponível para sua produção em massa utilizando dietas artificiais. Também não são conhecidos estudos

sobre sua dispersão, comportamentos sexuais e locais de agregação dos adultos no campo. Como as miíases neotropicais continuam a ser tratadas basicamente com substâncias químicas, recomendações sobre o manejo da resistência inseticida e estudos sobre métodos alternativos são desenvolvidos, tentando aplicar futuramente o manejo ecológico de pragas para os “screwworms” e a *D. hominis* (MOYA-BORJA, 2003).

O custo da coexistência com estes parasitas foi de 120 milhões de dólares nos EUA em 1960 (BAUMHOVER, 1966) e de 156 milhões de dólares no México em 1982. O custo das medidas preventivas e de controle na América Central e Panamá alcançou 43 milhões de dólares por ano 1982 (SNOW et al., 1985). No Brasil foram calculadas perdas provocadas por estas pragas, de aproximadamente, 260 milhões de dólares por ano (GRISI et al. 2002).

2.1.6 Espécies afetadas

Todos os animais de sangue quente (endotérmicos) podem ser infestados por “screwworms”; porém, os vertebrados usualmente envolvidos são mamíferos (incluindo o homem), pássaros, anfíbios e répteis (HALL & WALL, 1995). As maiores perdas econômicas se encontram nas espécies bovina, caprina e ovina (GUIMARÃES & PAPAVERO, 1999).

2.1.7 Distribuição geográfica

“Screwworms” são muito suscetíveis a temperaturas frias e a longos períodos de temperaturas baixas. Estes organismos são sazonais em algumas áreas, e podem se dispersar em climas mais frios durante o verão. Só são achados “screwworms” do Novo Mundo (*C. hominivorax*) no hemisfério ocidental, principalmente nas regiões tropical e subtropical da América do Sul, mas sua ocorrência é rara a cima de 2100 metros de altitude. Estes parasitas apresentavam-se bem difundidos, mas programas de erradicação (realizados com a liberação de moscas machos estéreis por irradiação) os eliminaram dos Estados Unidos, México, Porto Rico, Ilhas Virgens, Curacao, e toda América Central e a maioria do Panamá, restando só uma pequena área na fronteira com a Colômbia. O “screwworm” do Novo Mundo ainda existe em alguns países de América do Sul e em algumas ilhas caribenhas. Programas de erradicação são contínuos na Jamaica. Em 1988, foram detectados “screwworms” do Novo Mundo na Líbia, mas estes têm sido erradicados. *C. bezziana*, o “screwworm” do Velho Mundo, podem ser achados no sudeste Asiático, Kuwait, no subcontinente da Índia, na ilha de Papua-Nova Guiné, na África tropical e Sub-Saariana, Omã, Muscat, e Fujaira. Esta mosca nunca se estabeleceu na Europa, Norte da África, Austrália, Oriente Médio, ou no Hemisfério Ocidental (HALL & WALL, 1995).

2.1.8 Controle

As estratégias propostas para o controle destas infestações são pobres pois, não apontam potenciais alvos moleculares que bloqueariam o ciclo de vida destes insetos. Além disso, há poucos produtos químicos com eficácia contra estas moscas causadoras de miíases e a maioria destas substâncias químicas pode produzir graves contaminações ao meio ambiente e aos animais (MCCONNELL & HRUSKA, 1993), ou deixar resíduos tóxicos na carne, no leite e seus derivados (ZAPATA et al., 1996). Com isto, as identificações de alvos molecularmente definidos, dentre estes as proteínases, são relevantes no desenvolvimento de potenciais imunógenos ou novos alvos para quimioterapia com aplicação em programas de controle destas ectoparasitoses.

2.2 *Dermatobia hominis* (Linnaeus Jr., 1781)

Dermatobia hominis (Linnaeus Jr., 1781) é um inseto pertencente à subclasse Pterigota, ordem Diptera, subordem Brachycera, Infraordem Cyclorrhapha, Schizophora, Caliptratae, família Cuterebridae. É um inseto holometabólico, isto é, de metamorfose completa, que faz a dispersão de seus ovos através de foresia, utilizando-se de outras espécies de dípteras para realizar a dispersão de seus ovos. A eclosão desses ovos produz larvas do tipo biontófagas, isto é, que ao eclodirem invadem a pele sadia dos vertebrados, realizando parasitismo obrigatório e causam miíase nodular cutânea nos hospedeiros (MARCONDES, 2001).

A existência da *Dermatobia hominis* na América neotropical, data desde as culturas pré-Colombianas antes do século XVI. Os Maias, Nahuatl e os Ameríndios do México, Américas Central e do Sul, apelidaram-na de “suglacuru”, “colmoyote” e “mbusura” nas descrições dadas aos espanhóis. Outros nomes locais desde então aplicados incluem, “berne” (nome mais utilizado no Brasil), “nuche” e “torsalo”. Na língua inglesa é referido como “tropical warble fly”, “American warble-fly”, “American botfly”, “beef-worm” ou “human bot fly”. Em outros países da América, recebe nomes populares como “guzano de monte”, “guzano de zancudo”, “nuche”, “torsalo” e muitos outros, inclusive dados pelos índios, como “ura”, “ikitugn”, “mberuaró”. Referências a esse parasito são encontradas desde o século XVII, feitas pelos missionários, médicos e naturalistas que viajavam pela América do Sul. Todas elas descreviam as larvas que cresciam na pele dos homens e animais após serem picados por “mosquitos” (MOYA BORJA, 1966; SANCHO, 1988 e GUIMARÃES & PAPAVERO, 1999).

2.2.1 História

A primeira descrição desse díptero foi feita por Linnaeus Jr. em 1781, que denominou-o *Oestrus hominis*. A primeira referência encontrada sobre *Dermatobia* no Brasil foi feita por Juzarte em seu diário de navegação pelos rios Tietê, Grande, Paraná e Gatemy entre 1769-1770, o qual descreveu entre os insetos que os perseguiam durante a viagem, “uns vermes que introduziam nas peles um bicho negro, cabeludo, semelhante à lagarta da couve”. Outra descrição da mosca foi feita por MACQUART em 1843, que a denominou *Cuterebra cyoniventrís*, tribo Oestride, embora ele não tivesse idéia de que estava descrevendo a fase adulta da larva previamente descrita. Até aquela época *D. hominis* foi classificada como pertencente ao gênero *Oestrus* e, em seguida, *Cuterebra*. Em 1845, GOUDOT obteve uma mosca a partir de uma pupa coletada na Colômbia e descreveu-a como *Cuterebra noxialis*. Em 1861, Brauer instituiu o gênero *Dermatobia* tanto para as espécies *D. cyaniventrís* como *D. noxialis*. Ao final do século XIX, Austen (1895) e Blanchard (1896) chegaram à conclusão, independentemente, que *D. cyaniventrís* e *D. noxialis* eram a mesma espécie e finalmente Neiva (1910) estabeleceu o sinônimo entre as espécies *D. hominis* e *D. cyaniventrís*. Foi Townsend (1917) que classificou a família Cuterebridae, incluindo o gênero *Dermatobia* na subfamília Dermatobiinae. Levou alguns anos para que os autores aceitassem *Dermatobia* como membro da família Cuterebridae. *Dermatobia hominis* (Linnaeus Jr., 1781) foi usado pela primeira vez por WARD (1903), nome aceito até hoje (GUIMARÃES & PAPAVERO, 1966 e MOYA BORJA, 1966).

2.2.2 Posição Taxonômica:

Reino: Animalia

Filo: Arthropoda

Classe: Insecta

Ordem: Diptera

Subordem: Cyclorrhapha

Família: Cuterebridae

Gênero: *Dermatobia*

Espécie: *Dermatobia hominis* (Linnaeus Jr., 1781), adaptado de REY, 2002.

2.2.3 Distribuição geográfica

Dermatobia hominis, é endêmico das regiões neotropicais da América Latina e o México, excetuando-se o Chile, por apresentar barreiras geográficas naturais como as Montanhas Andinas ao leste, e o Deserto do Atacama ao Norte (SANCHO, 1988). A presença do berne está associada com regiões que têm temperaturas moderadamente altas durante o dia e relativamente frias durante a noite, precipitação de mediana a abundante, vegetação densa e um número razoável de animais. Focos de alta infestação são observados em fazendas localizadas nas encostas dos Andes na Venezuela, Colômbia, Equador, Peru e Bolívia que descem para a região amazônica e fazendas de pecuária localizadas na Mata Atlântica brasileira. Outros ecossistemas preferidos pela mosca do berne em algumas regiões do Sudeste e Centro-Oeste do Brasil e nas províncias de Misiones e Corrientes da Argentina são aquelas formadas pelas fazendas atravessadas por rios ou riachos que correm entre montes com sombras produzidas pela vegetação (**Figura 1**, letras: C e D) (LOMBARDERO & FONTANA, 1968). Esta mosca ocorre em quase todos os estados brasileiros, excluindo as zonas secas do Nordeste, sendo que sua maior ocorrência tem sido verificada nos Estados do Rio de Janeiro, Espírito Santo, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, Bahia, Goiás e Minas Gerais (SANAVRIA et al., 2002).

Nas regiões onde se apresentam estações úmidas e secas bem marcadas a infestação do parasito diminui significativamente durante a estação seca (MAGALHÃES & LIMA, 1988). Nos países do Cone Sul incluindo alguns estados do sul do Brasil, as infestações dos bovinos se iniciam durante a primavera, atingem seu pico máximo no verão e diminuem durante o outono. Programas para incrementar áreas florestais na Argentina e no Uruguai estão favorecendo a incidência deste parasito nos bovinos, indicando que a mosca do berne está adaptada a viver nas margens da floresta. Em relação a altitude, o berne parece não ultrapassar os 1.400 metros, mas é muito comum a 600 metros sobre o nível do mar (NEEL et al., 1955).

2.2.4 Ciclo de Vida

As moscas copulam nas primeiras 24 horas após o nascimento. Poucas horas depois da fertilização, as fêmeas começam a freqüentar os locais onde se encontram várias espécies de dípteros que podem ser usados como foréticos (vetores). As moscas do berne se aproximam lentamente ao futuro vetor de seus ovos, o capturam no ar e, após sua imobilização, depositam uma massa de ovos na parte látero-ventral do abdome (**Figura 2**, letras; A, B, C e D) (GUIMARÃES & PAPAVERO, 1966).

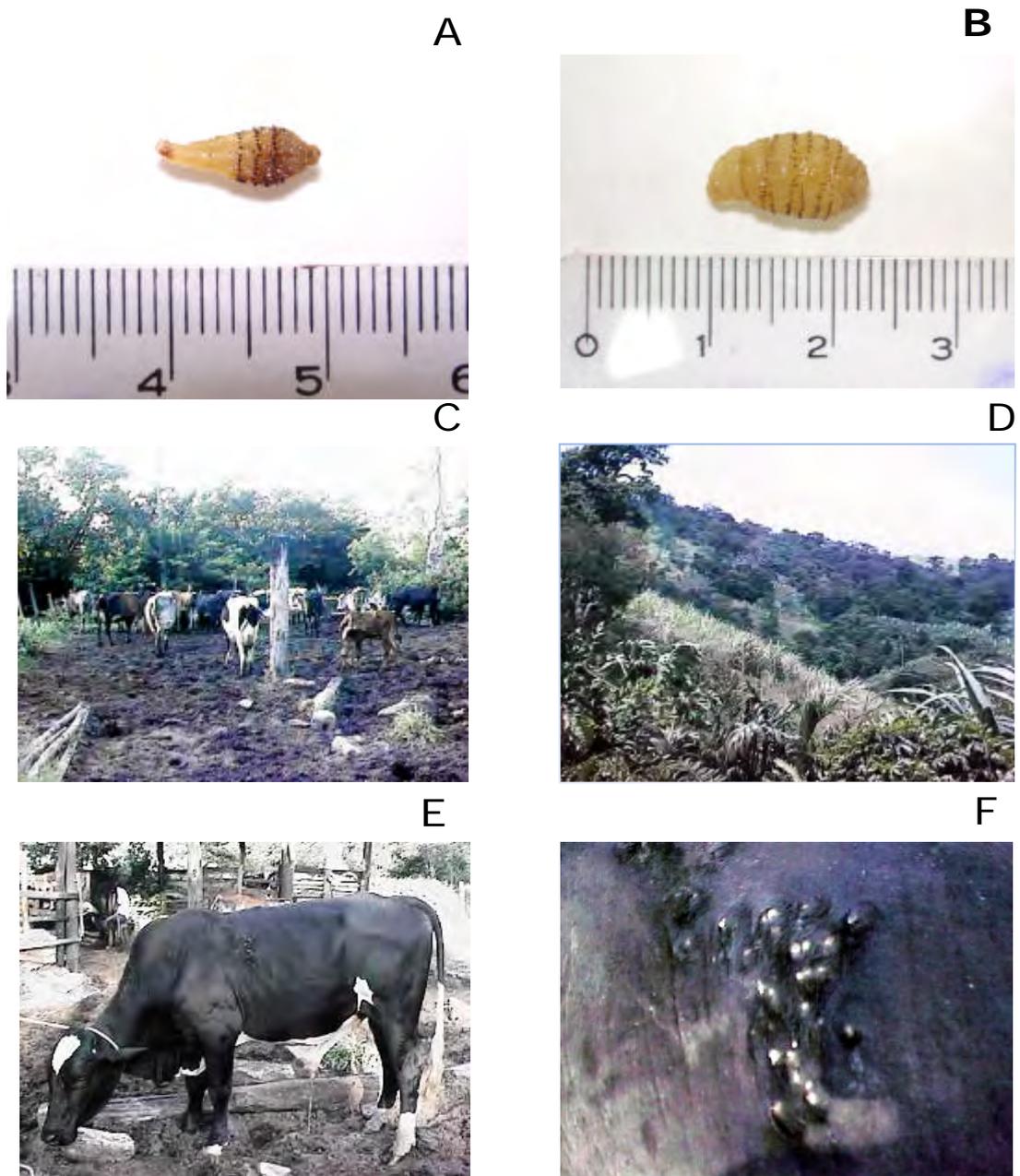


Figura 1. Formas evolutivas, habitat e hospedeiro parasitado por *D. hominis*. **A.** larva de *D. hominis* de 2^o estágio, **B.** larva de *D. hominis* de 3^o estágio, **C.** Curral com bovinos parasitados, **D.** Área de vegetação propícia para a mosca do “Berne”, **E.** Bovino mestiço parasitado, e **F.** região escapular de bovino parasitado.

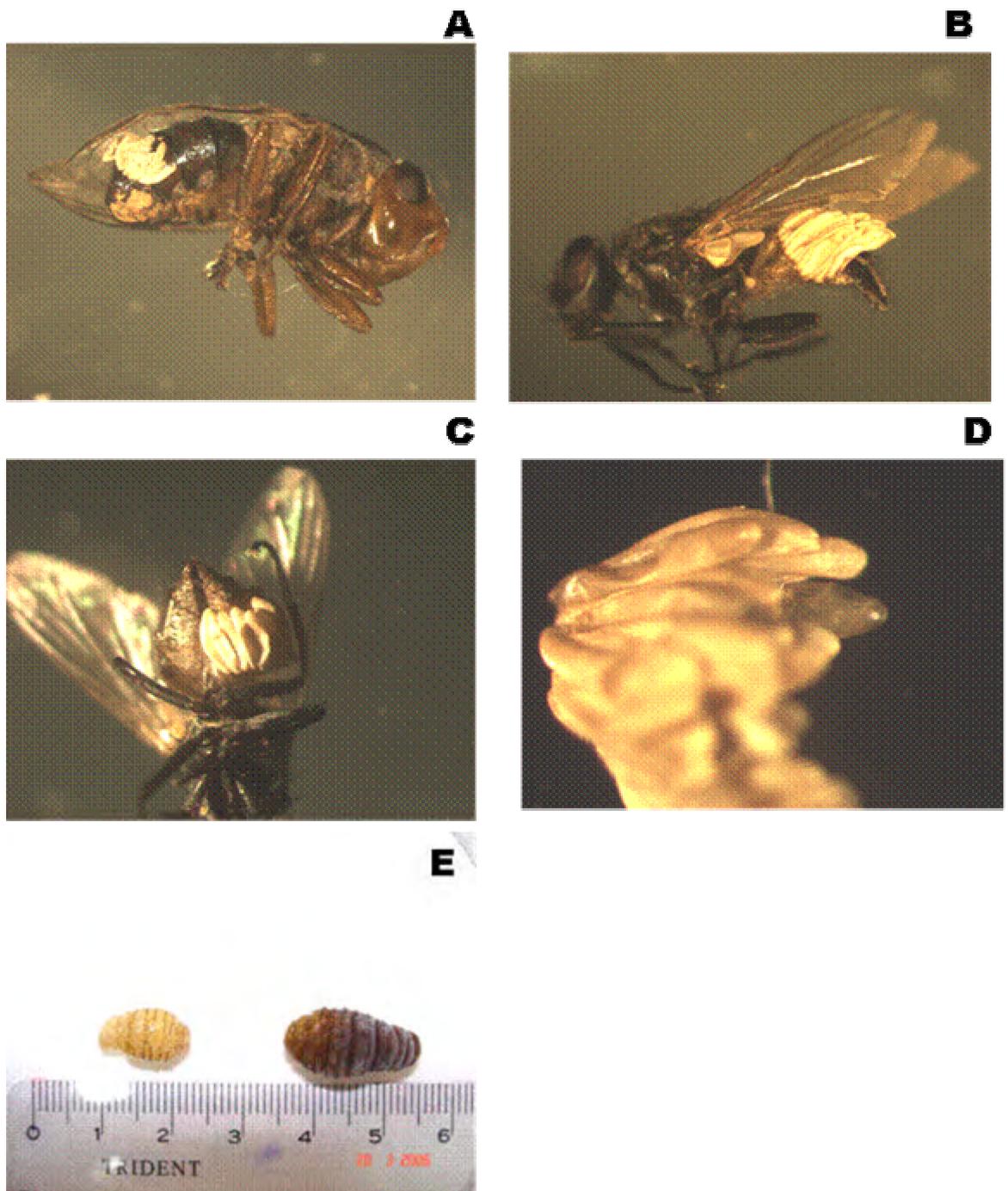


Figura 2. Formas adultas, larvares e foréticos de *Dermatobia hominis*. (A) Adulto de *D.hominis* com oviposição no abdômen, (B) *Musca domestica* com postura de *D. hominis* no abdômen, (C) Postura de *D. hominis* semelhante a “penca de banana”, (D) Larva de 1.^o estágio saindo do opérculo, e (E) Larvas de *D. hominis* melanizada a direita (L3) e não melanizada a esquerda (L2).

Sendo consideradas como características de um vetor eficaz, os dípteros que apresentam hábitos zoófilos, diurnos e de pouca mobilidade, com tamanho igual ou menor que a *Dermatobia hominis* (BATES, 1943). Têm sido reportadas mais de 50 espécies de foréticos pertencentes as seguintes famílias: Muscidae, Anthomyiidae, Tabanidae, Sarcophagidae, Culicidae, Simuliidae e Cuterebridae. No entanto, *Sarcopromusca pruna*, *Stomoxys calcitrans*, *Musca domestica*, *Fannia pusio* e *Haematobia irritans* são consideradas as espécies mais importantes no transporte dos ovos da mosca do berne (BATES 1943, NEEL et al. 1955, MOYA BORJA, 1966, 1982, MATEUS 1967). Os ovos do parasito incubam durante aproximadamente 8 dias sobre o forético, e quando este pousa sobre um hospedeiro as larvas emergem e se transferem para o animal com muita agilidade (**Figura 2**, letra: D). Penetrando na pele íntegra através do folículo piloso, provocando uma miíase nodular cutânea. O tamanho dos nódulos ou furúnculos aumentam à medida que as larvas crescem, e as secreções purulentas excretadas através das aberturas feitas pela larva favorecem a atração de um maior número de insetos, aumentando assim, a possibilidade de reinfestação pelas larvas do berne (MOYA BORJA, 2003).

O período larval varia de 35 à 42 dias (DA SILVA JUNIOR et al., 2002). As larvas maduras abandonam o hospedeiro durante a noite, ou nas primeiras horas da madrugada para evitar a ação abrasiva dos raios solares, a dos parasitos ou de predadores diurnos e caem no solo para pupar (**Figura 1**, letra B). Os solos relativamente úmidos ajudam na penetração das larvas e na formação de pupas normais. A emergência dos adultos provenientes das larvas que puparam sobre a superfície é drasticamente diminuída (LOBO & ZELEDÓN, 1984). O período pupal dos machos e das fêmeas à 25°C e 80% de umidade relativa, é de 30 e 32 dias, respectivamente. A longevidade média dos adultos é de 3 dias em laboratório (MOYA BORJA, 1981). O ciclo de vida de *D. hominis* se completa entre 80 e 150 dias (BANEGAS et al. 1967, GUIMARÃES & PAPAVERO 1999).

2.2.5 Hospedeiros

A miíase nodular cutânea, provocada pela larva da *Dermatobia hominis*, já foi reportada em vários hospedeiros endotérmicos, domésticos e silvestres, inclusive o homem, apresentando maior importância entre os bovinos (**Figura 1**, letras: E e F), onde pode causar queda na produção de carne e leite, e depreciação do couro, podendo também parasitar o homem e outros animais domésticos como caninos, suínos, caprinos, ovinos, felinos e raramente eqüinos. (NEIVA & GOMES, 1917; CREIGHTON & NEEL, 1952; NEEL *et al.*, 1955; MAIA & GUIMARÃES, 1985 e DA SILVA JUNIOR et al., 1998). Em zonas de alta infestação, o homem é parasitado com freqüência. Na espécie humana existem relatos de vários casos de dermatobiose em todo o mundo, inclusive Europa e Ásia, porém sempre associada a história de paciente que esteve em viagem nas Américas Central e do Sul (DA SILVA JUNIOR et al., 1998). Nem *Dermatobia*, nem seus foréticos que habitam a floresta boliviana, respeitaram os guerrilheiros de Che Guevara. Este parasito não ataca as aves, sendo que alguns investigadores confundiram pássaros parasitados pelas larvas do gênero *Philornis* com as larvas da *Dermatobia hominis* (MOYA BORJA, 2003). Em laboratório, somente tem sido possível criar as larvas em ratos, coelhos e camundongos, não sendo possível até hoje, a criação em grandes quantidades das larvas em culturas artificiais (CHAIA et al., 1975).

2.2.6 Importância econômica

Os prejuízos causados pelo berne na América Latina têm sido estimados em 260 milhões de dólares por ano como resultado da diminuição na produção do leite, carne e a desvalorização das peles (**Figura 1**, letra F) (GRISI et al. 2002). Nas áreas de alta infestação os animais jovens susceptíveis podem chegar a infestar-se com mais de 1.000 larvas, infestação que pode ser letal. No Panamá, durante o biênio de 1928 a 1929, morreram mais de 1.000 bovinos devido ao ataque do berne. Em certas ocasiões quando as infestações de *D. hominis* são altas, as feridas deixadas pelas larvas demoram a cicatrizar-se facilitando a infestação com larvas de *C. hominivorax*. No Brasil sete milhões de peles de bovinos por ano são declaradas peças de baixa qualidade, devido ao alto número de perfurações provocadas pelas larvas do berne. Estudos brasileiros relacionados com as perdas de peso dos animais infestados, não demonstraram uma ação prejudicial do berne (MAGALHÃES & LESSKIU, 1982).

2.2.7 Controle

O controle da dermatobiose nos bovinos restringe-se ao controle químico, o que sabidamente, gera grandes impactos ambientais, resíduos no leite e dos seus derivados, além de problemas de resistência em relação aos medicamentos utilizados. Havendo, por conseqüência, uma grande necessidade do desenvolvimento de métodos de controle sustentáveis, que podem ser usados como uma alternativa para tratamentos químicos.

Sendo assim, a identificação de alvos molecularmente definidos, como as enzimas, se tornam importantes para o desenvolvimento de potenciais imunógenos ou novos alvos para quimioterapia, com aplicação nos programas de controle desta parasitose em rebanhos neotropicais.

2.3 Enzimas

Enzimas são catalisadores das reações que ocorrem nos sistemas biológicos; elas possuem uma eficiência catalítica extraordinária, que é superior aos catalisadores químicos. As enzimas aceleram as reações químicas específicas e, ainda, funcionam em soluções aquosas e em condições de pouca variação de temperatura e pH. As enzimas aumentam a velocidade de reação, abaixando a energia de ativação do sistema. Com exceção de um pequeno grupo de moléculas de RNA com propriedades catalíticas (ribozimas), todas as enzimas são proteínas (VOET & VOET, 1995).

A classificação das enzimas consiste na sua organização dentro de grupos com atividades e características catalíticas similares. A nomenclatura das enzimas está de acordo com os princípios, regras e recomendações de um Código Internacional estabelecido em 1961 pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) (WHITAKER, 1972). De acordo com a Comissão de Enzimas (E.C.), foi estabelecido que a classificação das enzimas é baseada na sua ação catalítica, possuindo também um código numérico, formado por um conjunto de 4 números separados por pontos. Com esse sistema as enzimas foram classificadas dentro de 6 classes principais. Cada classe passou a ter um número particular segundo a relação abaixo: o primeiro dígito indica a classe à qual a enzima pertence. Exemplos (LEHNINGER et al., 1995; VOET & VOET, 1995):

Número	Classe	Descrição funcional.
1	Oxidoredutase	enzimas que catalisam reações envolvendo transferências de elétrons.
2	Transferase	enzimas que transfere um grupo de um composto para outro.
3	Hidrolase	enzimas que clivam ligações químicas por adição de água (hidrólise).
4	Liasas	enzimas que adicionam grupos a duplas ligações ou produzem duplas ligações por remoção de grupos.
5	Isomerase	enzimas que transferem grupos dentro de uma molécula produzindo isômeros.
6	Ligase	enzimas que ligam 2 moléculas através de uma reação usando eventualmente ATP como fonte de energia.

No caso das hidrolases, classe na qual se enquadram as enzimas proteolíticas, o segundo dígito indica o tipo de ligação afetada pela hidrólise. Dessa forma, temos: **1** para hidrólise de ligação éster, **2** para ligação glicosídica, **3** para ligação éter, **4** para ligação peptídica, e **5** para hidrólise de ligação C-N que não constitui ligação peptídica. Assim, estas enzimas possuem **E.C. 3. 4. x . x.**, com os dois últimos números obedecendo à classificação a seguir. O **terceiro dígito** para as enzimas proteolíticas pode se encontrar em uma de três faixas: do **11** ao **19**, do **21** ao **24** e **99**. O primeiro grupo que é do **11** ao **19**, são aquelas enzimas que hidrolisam ligações peptídicas nas extremidades amina e carboxila de proteínas; essas enzimas são chamadas de **exopeptidases**. As enzimas pertencentes ao grupo **E.C. 3.4.11-14**, são enzimas que hidrolisam ligações peptídicas próximas do N-terminal da proteína, e aquelas do grupo **E.C.3.4.15-17**, hidrolisam próximo do C-terminal. Ambas enzimas são chamadas de **exopeptidases**, sendo mais especificamente denominadas de **aminopeptidases** e **carboxipeptidases** (**Figura 3**).

O segundo grupo que vai do **21** ao **24**, são as enzimas que hidrolisam ligações peptídicas internas nas proteínas, essas enzimas são chamadas de **endopeptidases**.

O último grupo é reservado às enzimas cujo mecanismo de ação é desconhecido (GARCÍA-CARREÑO & DEL TORO, 1997). A **Figura 3** fornece um esquema de como estas enzimas hidrolisam os substratos (BARRETT, 1998).

Peptidases (3.4.)

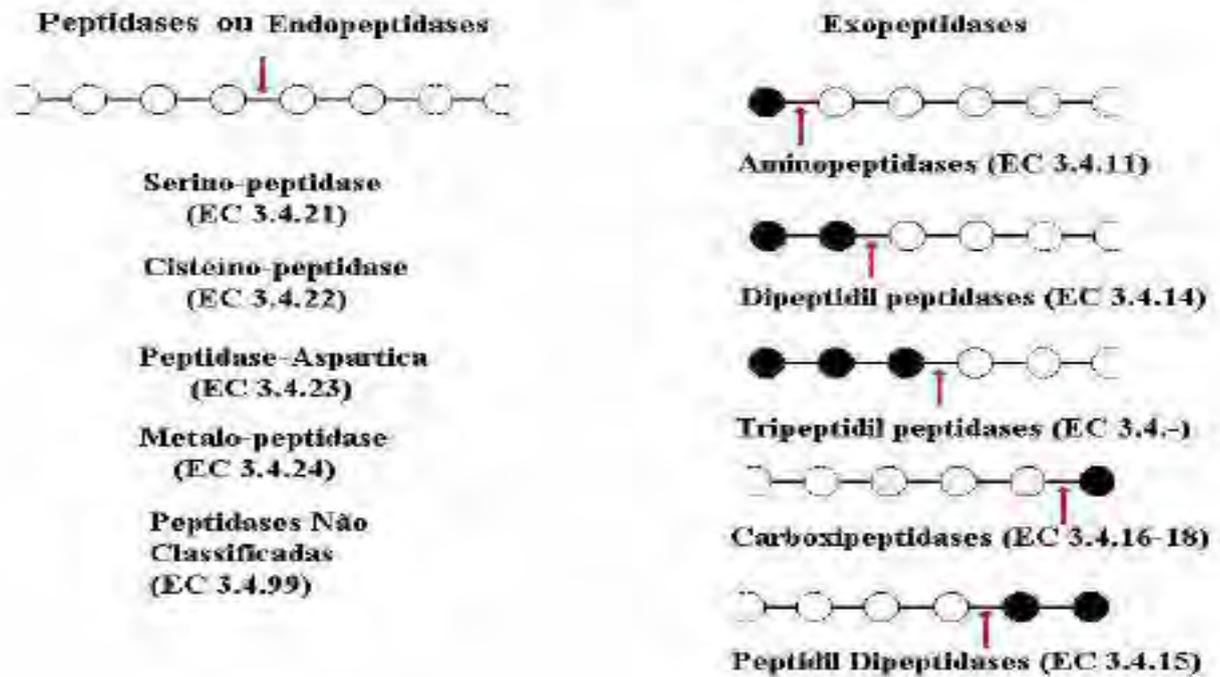


Figura 3. Classificação das enzimas peptidases, divididas em **endopeptidases** e **exopeptidases**. Figura extraída e modificada de (BARRETT, 1998).

2.3.1 Proteases

O termo protease (proteínases, peptidases ou enzimas proteolíticas) são utilizados de uma maneira geral como sinonímia, embora existam diferenças (**Figura 4**). Esta denominação, surgiu da química fisiológica alemã no final do século XIX em referência as enzimas proteolíticas. Essas enzimas catalisam a quebra das ligações peptídicas em proteínas. São enzimas que quebram ligações peptídicas entre os aminoácidos das proteínas e como uma molécula de água é utilizada no processo, as proteases são classificadas como hidrolases. Este processo é chamado de clivagem proteolítica, um mecanismo comum de ativação ou inativação de enzimas envolvido principalmente na digestão e na coagulação sanguínea (BEYNON & BOND, 2001).

São enzimas da classe 3, as hidrolases, e subclasse 3.4, as peptídeo-hidrolases ou peptidases. Estas enzimas constituem uma grande família (EC 3.4), dividida em endopeptidases ou proteínases (EC 3.4. 21-99) e exopeptidases (EC 3.4.11-19), de acordo com a posição da ligação peptídica a ser clivada na cadeia peptídica. O termo exopeptidase é utilizado para se referir às proteases que agem preferencialmente nos final das cadeias polipeptídicas na região N- ou C- terminal. Aquelas que atuam na região amino terminal livre liberam um único resíduo de aminoácido (aminopeptidases), um dipeptídeo (dipeptidil-peptidases) ou um tripeptídeo (tripeptidil-peptidases). As exopeptidases que atuam na região carboxi terminal livre liberam um único aminoácido (carboxipeptidases) ou um dipeptídeo (peptidil-dipeptidases).

Este termo também abrange as endopeptidases (proteínases e endoproteases) ao nos referirmos as proteases que atuam nas regiões internas da cadeia polipeptídica, entre as regiões N- e C- terminal.

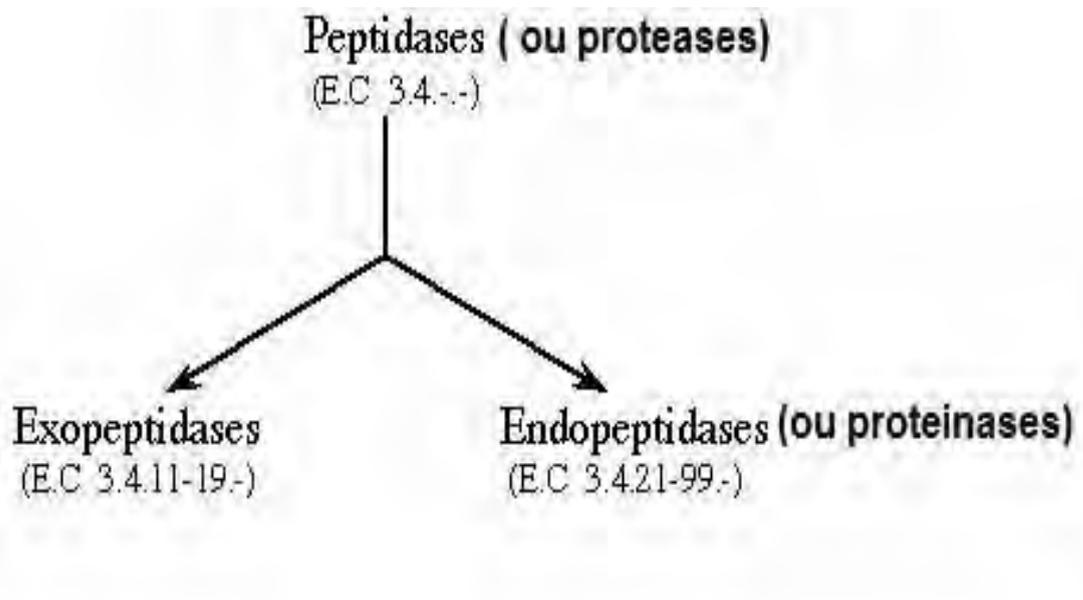


Figura 4. Classificação das proteases, adaptado de (BEYNOM & BOND, 2001).

Estas endopeptidases podem ser ainda subdivididas de acordo com o grupo reativo no sítio ativo envolvido com a catálise: em serino-proteinases (EC 3.4.21), cisteíno-proteinases (EC 3.4.22), aspártico-proteinases (EC 3.4.23), metalo-proteinases (EC 3.4.24) e threonina-proteinases (EC 3.4.25), e outras proteinases de mecanismo catalítico desconhecido (EC 3.4.99) (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/4/>). O mecanismo usado para clivar uma ligação peptídica envolve a fabricação de um resíduo de aminoácido (peptidases de serina, cisteína e treonina) ou a formação de uma molécula de água nucleofílica (peptidases de ácido aspártico e ácido glutâmico e metaloproteases) capaz de atacar o grupo carbonil da ligação peptídica. Uma maneira de formação de nucleófilo é pela tríade catalítica, onde um resíduo de histidina é usado para ativar uma serina, cisteína ou treonina como nucleófilo.

As enzimas cujo mecanismo de ação não está completamente elucidado são classificadas no subgrupo EC. 3.4.99. Estas enzimas dividem-se em 6 famílias e os componentes de cada uma destas possui estrutura e mecanismos de ação semelhantes. Logo, sua classificação é baseada na comparação de sítios ativos, nestes mecanismos de ação e suas estruturas tridimensionais, possuindo cada família resíduos de aminoácidos funcionais característicos arranjados em uma configuração particular para formar o sítio ativo. As peptidases são classificadas e nomeadas através de dois sistemas o E.C. que as classifica utilizando o tipo catalítico e o MEROPS que utiliza as relações evolutivas estruturais entre as peptidases classificadas em diferentes famílias, subdivididas em clãs, que divergiram de um ancestral comum (BEYNOM & BOND, 2001). BARRETT em 1994, propôs um sistema de agrupamento das enzimas dentro de *Clãs*, que são famílias de um antecessor comum (GARCÍA-CARREÑO & DEL TORO, 1997). O nome do Clã é formado da letra do tipo catalítico (como das famílias), acompanhado por uma segunda letra arbitrária principal. No Clã CA, são colocadas enzimas cujos resíduos do par catalítico encontram-se na ordem Cys, His, e mostram limitada conservação de aminoácidos ao redor dos resíduos catalíticos. O Clã é o termo usado para descrever um grupo de membros de uma família, a qual se originou de uma proteína ancestral única, mas mostram divergência, não podendo ser provado pela estrutura primária. O achado mostra uma relação entre os níveis de Clãs, pela similaridade na estrutura tridimensional, mas o arranjo dos resíduos catalíticos nas cadeias polipeptídicas e similaridades restritas na seqüência de aminoácidos próximos dos aminoácidos do sítio catalíticos podem também revelar tal similaridade. Cada família de peptidase é nomeada com uma letra denotando o seu tipo catalítico, (S, T, C, A, M, ou U), que corresponde respectivamente à: serina, treonina, cisteína, aspártico, metalo ou desconhecida (BARRETT et al., 1998).

As serino-proteases possuem um resíduo de serina em seu centro ativo e incluem duas famílias distintas: a pertencente a mamíferos (quimotripsina e tripsina pancreáticas, calicreína e elastase) e a bactérias (subtilisina), as quais diferem na seqüência de aminoácido e estrutura tridimensional, mesmo com um mecanismo enzimático e geometria do sítio ativo comuns (**Figura 5**). Analogamente, as metalo-proteases, cujo mecanismo catalítico utiliza um íon metal, geralmente o zinco, dividem-se em duas famílias: a carboxipeptidase pancreática A e B de mamíferos (exopeptidases homólogas de sítios ativos e estruturas similares) e a termolisina de bactérias, possuindo ambas uma estrutura química diferente, ainda que sejam dependentes de metal zinco e tenham configurações do sítio ativo similares (**Figura 6**).

As cisteíno-proteases, por sua vez, apresentam um aminoácido cisteíno no seu centro catalítico e incluem diversas catépsinas lisossomais de mamíferos, proteases ativadoras de cálcio citosólico (calpaínas) e as proteases papaína e actinidina, advindas de plantas, sendo a papaína a mais estudada (**Figura 7**).

E finalmente, as aspártico-proteases, dotadas de duas unidades de ácido aspártico no seu centro catalítico, que se subdividem em: penicilopepsina de bactérias, pepsina mamífera, renina, quimosina e certas proteases fúngicas (BEYNON & BOND, 2001; RAWLING & BARRET, 1994) (**Figura 8**).

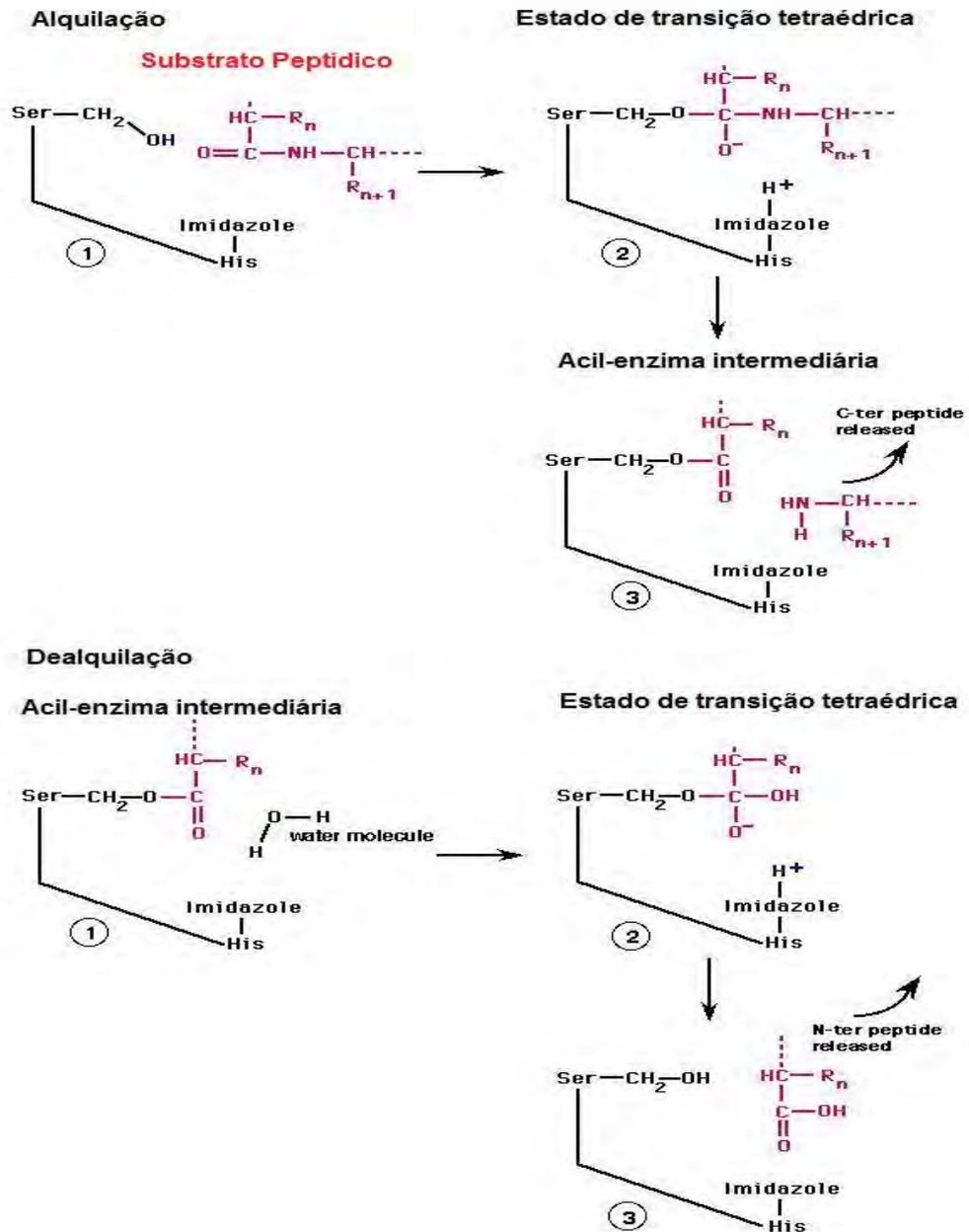


Figura 5. Mecanismo catalítico das serino-proteínas, adaptado de (<http://delphi.phys.univ-tours.fr/Prolysis/introprotease.html>).

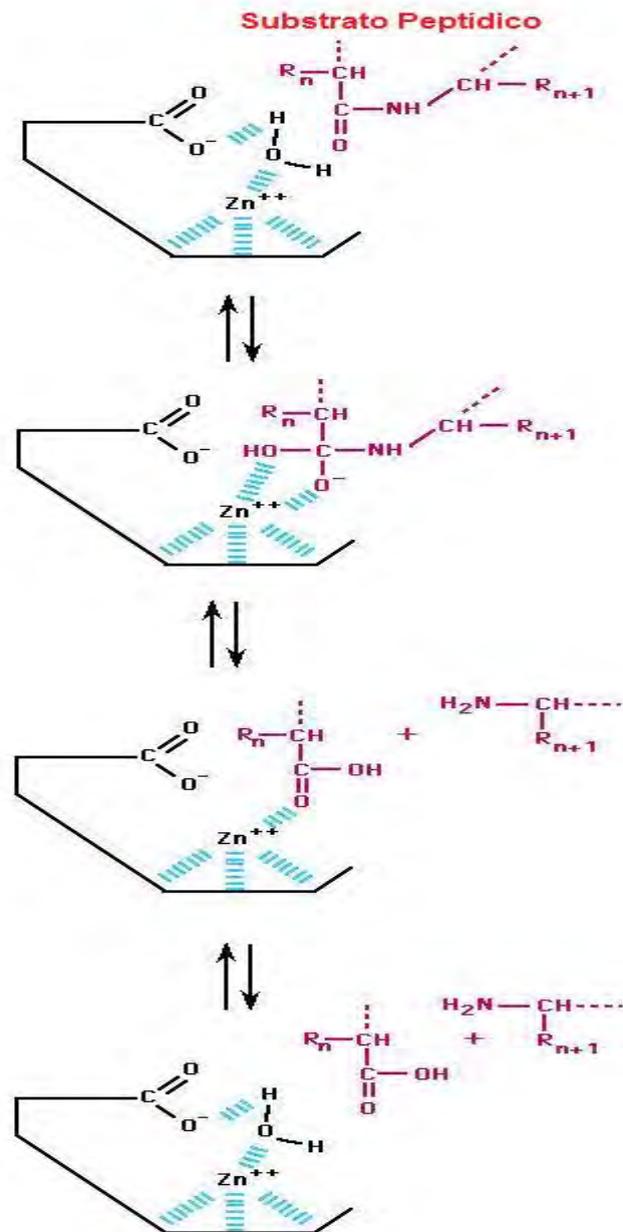


Figura 6. Mecanismo catalítico das metalo-proteínas, adaptado de (<http://delphi.phys.univ-tours.fr/Prolysis/introprotease.html>).

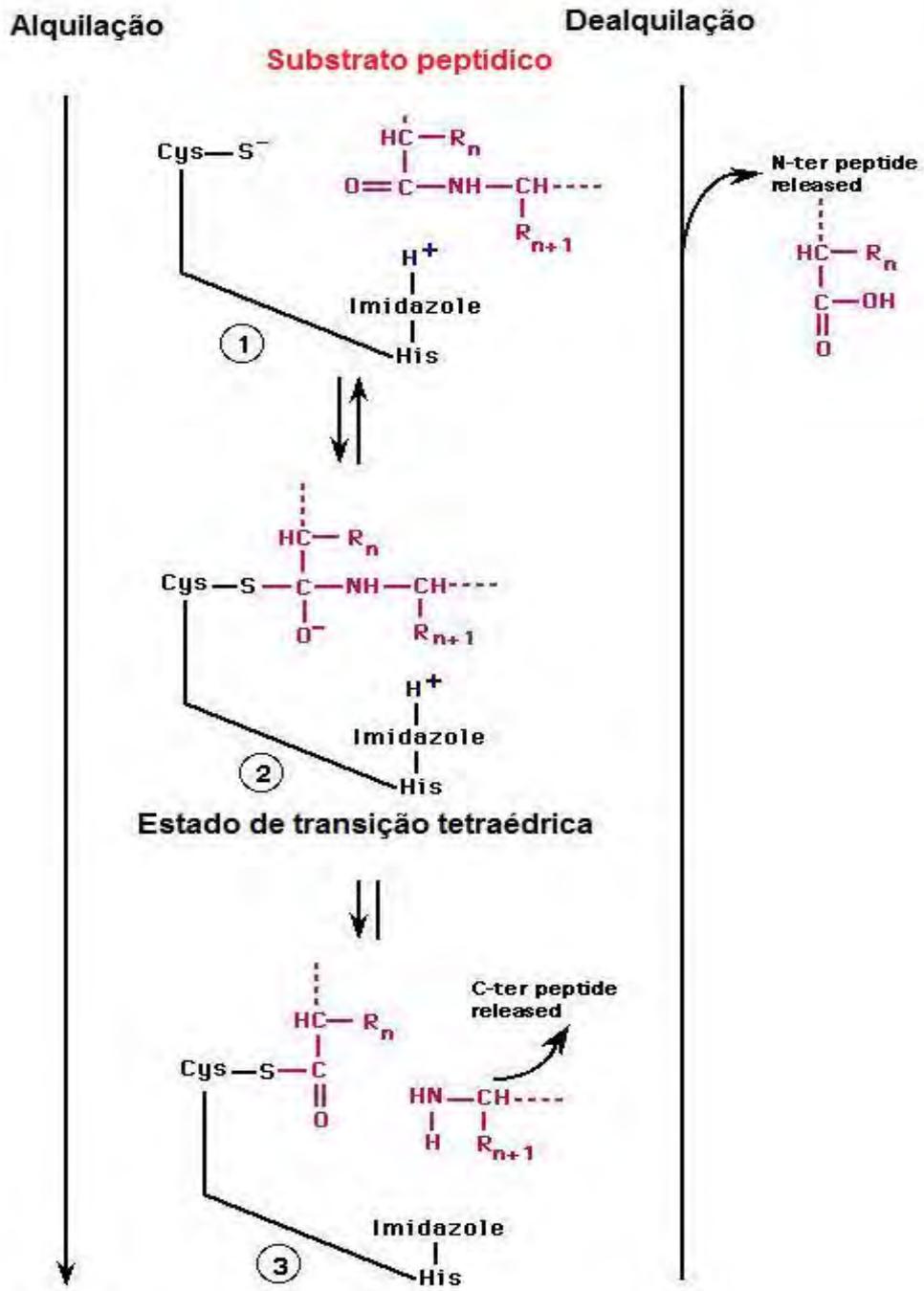


Figura 7. Mecanismo catalítico das cisteíno-proteínases, adaptado de (<http://delphi.phys.univ-tours.fr/Prolysis/introprotease.html>).

2.3.2 Funções das enzimas proteolíticas

As proteases (peptidases) de mamíferos desempenham um papel importante em vários processos tais como a diferenciação celular, agregação de plaquetas, morte celular (apoptose), degradação de proteínas danificadas ou de proteínas que já cumpriram sua finalidade, etc (MÉNARD, 1993). As peptidases estão envolvidas também no metabolismo através de modificação covalente de proteínas e pró-enzimas, com a digestão de proteínas de alimentos, a mobilização de proteínas para os tecidos, hormônios, e recentemente a descoberta dos proteossomas que estão envolvidos na degradação intracelular de proteínas em conjunto com a ubiquitina. O proteossoma é um arranjo polimérico de subunidades de peptidases que seletivamente hidrolisa proteínas como um mecanismo de regulação celular, onde proteínas marcadas por ubiquitina sofrem hidrólise pela proteossoma (GARCÍA-CARREÑO & DEL TORO, 1997).

2.3.3 Proteinases na interação parasito-hospedeiro

Pesquisas sobre proteinases têm sido estimuladas pela idéia que a proteólise tem um papel fundamental na interação parasito-hospedeiro. A atividade das proteinases em protozoários foi descrita desde 1902, mas somente recentemente, caracterizações mais detalhadas dos sistemas proteolíticos de protozoários têm sido feitas. (NORTH, 1982).

Numerosas proteinases são produzidas por microrganismos distintos, dependendo da espécie, ou mesmo por diferentes cepas de uma mesma espécie. As espécies oportunistas *Candida albicans* e *C. tropicalis*, de importância médica, causam infecções em pacientes imunocomprometidos por possuírem uma aspártico-proteinase extracelular, que é considerada seu principal fator de virulência. O vírus da imunodeficiência humana (HIV), agente etiológico da AIDS, apresenta também uma aspártico-proteinase essencial para o ciclo de vida do retrovírus, e que tem sido um excelente alvo para a quimioterapia desta doença, através do uso de inibidores específicos. A maioria das serino-proteinases comerciais, principalmente as alcalinas e neutras, são produzidas por organismos que pertencem ao gênero *Bacillus*. As subtilisinas são enzimas representantes deste grupo. Enzimas similares também são produzidas por outras bactérias, como por exemplo, *Thermus caldophilus*, *Desulfurococcus mucosus*, *Streptomyces* e pelos gêneros *Aeromonas* e *Escherichia*. Os fungos também produzem serino-proteinases; entre eles, estas enzimas são produzidas por várias cepas de *Aspergillus oryzae*. As cisteíno-proteinases não são encontradas tão amplamente como as serino- e as aspártico-proteinases (VERMELHO, 2006).

A superfície celular dos protozoários parasitos representa o primeiro contato com as células de seus hospedeiros, sendo também o local onde existem os fatores que proporcionam o sucesso da sua infecção. Em protozoários da família Trypanosomatidae, as proteinases são muito distribuídas, assim como as metalo-proteinases, já tendo sido detectadas em vários gêneros como *Crithidia*, *Phytomonas*, *Herpetomonas*, *Trypanosoma*, *Leishmania* e *Endotrypanum*. Neste grupo de microrganismos, estas enzimas estão envolvidas na nutrição, ciclo de vida e na diferenciação morfológica destes parasitos. A atividade das proteases em *Leishmania* foi descoberta há muitos anos, e é considerada como um indicador da diferenciação do parasita (MCKERROW et al., 1993; SAJID & MCKERROW, 2002). As quatro classes de proteases foram descritas em *Leishmania* spp. são: metalo-proteases, cisteíno-proteases, aspártico-proteases e serino- proteases, sendo que somente as metalo- e as cisteíno-proteinases foram localizadas na membrana plasmática, até o momento (DA SILVA-LOPEZ & GIOVANNI-DE-SIMONE, 2004; ALVES et al., 2005).

Leishmania spp. são conhecidas por expressar vários “fatores de virulência” no inseto vetor, entre elas as proteinases, que podem facilitar a transmissão e a infecção no hospedeiro vertebrado (PIMENTA *et al.*, 1992; SACKS *et al.*, 2000; SPATH *et al.*, 2003a; SPATH *et al.*, 2003b). *Trichomonas vaginalis*, protozoário flagelado responsável pela tricomoníase, uma das doenças sexualmente transmitidas mais comuns, apresenta algumas metalo-proteinases e uma cisteíno-proteinase que está envolvida com o dano causado pelo parasito. Entre as bactérias oportunistas, *Candida albicans* e *C. tropicalis*, de importância médica, causam infecções em pacientes imunocomprometidos por possuírem uma aspártico-proteinase extracelular, que é considerada seu principal fator de virulência (ALVAREZ-SANCHEZ *et al.*, 2000).

2.3.4 Aplicação das Proteases

Dentre a classe das hidrolases, as enzimas proteolíticas, hidrolisam ligações peptídicas. Apesar das proteases terem essa característica funcional comum, elas diferem acentuadamente no seu grau de especificidade (STRYER, 1996). Muitas cisteíno-proteinases vegetais têm sido descritas na literatura, como por exemplo, a papaína que foi isolada de frutos da *Carica papaya*, a ficina que foi isolada de diferentes espécies do gênero *Ficus* e as bromelinas encontradas no abacaxi e outras espécies da família Bromeliaceae (LOWE, 1976).

As proteases compreendem 50% das enzimas utilizadas industrialmente. Existem pesquisas substanciais para descobrir novas fontes de enzimas com propriedades para biotecnologia. Em particular temos peptidases termoestáveis de microorganismos mesofílicos e termofílicos, e enzimas de organismos marinhos ativas em baixas temperaturas, que por suas propriedades, podem ser objeto de modificação seletiva através da engenharia genética (GARCÍA-CARREÑO & DEL TORO, 1997). O uso de enzimas para modificar propriedades funcionais de proteínas tem uma promissora aplicação na indústria de alimentos. A grande vantagem do uso de enzimas comparado com outros agentes, inclui a sua especificidade e o fato de serem efetivas em baixas concentrações (MAHAJAN, 1998).

Muitas das enzimas são utilizadas na modificação de proteínas alimentares. A ação destas peptidases sobre esses substratos causa a hidrólise parcial da proteína, alterando assim suas propriedades funcionais, tais como: solubilidade, emulsificação, gelificação, viscosidade, hidratação, etc (MAHAJAN, 1998). As enzimas proteolíticas também podem ser utilizadas em processos de biotecnologia, tal como na extração de DNA de células de eucariotos (GEHELHU *et al.*, 1998). As enzimas proteolíticas do abacaxi, conhecidas com o nome geral de Bromelinas, têm tido ampla aplicação na indústria de alimentos, mas elas podem ser utilizadas também em indicações clínicas, tais como: agentes antitumorais, modulação imune, limpeza de feridas, aumento do efeito de antibióticos, ação mucolítica, ajuda na digestão, aplicações em doenças cardiovasculares e circulatórias, em procedimentos cirúrgicos e ferimentos da musculatura esquelética (COOREMAN *et al.*, 1976).

2.3.5 Proteinases como alvos quimioterápicos em doenças parasitárias

Proteases representam uma classe de enzimas com importantes papéis em processos fisiológicos. Além disto, elas possuem aplicação comercial, estando entre os três maiores grupos de enzimas industriais. Estas enzimas estão envolvidas em processos biológicos essenciais, como a coagulação sanguínea, morte celular e diferenciação de tecidos. Várias etapas proteolíticas importantes ocorrem no mecanismo invasivo de tumores, assim como no

ciclo de infecção de um grande número de vírus e microrganismos patogênicos. Estes fatos tornam as proteases um alvo quimioterápico valioso para o desenvolvimento de novos compostos farmacêuticos. As enzimas proteolíticas também participam no catabolismo de proteínas, tanto nas vias degradativas como nas biossintéticas, e na liberação de hormônios peptídeos farmacologicamente ativos a partir de proteínas precursoras. Certas modificações específicas e seletivas de proteínas durante a ativação de enzimas ocorrem via proteólise, que também colabora no transporte de proteínas secretórias na membrana (VERMELHO, 2006).

As enzimas proteolíticas compreendem cerca de 2% do total de proteínas presentes em todos os tipos de organismos, e várias dessas enzimas são de importância médica, algumas podem ser potencialmente utilizadas como alvo quimioterápico. Sendo divididas em peptidases endógenas, isto é, codificadas pelo organismo hospedeiro, e peptidases exógenas, ou seja, codificadas pelo agente causador da doença. Devido à existência de vários inibidores naturais das peptidases, dentre os quais alguns possuem valor terapêutico (BARRET et al., 2003).

Há necessidade de novas drogas para tratamento da malária, sendo que, as cisteíno-proteases de *Plasmodium*, oferecem novos alvos de quimioterapia potenciais. Inibidores da CPs bloqueiam a hidrólise de hemoglobina do parasita e seu desenvolvimento, indicando que as CPs exercem um papel fundamental na degradação da hemoglobina, uma função necessária para os trofozoítas eritrocíticos. Estes inibidores também bloqueiam a ruptura dos eritrócitos pelos parasitas maduros, sugerindo um papel adicional para CPs na hidrólise de proteínas do citoesqueleto do eritrócito. Recentes estudos mostraram que o repertório de CPs dos parasitas da malária é maior do que previamente estimado. *Plasmodium falciparum*, o mais virulento parasita da malária humana, expressa três proteases de CPs da família papaína, conhecido como falcipainas. Todas as três proteases são expressas por trofozoítas e hidrolisam a hemoglobina num pH ácido, sugerindo sua função neste processo. Falcipain-2 também hidrolisa “ankyrin” em pH neutro, sugerindo atividade adicional contra alvos do citoesqueleto eritrocitário. Foram identificados múltiplos ortólogos de falcipainas em outras espécies de plasmódios. Análise de ortólogos de parasitas do modelo animal em roedores identificou características semelhantes, mas algumas diferenças bioquímicas notáveis entre as CPs. Estas diferenças devem ser levadas em conta na interpretação de experiências in-vivo. Poucas moléculas de inibidores de CPs bloquearam a hidrólise da hemoglobina parasitária e seu desenvolvimento, os efeitos inibitórios contra os parasitas, geralmente estavam relacionados com a inibição da falcipain-2. Alguns compostos também foram eficazes em camundongos infectados com cepas de malária letais. As prioridades de pesquisa atuais são uma melhor caracterização dos papéis biológicos e bioquímicas das falcipainas. Juntamente, aos esforços para identificação de inibidores ótimos de falcipainas, alvos para produção de quimioterápicos antimaláricos (ROSENTHAL et al., 2002).

O estudo das caracterizações estruturais e funcionais detalhadas de proteases parasitárias têm levado a novas descobertas baseadas nesta fascinante maquinaria catalítica. A possibilidade do desenvolvimento de inibidores seletivos de proteases fundamentais para a interação parasito-hospedeiro, está sendo vigorosamente explorada como novas estratégias quimioterápicas (KLEMBA & GOLDBERG , 2002).

2.3.6 Proteinases descritas em dípteros

Serino-proteinases foram purificadas dos produtos de excreção e secreção de larvas de primeiro estágio de *Lucilia cuprina*, uma vez que o estabelecimento do parasitismo, ou seja, a penetração da larva na pele é facilitada através da secreção ativa pela larva de proteases que atuam na digestão da pele do hospedeiro e tecidos adjacentes, assim como, provém a nutrição das larvas na forma de proteínas digeridas da pele de ovinos, o que promove um rápido crescimento larvar (TELLAM et al., 1994). A purificação e caracterização de uma enzima “tripsina-like” com atividade fibrinolítica presente no abdômen da mosca-do-chifre, *Haematobia irritans* apresentou alta especificidade ao TAME (DAMETTO et al., 2000). Uma serino-proteinase com massa molecular de 23 kDa foi purificada do homogenado de larvas de *Hypoderma lineatum* (hypodermina B), que por sua composição de aminoácidos e seqüência N-terminal sugere homologia com as serino-proteinases da família tripsina e com duas outras serino-proteinases, hypodermina A e hypodermina colagenase, previamente isoladas dessas larvas (LECROISEY et al., 1983, LECROISEY & KEIL, 1985). Uma caracterização bioquímica preliminar, em larvas de *Oestrus ovis* utilizando gelatina-SDS-PAGE e análise da sensibilidade aos inibidores, demonstrou a presença de pelo menos seis principais serino-proteinases (massas moleculares de 20 a 100 kDa), principalmente “tripsina-like”, secretadas no tubo digestório das larvas (TABOURET et al., 2003). Proteinases também foram caracterizadas bioquimicamente e molecularmente em larvas de *Crysomya bezziana*, como pertencendo em sua maioria a família *TrypB*, a maior família das serino-proteinases, estando proximamente relacionada a tripsina de *Lucilia cuprina* mas, sendo distinta das tripsinas alfa e beta oriundas de *Drosophila melanogaster* (MUHARSINI et al., 2001).

Com base na literatura existente, diferentes espécies de dípteros que se alimentam como parasitas obrigatórios na fase larval apresentam serino-proteinases para a digestão de nutrientes protéicos. Sendo que, estas proteases digestivas podem divergir, pois vários tipos de larvas de dípteros apresentam hábitos alimentares diferentes. Em relação às proteinases das espécies de: *Dermatobia*, *Cuterebra* e *Cochliomya*, as serino-proteinases, devem ser predominantes também em *Cuterebra* e *Cochliomya*, embora possam existir diferenças dentro das famílias de serino-proteinases, como visto nas espécies *Crysomya bezziana*, *Lucilia cuprina*, *Hypoderma lineatum*, *Oestrus ovis* e *Drosophila melanogaster* (LECROISEY et al., 1983, LECROISEY & KEIL, 1985, MUHARSINI et al., 2001 e TABOURET et al., 2003).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção das larvas de segundo e terceiro estágios de *Dermatobia hominis*:

Para o desenvolvimento deste trabalho foram coletadas larvas de segundo e terceiro estágio de *D. hominis* da pele de bovinos recém abatidos nos matadouros ou em propriedades rurais do Rio de Janeiro, através de extração manual. Sendo estas larvas identificadas segundo, MOYA BORJA (1966).

3.2 Extração de proteína de larvas de *Dermatobia hominis*

Cerca de três larvas de cada estágio (L2 e L3) foram lavadas (3X) em água bidestilada e deionizada estéril. Posteriormente as larvas foram recuperadas em tampão de lise, {10 mM Tris-HCl pH 6.8, contendo 1% de CHAPS} volume de 10 mL, e trituradas em *Tissue Grinder* (Millipore Corporation, Bedfors, USA) a temperatura de gelo úmido. Finalmente, as proteínas solúveis foram recuperadas no sobrenadante pós centrifugação (30 000 x g, 60 minutos, 4°C) e mantidas a (- 70 °C) até o momento do uso.

3.3 Cromatografia em coluna de afinidade

A solução de proteínas obtida por extração com TX-100 foi submetida à centrifugação, e esta, foi aplicada na coluna (6,0 cm x 1,2 cm) de Aprotinina-agarose, devidamente empacotada e previamente equilibrada em 10 mM Tris- HCL pH 7,5 contendo 5 mM CaCl₂. O material não ligado foi recolhido e a coluna então foi lavada com tampão de equilíbrio, em um volume equivalente a 10 vezes o volume do leito da resina. Após a lavagem, as proteínas ligadas a Aprotinina-agarose foram eluídas com 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 contendo 1,5 M NaCl. Frações de 1 mL foram coletadas num fluxo de 0,2 mL/minuto. A eluição das proteínas foi acompanhada medindo-se a densidade óptica (D.O.) a 280nm em espectrofotômetro (Ultrospec 1100 pro; Amersham Biosciences, UK). Todas as etapas de cromatografia foram realizadas em câmara fria (4° C).

3.4 Cromatografia em coluna de DEAE-Sephacell

A fração obtida da coluna de afinidade, após concentração em filtros Centriprep 10 (Millipore) e diálise com tampão de equilíbrio (20 mM de Tris-HCl pH 7,2) foram aplicadas em uma coluna de DEAE-Sephacell (6,0 cm x 1,2 cm), devidamente empacotada. Após lavagem (dez vezes o volume da coluna) com o mesmo tampão as proteínas foram eluídas utilizando-se um gradiente linear de NaCl (0 – 500 mM) em tampão de equilíbrio. Frações de 1 mL foram coletadas num fluxo de 0,2 mL/minuto, em um volume final de 350 mL. A eluição das proteínas foi acompanhada medindo-se a D.O. a 280nm em espectrofotômetro (Ultrospec 1100 pro; Amersham Biosciences, UK). Todas as etapas de cromatografia foram realizadas em câmara fria (4° C).

3.5 Determinação da atividade de proteinase em solução com substratos peptídicos

Os ensaios de atividade enzimáticas foram realizados de acordo com ALVES et al., 2005. Resumidamente, a atividade enzimática foi avaliada em 5 µg de extrato total larvar, sendo resuspenso em tampão de ativação (volume final de 400 µL, 25 °C, 30 minutos). Os substratos cromogênicos usados foram: N-Cbz-PFHLLVYSNHNap (para aspártico-proteinases), em 10 mM acetato de sódio pH 3,5, com densidade óptica (D.O.) determinada a 340 nm; N-FALGPA (para metalo-proteinases), em 50 mM Tris-HCl pH 8,0 contendo 10 mM CaCl₂ e D.O. determinada a 283 nm; e, pEFLpNan (para cisteíno-proteinases), em 10 mM Tris-HCl pH 5,5 contendo 1 mM de DTT determinado a D.O. a 405 nm. Foram analisados três substratos cromogênicos para serino-proteinases: BAPNA (405 nm), BTNA (405 nm) e TAME (247 nm), em 10 mM Tris-HCl pH 7,5. Os ensaios de inibição foram realizadas com reagentes inibidores específicos a cada classe de proteinase: 100 µM E-64 (para cisteíno-proteinases), 10 µM o-phe (para metalo-proteinases), 10 µM pep A (para aspártico-proteinases), e 1 mM PMSF e 100 µM Bzn (ambos para serino-proteinases).

A variação da absorvância, de cada comprimento de onda, foi seguida durante 30 minutos e a velocidade da reação definida usando a fórmula $v = [s - so]/(t - to)$, onde v = velocidade, $[s - so]$ = concentração de substrato final subtraída da concentração de substrato inicial e $(t - to)$ = tempo final subtraído do tempo inicial. Os ensaios foram controlados verificando a auto-liberação dos conjugados cromogênicos nos mesmos intervalos de tempo. A atividade enzimática foi expressa em nmoles hora⁻¹ mg de proteína⁻¹.

3.6 Detecção de atividade para serino-proteinase em ensaios de cromatografia

O substrato peptídico TAME foi utilizado para verificar a atividade enzimática das frações eluídas da coluna de DEAE-Sephacell. Neste ensaio, cerca de 50 µL das frações eluídas foram incubadas com 450 µL de tampão 10 mM Tris-HCl pH 7,2 acrescido de mais 0,01 mM do substrato peptídico. Após incubação (37 °C, 15 minutos) as preparações foram mantidas no gelo (10 minutos) e a absorvância medida a 247 nm em espectrofotômetro (Ultrospec 1100 pro; Amersham Biosciences, UK). A atividade enzimática das frações foi expressa em nmoles de Ome minuto⁻¹.

3.7 Determinação do Km aparente para serino-proteinase nos extratos larvares

A constante de Michaelis-Menten (Km) aparente foi determinada utilizando-se o substrato cromogênico TAME. Neste ensaio, cerca de 5 µg dos extratos de proteína de L2 e L3 foram incubadas com tampão 10 mM Tris-HCl pH 7,2 acrescido de diferentes concentrações do substrato peptídico (0,01, 0,2, 0,5 e 1 mM) em uma volume final de 400 µL. Após incubação (37 °C, 30 minutos) as preparações foram mantidas no gelo (10 minutos) e a absorvância medida a 247 nm em espectrofotômetro (Ultrospec 1100 pro; Amersham Biosciences, UK). Os valores da atividade foram calculados pela fórmula $[S]/v$ contra $[S]$ (método de Hanes-Woolf) (MITIDIERI & AFFONSO, 1978). A atividade enzimática das frações foi expressa em nmoles de Ome minuto⁻¹.

3.8 Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

Os ensaios de SDS – PAGE foram realizados em condições de redução e usando o procedimento descrito por LAEMMLI (1970). Para os ensaios de eletroforese desnaturante, as amostras de proteínas e os marcadores de massa molecular SDS-6H foram previamente tratadas com tampão apropriado (v/v; 80 mM Tris HCl, pH 6,8; 2 % SDS; 12 % glicerol; 5 % β -mercaptoetanol e 0,05 % azul de bromofenol e fervidas por 3 minutos. Após a eletroforese (150V a 15mA), as proteínas foram coradas pelo método de impregnação pela prata (Gonçalves *et al*, 1990).

3.9 Ensaios de enzimografia

Os ensaios de enzimografia foram realizados em gel de SDS–PAGE contendo 0,1 % de gelatina copolimerizada com acrilamida (gelatina - SDS - PAGE), sem ferver as amostras (HEUSSEN & DOWDLE, 1980). Os ensaios de eletroforese foram conduzidos a temperatura do gelo úmido e posteriormente, os géis foram incubados com 2,5 % de TX-100 (v/v) por 1 hora, a temperatura ambiente, para remover o SDS. As proteases foram ativadas incubando-se os géis em estufa (37°C, 16 horas) em placas de *Petri* cotendo: 10 mL de 10 mM acetato de sódio (pH 3,5 e 5,5) e 10 mM fosfato de sódio (pH 7,5 e 9,0). O efeito de 10 μ M de PMSF foi observado após sua adição ao tampão de incubação. A atividade proteolítica foi revelada corando-se os géis por 60 minutos com azul de *Comassie* R-250 [0,2 % (p/v) em metanol: ácido acético: água (4 : 1 : 5)]. A descoloração foi realizada utilizando-se a mesma concentração dos reagentes sem corante. As regiões claras representam as áreas de digestão da gelatina (gelatinólise) pelas proteinases.

3.10 Determinação da concentração de proteínas

A concentração de proteínas foi determinada de acordo com o método de LOWRY *et al.*, 1951, usando albumina de soro bovino como padrão.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Proteínases de metazoários parasitas apresentam importantes funções biológicas. A possibilidade do desenvolvimento de inibidores seletivos para estas enzimas tem sido explorada com o intuito de novas estratégias quimioterápicas (SIMONET et al., 2002). As funções das proteínases foram demonstradas para reprodução, desenvolvimento, e defesa de seres vivos (GORMAN & PASKEWITZ, 2001). Porém, nenhuma proteínase foi descrita para *D. hominis*. Neste trabalho, a combinação de ensaios de proteínases em solução e imobilizadas em géis de poliácridamida foram usados na caracterização quantitativa e qualitativa de serino-proteínases deste ectoparasito.

Neste trabalho quantificamos a atividade enzimática de quatro classes de proteínase em larvas de *D. hominis*. O nível de detecção de metallo - e aspártico-proteínases nos extratos totais de L2 e L3 foi mais baixo que $0.1 \text{ nmoles hora}^{-1} \text{ mg de proteína}^{-1}$ (**Tabela 1**), enquanto que as atividades de cisteíno - e serino-proteínases foram mais facilmente detectadas em nossas condições experimentais.

As atividades de cisteíno-proteínase ácidas foram detectadas nos extratos totais de L2 e L3 (**Tabela 1**). Ambos os extratos de proteína mostraram atividade hidrolítica sobre o substrato pEFLpNan, que é específico para proteínases com grupo tiol no centro ativo das enzimas, como papaína (*Carica papaya*), ficina (*Ficus carica*) e bromelaína (*Ananas comosus*) (FILIPOVA et al., 1984). Ambas as atividades foram inibidas (L2 = 15% e L3 = 3%) por E-64, um reagente bloqueador de grupamentos tiol (**Tabela 2**).

A cisteíno-proteínase ácida detectada em ambos os extratos totais contrastam com estudos prévios, que sugeriam que a atividade desta classe de proteínase era geralmente observada a pH alcalino. Possivelmente, a atividade da cisteíno-proteínase em pH alcalino pode ser melhor detectada nas larvas de *D. hominis* com uso adicional de substratos sintéticos que sejam mais estáveis neste pH. Por outro lado, este achado pode revelar várias funções biológicas importantes de proteínases que contém tiol com atividade ótima em pH ácido durante a infestação da larva através da pele. É sabido que enzimas que hidrolisam o substrato pEFLpNan podem inibir a biossíntese de prostaglandinas pro-inflamatórias (TAUSSIG, 1980) e reduzir a eficiência da coagulação por afetar o fibrinogênio (LIVIO et al., 1978).

Ambas as preparações de proteínas larvares mostraram uma maior atividade de serino-proteínase quando comparada a atividade de cisteíno-proteínase, 39 vezes mais alto em L2 e 14 vezes mais alto em L3 (**Tabela 1**). O painel de peptídeos sintéticos analisado foi satisfatório para verificar a atividade de serino-proteínase, visto que os extratos de proteína preferencialmente hidrolisaram os substratos peptídicos que continham arginina na ligação éster, como no TAME demonstrando assim, a predominância da atividade esterásica na preparação de extratos totais de larvas.

As atividades dos extratos de L2 e L3 foram bem similares, alcançando $117 (\pm 24) \text{ nmoles hora}^{-1} \text{ mg de proteína}^{-1}$ e $111 (\pm 10) \text{ nmoles hora}^{-1} \text{ mg de proteína}^{-1}$, respectivamente. De forma interessante, somente a atividade de serino-proteínases de L3 - foi totalmente inibida por PMSF, enquanto foram inibidos só 10% desta atividade nos extratos de L2 (**Tabela 2**). As atividades enzimáticas dos extratos de L2 e L3 detectadas com TAME não foram inibidas por outros inibidores de serino-proteínase, como Bzn (**Tabela 2**). Estes dados sugerem que serino-proteínases das larvas de L2 e L3 de *D. hominis* podem ser uma serino-*like* diferente das serino-proteínases tripsina-*like*, como trombina e plasmina (SCHACHTER, 1980).

Adicionalmente, a detecção da atividade esterásica nos extratos totais de ambos estágios larvares foi confirmada determinando-se a constante cinética K_m aparente. Nestes ensaios foi possível determinar que o estágio L2 (7,59 mM) tem maior afinidade pelo TAME comparado ao estágio L3 (35,75 mM) (**Figura 9**).

Foi confirmada a presença da atividade de serino-proteinase em extratos totais de L2 e L3 por análise qualitativa, zimografia em gelatina-SDS-PAGE. O pH ótimo do ensaio mostrou que estas enzimas também têm propriedades catalíticas com substratos complexos, como gelatina sobre pH 7.5. Apesar de complexo e distinto (L2, 96 - 14 kDa e L3, 63 -21 kDa), o perfil das bandas de proteína detectadas em SDS-PAGE, depois de corados através de nitrato de prata (**Figura 10**), indicou que ambos estágios larvares têm semelhante (13 kDa e 22 kDa) e diferente (50 kDa em L2 e 30 kDa em L3) bandas de proteólise (**Figura 11**).

Nos ensaios de inibição estas bandas foram sensíveis a presença de PMSF, particularmente no extrato de L3 (**Figura 11**). Como a intensidade de inibição do PMSF foi diferente para as proteinases larvares de L2 e L3, é possível sugerir que as bandas de L3 com massa molecular de: 13 kDa, 22 kDa e 30 kDa são mais sensíveis à presença do PMSF que as bandas de L2 com 13 kDa, 22 kDa e 50 kD. Nossos resultados confirmam o perfil esperado de enzimas do tipo serino-proteinases de inseto que já foram descritas (HANZON et al., 2003; TELANG et al., 2005; GUPTA et al., 2005), também foi considerado que as massas moleculares diferentes de serino-proteinases foram resultantes da degradação de proteína. Em adição, este estudo sugere que as diferenças na sensibilidade para os inibidores possam significar que estas larvas têm serino-proteinases com distintas propriedades catalíticas. O uso de inibidores mais seletivos pode permitir a distinção da subdivisão de classes dos tipos de serino-proteinases.

No curso deste trabalho, nos propomos a isolar uma fração enriquecida de serino-proteinase presentes nos extratos de L3. A estratégia assumida consistiu na associação da coluna de troca iônica com uma coluna de afinidade de Aprotinina-agarose. Os resultados obtidos do fracionamento em coluna de DEAE indicaram que 95 % ($46 \text{ mg} \pm 2,0$) das proteínas aplicadas à coluna mantiveram-se adsorvidas na fase sólida após a etapa de lavagem. Estas proteínas foram recuperadas somente após a eluição com NaCl. A análise da atividade de serino-proteinase das frações desta coluna foram predominantemente na faixa de eluição de 40 mM a 175 mM de NaCl (**Figuras 12 e 13**).

Enquanto o perfil eletroforético analisado em SDS-PAGE de todo o fracionamento indicou um complexo perfil de banda, a análise das mesmas frações por gelatina-SDS-PAGE indicou a atividade de proteinase dessas frações na faixa de eluição de 40 mM a 175 mM de NaCl (**Figuras 13 e 14**). Estas frações com atividade esterásica foram reunidas e fracionadas em coluna de Aprotinina-agarose (**Figura 15**). Neste fracionamento, a partir da concentração média de proteínas ($17 \text{ mg} \pm 2,0$) foi possível obter cerca de $1,54 \text{ mg} \pm 0,04$ da fração com afinidade a agarose, significando um rendimento de aproximadamente 3,2 % em relação ao extrato total do fracionamento (**Tabela 3**). Esta fração revelou um perfil com múltiplas bandas em SDS-PAGE, corado pela prata, e apenas uma banda de atividade enzimática (50 kDa) que foi detectada em gel de gelatina-SDS-PAGE em pH 7,5 (**Figura 16**).

Curiosamente, esta banda de 50 kDa não foi inicialmente detectada nos extratos de L3 por gelatina-SDS-PAGE. Provavelmente esta enzima encontra-se em baixa expressão nestas larvas, só sendo possível detectá-la após concentração pelos métodos cromatográficos aplicados.

Além disso, nossos resultados relativos às serino-proteinases das larvas L2 e L3 de *D. hominis* refletem a eficiência do ataque nucleofílico do centro ativo destas enzimas para diferentes ligações peptídicas em solução alcalina como analisado com substratos com

múltiplas ou ligações peptídicas definidas. Muitos processos fisiológicos dependem de serino-proteinases que ativam proteínas específicas através da clivagem proteolítica (RAWLINGS & BARRETT, 1994). A detecção de atividade enzimática neste pH com substratos complexos é uma indicação da ação destas enzimas quando as larvas estão invadindo o tecido epitelial do hospedeiro, como proposto para outros modelos de parasitas em diversos processos, como na facilitação de invasão de tecidos do hospedeiro, digestão de proteínas do hospedeiro ou evasão de respostas imunes do hospedeiro (MARIKOWSKY et al., 1988, MCKERROW, 1989, MONROY et al., 1989, FISHELSON et al., 1992). Neste ambiente, é possível achar hemoglobina, soro-albumina e colágeno, todas essas podem ser hidrolisadas por estas proteinases. Além disso, a atividade catalítica máxima de várias serino-proteinases de invertebrados ocorrem próximo a pH alcalino (NAVEH et al., 2005) e estas enzimas podem regular várias respostas de proteção, inclusive a coagulação da hemolinfa, a síntese de peptídeo antimicrobiano e melanização de superfícies do patógeno que foram descritas em respostas imunes de mosquitos (GORMAN & PASKEWITZ, 2001).

A caracterização bioquímica das serino-proteinases larvares de *D. hominis* enriquece o conhecimento da fisiologia deste inseto e sua interação parasito-hospedeiro. A real função destas enzimas durante o ciclo biológico de *D. hominis* permanece obscura. Porém, a observação da atividade enzimática em gelatina em uma extensa faixa de pH pode sugerir que estas enzimas possam ser importantes em vários momentos do ciclo de vida do inseto. Assim, estudos adicionais são necessários para determinar o papel destas enzimas no ciclo biológico de *D. hominis*.

Nos dias de hoje, o controle da dermatobiose nos bovinos restringe-se ao controle químico, o que sabidamente, gera grandes impactos ambientais, resíduos no leite e dos seus derivados, além de problemas de resistência em relação aos medicamentos utilizados. Havendo, por consequência, uma grande necessidade do desenvolvimento de métodos de controle sustentáveis, que podem ser usados como uma alternativa para tratamentos químicos (MOYA-BORJA, 2003).

A principal função das serino-proteinases existentes no intestino e no material intestinal secretado pelas larvas de diversas espécies de dípteros, é sem dúvida, a digestão de nutrientes protéicos. As proteases digestivas podem divergir, pois vários tipos de larvas de dípteros apresentam hábitos alimentares diferentes. A expressão das serino-proteinases em outros tecidos sugere funções de remodelamento tecidual na fase de crescimento muito rápido das larvas. As enzimas envolvidas nesta última função podem ser esperadas como sendo mais conservadas, visto que o substrato tecidual destas deve ser o mesmo para muitas espécies (MUHARSINI et al., 2001).

Tabela 1: Atividades de Proteinases de extratos larvares de L2 e L3 em painel de peptídeos sintéticos.

Substratos	Atividade Específica	
	L2	L3
N-Cbz-PFHLLVYSNHNap (aspártico-proteinase)	< 0,1	< 0,1
N-FALGPA (metalo-proteinase)	< 0,1	< 0,1
PEFLpNan (cisteíno-proteinases)	3,0 ± 0,2	7,7 ± 0,1
BAPNA (serino-proteinase)	< 0,1	< 0,1
BTNA (serino-proteinase)	< 0,1	< 0,1
TAME (serino-proteinase)	117 ± 24	111 ± 10

A atividade enzimática específica das larvas L2 e L3 foi expressa em nmoles hora⁻¹ mg de proteína⁻¹. Os valores representam as médias dos três ensaios independentes.

Tabela 2: Atividade de inibidores de proteinases dos extratos das larvas L2 e L3.

Inibidores	Inibição da Atividade Específica (%)			
	L2		L3	
	Sp	Cp	Sp	Cp
Pep A (aspártico-proteinase)	0	0	0	0
o-phe (metalo-proteinase)	0	0	0	0
E-64 (cisteíno-proteinase)	0	15	0	3
PMSF (serino-proteinase)	90	0	100	0
Bzn (serino-proteinase)	0	0	0	0

A ação dos reagentes inibidores foi analisada com os substratos TAME (serino-proteinase-SP) e pEFLpNan (cisteíno-proteinase-CP). Os valores representam as médias de três ensaios independentes.

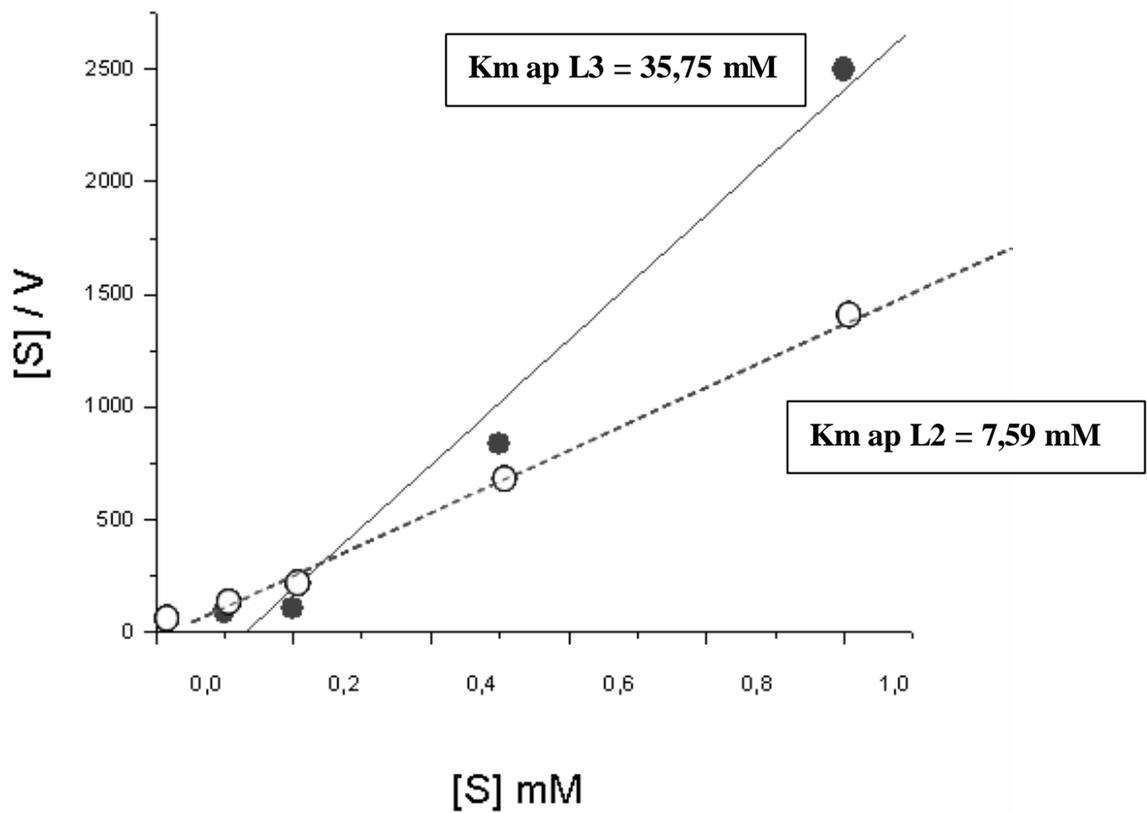


Figura 9. Atividade enzimática dos extratos larvares de L2 e L3 de *D. hominis* sobre substrato cromogênico TAME. Os gráficos foram estabelecidos plotando-se $[S] / V$ versus $[S]$ de acordo com Hanes-Woolf, para L2 (?) e L3 (?). Os valores representam as médias de três ensaios independentes.

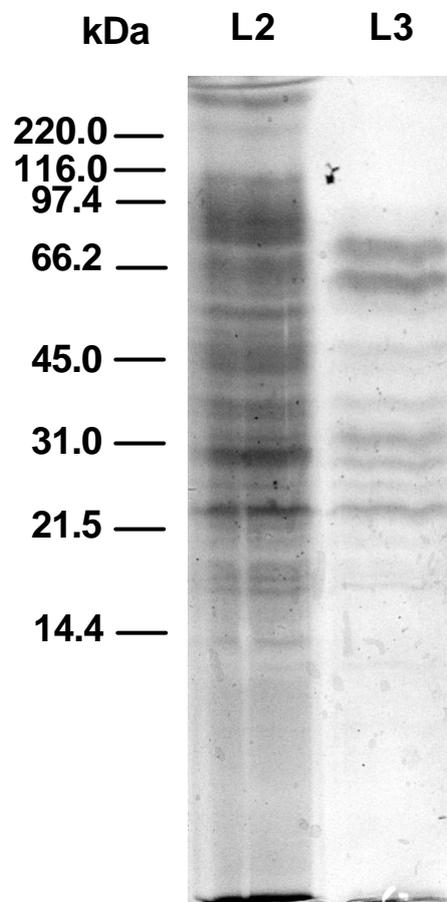


Figura 10. Perfil de proteínas das larvas de *Dermatobia hominis*. Extratos das larvas L2 e L3 (30 μ g) foram resolvidos em ensaios de eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE a 12%), sendo os géis corados por prata. Marcadores de massa moleculares são indicados (kDa). Estes resultados são representativos de dois ensaios independentes.

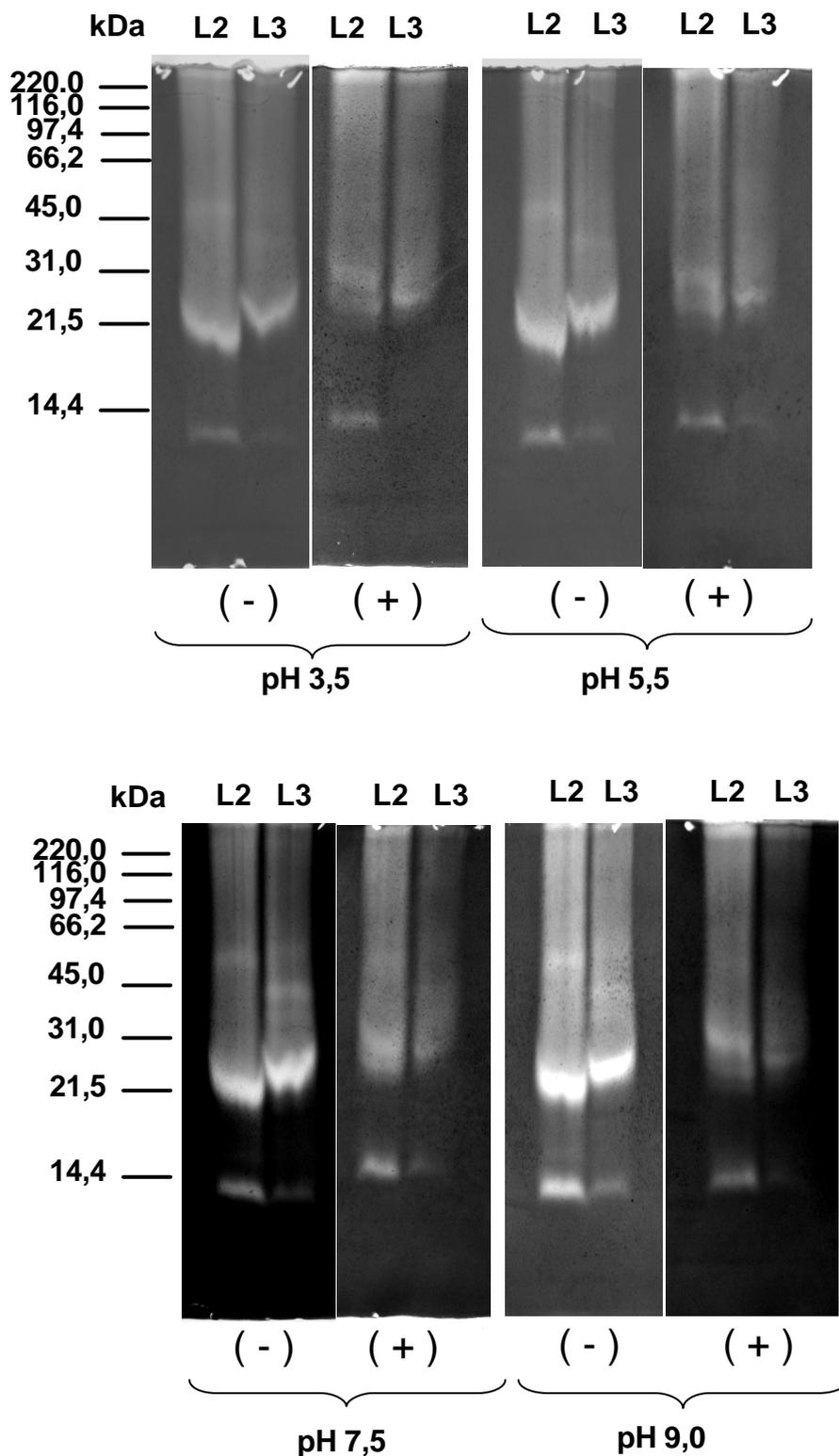


Figura 11. Atividade de Proteases larvares de *Dermatobia hominis* em gelatina-SDS-PAGE. Depois da eletroforese dos extratos larvares L2 e L3, (20 μ g) os géis foram incubados com 10mM de tampão acetato de sódio (pH 3,5 e 5,5) ou 10 mM de tampão fosfato (pH 7,5 e 9,0) na ausência (-) ou presença (+) de 10 mM de PMSF. As faixas de gelatinólises foram detectadas por coloração negativa. Marcadores de massa moleculares estão indicados (kDa). Estes resultados são representativos de três ensaios independentes.

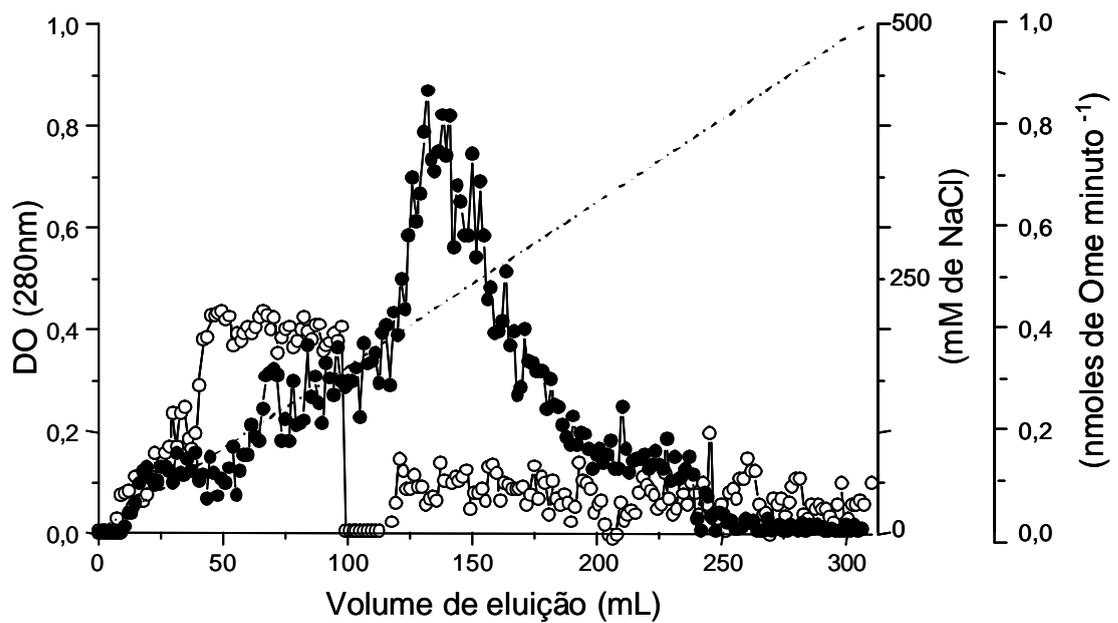


Figura 12. Fracionamento por cromatografia em DEAE-Sephacell das proteínas de L3 de *Dermatobia hominis*. As proteínas foram eluídas em um fluxo de 0,5 ml/min usando um gradiente linear de NaCl (0-500mM) em tampão 20mM de Tris-HCL (pH 7,2). A eluição das frações (1 ml) foi seguida verificando a absorvância a 280nm (?) e a atividade enzimática (nmols de Ome minuto⁻¹) determinada com TAME a 247 nm (?).

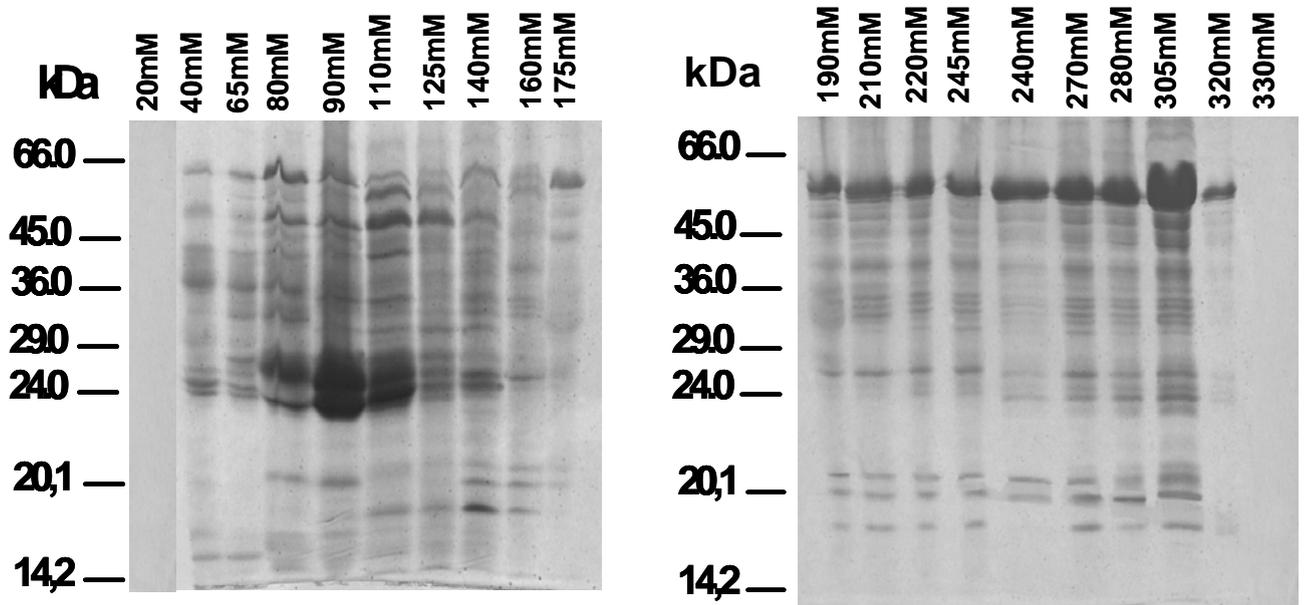


Figura 13. Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida das frações de L3 eluídas da coluna de troca iônica. Cerca de 30 μg de proteínas de cada fração da coluna de DEAE-Sephacell (20 mM – 330mM) foram resolvidas em SDS-PAGE (12%). Após a eletroforese as proteínas foram reveladas pela técnica de impregnação pela prata. Os números indicados a esquerda representam os valores dos marcadores de massa molecular (kDa).

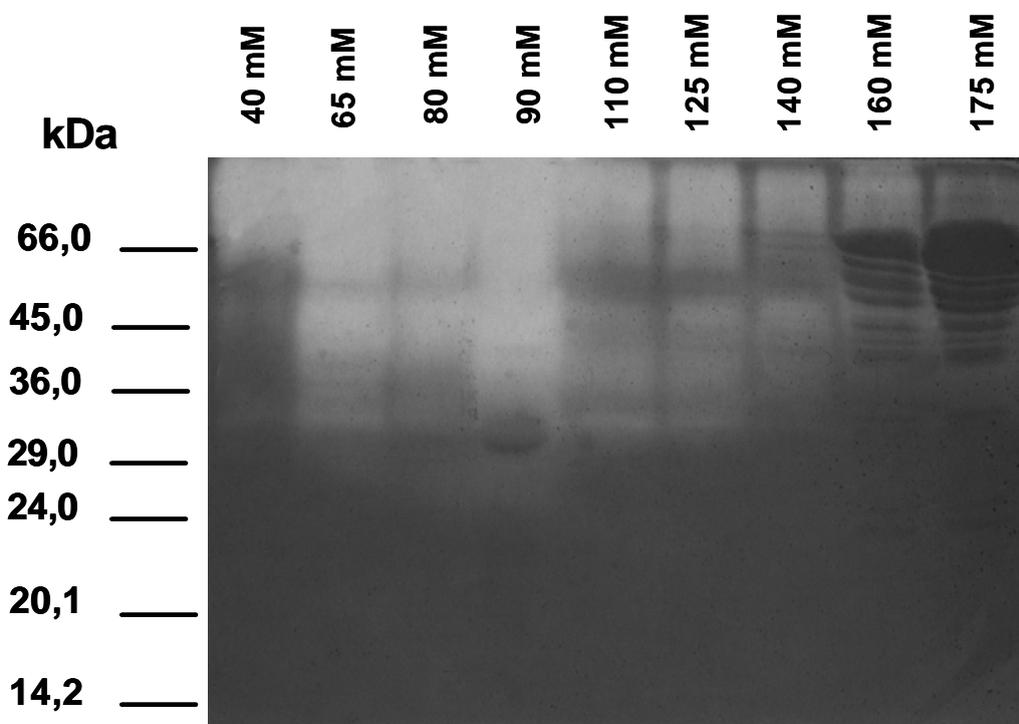


Figura 14. Enzimografia das frações com atividade esterásica eluídas da coluna de troca iônica. Cerca de 30 μg de proteínas de cada fração da coluna de DEAE-Sepharose (40 mM – 175 mM) foram resolvidas em gelatina-SDS-PAGE. Após a eletroforese os géis foram incubados (16 h) com tampão de ativação de serino-proteinase (10 mM fosfato de sódio pH 7,5) e em seguida, as proteases foram reveladas por coloração negativa. As faixas de gelatinólises foram detectadas por coloração negativa. Marcadores de massa moleculares estão indicados (kDa). Estes resultados são representativos de três ensaios independentes.

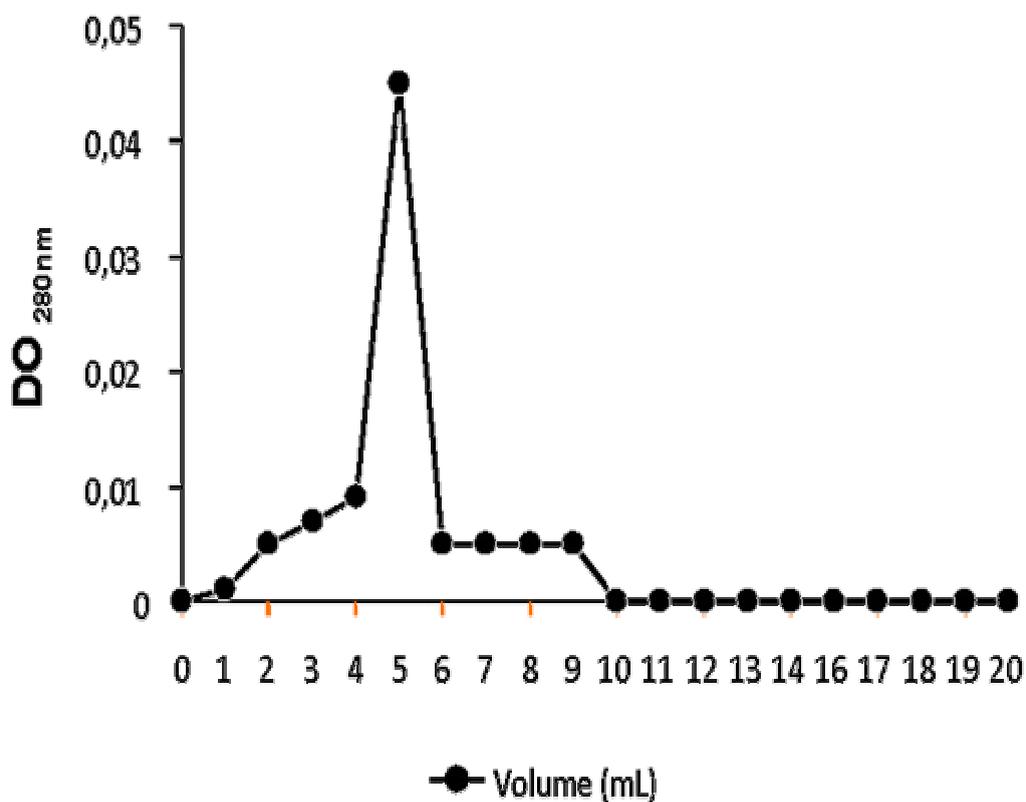


Figura 15. Cromatografia em Coluna de Aprotinina-agarose das proteínas com atividade esterásica de L3 eluídas da coluna de troca iônica. As frações da coluna de DEAE-Sephacell (40 mM – 175 mM) foram reunidas, concentradas e posteriormente na coluna de Aprotinina-agarose. A eluição foi seguida verificando-se a absorbância de 280 nm (•).

Tabela 3. Rendimento das etapas de fracionamento de serino-proteinase de L3.

Fração	Total de proteínas (mg)	Rendimento (%)
Extrato Total	48,00	100
DEAE-Sephacell	17,00	35,42
Aprotinina-Agarose	1,54	3,20

Pool das frações da coluna DEAE-Sephacell correspondente as concentrações de 40 mM a 175 mM de NaCl.

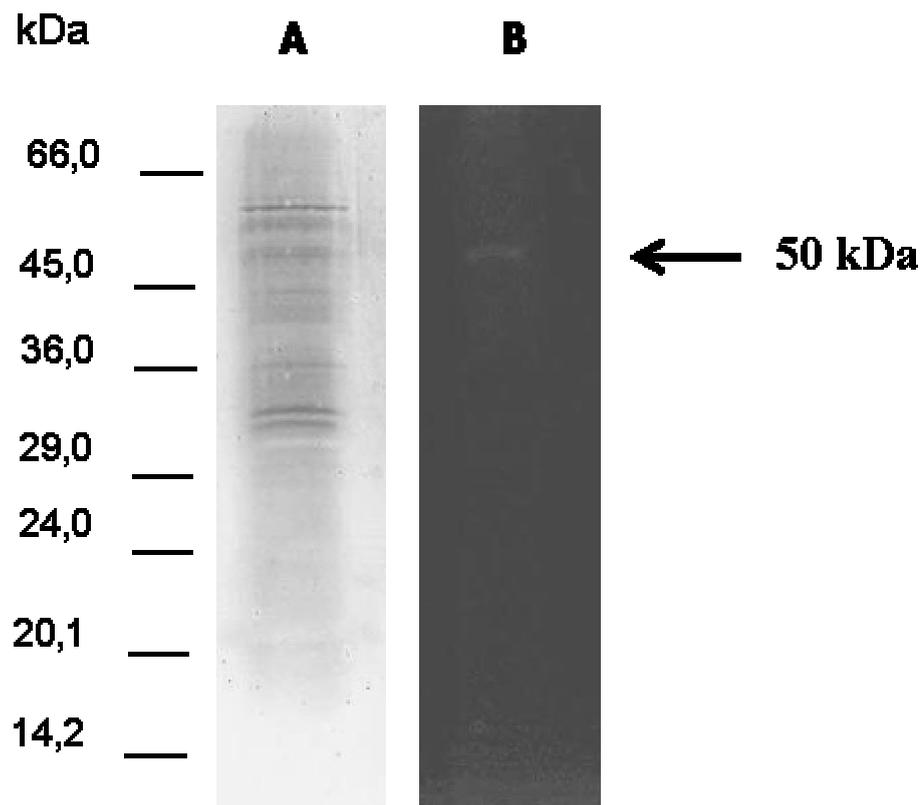


Figura 16. Análises por eletroforese das proteínas de L3 eluídas da coluna de Aprotinina-agarose. Cerca de 20µg da fração foi resolvida em SDS-PAGE (A) e gelatina- SDS-PAGE (B) e reveladas pela prata e por coloração negativa, respectivamente. Seta indica uma serino-proteinase de 50 kDa. Marcadores de massa moleculares estão indicados (kDa). Estes resultados são representativos de dois ensaios independentes.

5 CONCLUSÕES

- Em *D. hominis*, o perfil de proteínas e de proteinases do extrato larvar de L2 mostra-se mais complexo do que em L3, por eletroforese desnaturante;
- Os extratos larvares de L2 e L3 contém serino-proteinases similares (13 e 22 kDa) e distintas (50 kDa em L2 e 30 kDa em L3) massas moleculares;
- Em larvas de *D. hominis* o nível de detecção de metalo - e aspártico-proteinases nos extratos totais de L2 e L3 é mais baixo, enquanto que as atividades de cisteíno - e serino-proteinases são mais facilmente detectadas em nossas condições experimentais;
- As serino-proteinases são predominantemente detectadas nos extratos larvares de L2 e L3 de *Dermatobia hominis*, seguido das cisteíno-proteinases;
- A preferência de hidrólise sobre os substratos peptídicos contendo arginina na ligação éster, como o TAME, indicou a predominância da atividade esterásica nos extratos larvares de ambos estágios. Sendo que as serino-proteinase dos extratos de L2 apresentaram maior afinidade a este substrato do que L3; e
- A estratégia proposta para isolar serino-proteinase foi favorável a detecção de uma banda de 50 kDa no extrato larvar de L3, antes não detectada na análise direta deste extrato total por gelatina SDS-PAGE.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVAREZ-SANCHEZ, M.E.A., AVILA-GONZALEZ, L., BECERRIL-GARCIA, C., FATTEL-FACENDA, L.F., ORTEGA-LOPES, J. & ARROYO, R. A novel cysteine proteinase (CP65) of *Trichomonas vaginalis* involved in cytotoxicity. **Microbial Pathogenesis**, England, v. 28, p. 193-202, 2000.
- ALVES, C.R., CORTE-REAL, S., BOURGUIGNON, S.C., CHAVES, C.S., SARAIVA, E. M.- *Leishmania amazonensis*: early proteinase activities during promastigote-amastigote differentiation in vitro. **Experimental Parasitology**, United States, v.109, p. 38-48, 2005.
- BANEGAS, A.D., MOREIRA, H. & GRAHAM, O.H. - Laboratory colonization of *Dermatobia hominis* (Diptera: Cuterebridae). **Annals Entomological Society of America**. United States, v. 60, n. 3, p. 511-514, 1967.
- BARRETT, A.J., TOLLE, D.P., RAWLINGS, N.D. - Managing peptidases in the genomic era. **The Journal of Biological Chemistry**, United States, v. 384, p. 873-882, 2003.
- BARRETT, A.J.; RAWLINGS, N.D.; WOESSNER, J.F. **Handbook of Proteolytic Enzymes**, London, Academic Press, 1998. 1666p.
- BATES, M. Mosquitos as vectors of *Dermatobia hominis* in Colombia. **Annals Entomological Society of America**, United States, v. 36, p. 21-24, 1943.
- BAUMHOVER, A.H.. Eradication of the screwworm fly. An agent of myiasis. **Journal of the American Medical Association**, United States, v. 196, n. 3, p. 240-248, 1966.
- BEYNON, R.J.; BOND, J.S. **Proteolytic Enzymes-Practical Approach**. Oxford Press, *Second Edition, England*, 2001. 340p.
- BODE, W., HUBER, R. Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. **European Journal of Biochemistry**, England, v. 204, p. 433-451, 1992.
- BOUVIER, J, ETGES, R.J, BORDIER, C. - Identification and purification of membrane and soluble forms of the major surface protein of *Leishmania* promastigotes. **Journal of Biological Chemistry**, United States, v. 260, p. 15504-15509, 1985.
- CHAIA, G., MOYA BORJA, G.E., CHIARI, L., SANTOS, C.N. & ABREU, R.T.L. Experimental chemotherapy of dermatobiosis in laboratory animals. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. Brazil, v. 17, n. 5, p. 298-306, 1975.
- COOREMAN, W.M.; SCHARPÉ, S.; DEMEESTER, J.; and LAUWERS, A. Bromelian, biochemical and pharmacological properties. **Pharmaceutica acta Helvetiae**, Switzerland, v. 4, p. 73-97, 1976.
- COSTA, H.M.A. & FREITAS, M.G. Efeito do composto fosforado “DOWCO-109” (Narlene) administrado pela via oral, sobre a frequência de berne em bovinos. **Arquivo da Escola Técnica Superior de Veterinária da UFMG, Belo Horizonte, MG**. Brazil, v. 13, p. 145-156, 1961.
- CREIGHTON, J.T.; NEEL, W.W. Biología y combate del tórsalo o nucho, *Dermatobia hominis* (L. Jr.): **Resenha bibliográfica**, Turrialba, v. 2, n. 2, p. 59-65, 1952.

- CUNNINGHAM, E.P. Summary of New world Screwworm. Response to an emergency. **World Animal Review**, United States (Special Issue) p. 50-52, 1991.
- DA SILVA JUNIOR, VIRGINIO PEREIRA, DE SOUZA LEANDRO, ANDRÉ & MOYA BORJA, GONZALO EFRAIN. Ocorrência do Berne, *Dermatobia hominis* (Diptera: Cuterebridae) em vários hospedeiros, no Rio de Janeiro-Brasil. **Parasitología al día**, Chile, v. 22, n. 3-4, p. 97-101, 1998.
- DA SILVA-LOPEZ, R.E., GIOVANNI-DE-SIMONE, S. *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: purification and characterization of a promastigote serine protease. **Experimental Parasitology**, United States, v. 107, p. 173-182, 2004.
- DAMETTO, M., DAVID, A.P., AZZOLINI S.S., CAMPOS, I.T., TANAKA, A.M., GOMES, A., ANDREOTTI, R., TANAKA, A.S. Purification and characterization of a trypsin-like enzyme with fibrinolytic activity present in the abdomen of horn fly, *Haematobia irritans irritans* (Diptera: Muscidae). **Journal of Protein Chemistry**, United States, v.19, n.6, p.515-521, 2000.
- DURIGHETTO, J.R., A.F.; MACHADO, M.I.; FAVORETO, J.R., S. & MAGALHÃES, A.O. Míases orais: aspectos clinico-laboratoriais de um caso humano. **Revista de Odontologia Brasileira**, Brasil, v.5, p.19-22, 1995.
- FILIPPOVA, I.Y., LYSOGORSKAYA, E.N., OKSENOIT, E.S., RUSENSKAYA, G.N., STEPANOV, V.M. L-Pyroglutamyl-L-phenylalanyl-L-leucine-p-nitroanilide. A chromogenic substrate for thiol proteinase assay. **Analytical Biochemistry**, United States, v.143, p.293-297, 1984.
- FISHELSON, Z., AMIRI, P., FRIEND, D.S., MARIKOWSKY, M., PETITT, M., NEWPORT, G., MCKERROW, J.H. - *Schistosoma mansoni*: cell-specific expression and secretion of a serine protease during development of cercariae. **Experimental Parasitology**, United States, v.75, p.87-98, 1992.
- GARCIA, S.H.; VISCIARELLI, E.C.; MENA, F.; GABBARINI, M.; PEREZ, S.; LUCCHI, L. & COSTAMAGNA, S.R. Un caso de miasis humana por *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel, 1858) (Diptera, Calliphoridae) en Bahía Blanca, **Entomologia y Vectores**, Argentina, v. 9, p. 591-597, 2002.
- GARCIA-CARRENO, F. L.; DEL TORO, M. N. Classification of Proteases without Tears. **Biochemical Education**, England, v. 25, n. 3, p.161-167, 1997.
- GEHELHU, M.S.; ZANINI, M. S.; VELOSO, I. F.; CARNEIRO, A. M. D.; LOPES, M. T. P.; SALAS, C. E. - Use of a cysteine proteinase from *Carica candamarcensis* as a protective agent during DNA extraction. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Brasil, v. 31, n. 9, p. 1129-1132, 1998.
- GORMAN, M.J., PASKEWITZ, S.M. Serine proteases as mediators of mosquito immune responses. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, England, v. 31, p. 257-262, 2001.
- GRAHAM, O.M. Symposium on eradication of the screwworm from the United States and Mexico. **Entomological Society of America**, United States, 68 p. 1985.
- GRISI, L., MASSARD, C.L., MOYA BORJA, G.E. & PEREIRA, J.B. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. **Hora Veterinária**, Brasil, v. 21, n. 125, p. 8-10, 2002.

- GUIMARÃES, J.H. & PAPAVERO, N. A tentative annotated bibliography of *Dermatobia hominis* (Linnaeus Jr., 1781)(Diptera:Cuterebridae). **Arquivo Zoologia do Estado de São Paulo**, Brasil, v. 14, n. 4, p. 223-294, 1966.
- GUIMARÃES, J.H. & PAPAVERO, N. **Myiasis In Man And Animals in The Neotropical Region**, São Paulo, Editora Plêiade, Brasil, 1999, 308p.
- GUPTA, S., WANG, Y., JIANG, H. Purification and characterization of *Manduca sexta* prophenoloxidase-activating proteinase-1, an enzyme involved in insect immune responses. **Protein Expression and Purification**, United States, v. 39, p. 261–268, 2005.
- HALL, M. & WALL, R. Myiasis of humans and domestic animals. **Advances in Parasitology**, England, v. 35, p. 257-334, 1995.
- HALL, M.J.W. & SMITH, K.G.V. Diptera causing myiasis in man. In: Lane RP, Crosskey RW, editors. London: Chapman & Hall, **Medical Insects and Arachnids**, England, p. 429-469, 1995.
- HANZON, J., SMIRNOFF, P., APPLEBAUM, S.W., MATTOO, A.K., BIRK, Y. Thiol-activated serine proteinases from nymphal hemolymph of the African migratory locust, *Locusta migratoria migratorioides*. **Archives of biochemistry and biophysics**, United States, v. 410, p. 83–88, 2003.
- HARWOOD, R.F. & M.T. JAMES. **Entomology In Human And Animal Health**, 7th ed., New York. Macmillan Publishing Co., United States, 1979, 548p.
- HEUSSEN, C. & DOWDLE, E.B. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. **Analytical Biochemistry**, United States, v. 102, p. 196–202, 1980.
- JAMES, M.T. The flies that cause myiasis in man. **United States Department of Agriculture**, United States, v. 631, p.1-175, 1947.
- KLEMBBA, M. & GOLDBERG, D.E. Biological Roles of Proteases in parasitic protozoa. **Annual Review of Biochemistry**, United States, 71:275–305, 2002.
- LAEMMLI, U.K. *Cleavage* of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, England, v. 227, p. 680–685, 1970.
- LANE, R.P., LOVELL, C. R., GRIFFITHS, W. A. D., SONNEX, T. S. Human cutaneous myiasis-a review and report of three cases due to *Dermatobia hominis*. **Clinical and Experimental Dermatology**, England, v. 12, p. 40-45, 1987.
- LECROISEY, A. & KEIL, B. Specificity of the collagenase from the insect *Hypoderma lineatum*. **European Journal of Biochemistry**, England, v. 152, p.123-130, 1985.
- LECROISEY, N.T. TONG & KEIL, B. Hypodermin B, a trypsin-related enzyme from the insect *Hypoderma lineatum*. Comparison with hypodermin A and Hypoderma collagenase, two serine proteinases from the same source. **European Journal of Biochemistry**, England, v. 134, p.261-267, 1983.
- LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**. 2 ed. Sarvier, São Paulo, Brasil, 1995, 839 p.

- LIVIO, M., BERTONI, M.P., DE GAETANO, G., DONATI, M.B. Effect of bromelain on fibrinogen level, prothrombin complex factors and platelet aggregation in Prostaglandin and in the rat. **Drugs under Experimental and Clinical Research**, Switzerland, v. 4, p.49–53, 1978.
- LOBO, G. & ZELEDÓN, R. Algunos aspectos sobre la pupación de *Dermatobia hominis* (L. Jr.) (Diptera: Cuterebridae). **Turrialba**, Costa Rica, v. 34, n. L, p.1-8, 1984.
- LOMBARDERO, O.J. & FONTANA B.A.J. La “ura” (*Dermatobia hominis*) en la provincia de Formosa. **Gaceta Veterinaria**, Argentina, v. 30,n. 215, p. 297-306, 1968.
- LOWE, G. The Cysteine Proteinases. **Tetrahedron**, England, v. 32, p. 291-302, 1976.
- LOWRY, O.H., ROSEBOUGH, N.J., FARRA, L., RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of biological chemistry**, United States, v. 193, p. 265–275, 1951.
- MAGALHÃES F.E.P. & LIMA J.D. Frequência de larvas de *Dermatobia hominis* (Linnaeus, Jr. 1781), em bovinos de Pedro Leopoldo, Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Brasil, v. 40, n. 5, p. 361-367, 1988.
- MAGALHÃES, F.E.P. & LESSKIU, C. Efeito do controle do berne sobre o ganho de peso e qualidade dos couros em novilhos de corte. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasil, v. 17, n. 2, p. 329-326, 1982.
- MAHAJAN, A. & DUA, S. Improvement of functional properties of rapeseed (*Brassica campestris* var toria) meal by reducing antinutritional factors employing enzymatic modification. **Food Hydrocolloids**, England, v. 12, p. 349-355, 1998.
- MAIA, A.A.M. & GUIMARÃES, M.P. Distribuição sazonal de larvas de *Dermatobia hominis* (Linnaeus Jr., 1781) (Diptera: Cuterebridae) em bovinos de corte da região de Governador Valadares - Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Brasil, v. 37, n. 5, p. 469-475, 1985.
- MARCONDES, C.B. **Entomologia Médica e Veterinária**. Editora Atheneu, São Paulo, Brasil, 2001, 432p.
- MARIKOWSKY, M., FISHELSON, Z., ARNON, R. Purification and characterization of proteases secreted by transforming *Schistosoma mansoni*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Netherlands, v. 30, p. 45–54, 1988.
- MATEUS, G. *Dermatobia hominis* and its life cycle. **Revista Instituto Colombiano de Agropecuaria**, Colombia, v. 2, p.3-19, 1967.
- MCCONNELL, R., & HRUSKA, A.J. An epidemic of pesticide poisoning in Nicaragua: implications for prevention in developing countries. **American journal of public health**, United States, v. 83, p. 1559-1662, 1993.
- MCKERROW, J.H. Development of cysteine protease inhibitors as chemotherapy for parasitic diseases: insights on safety, target validation, and mechanisms of action. **International Journal for Parasitology**, England, v. 29, p. 833-837, 1999.
- MCKERROW, J.H. Parasite proteinases. **Experimental Parasitology**, United States, v. 68, p. 111-115, 1989.

MCKERROW, J.H., SUN, E., ROSENTHAL, P.J., BOUVIER, J. The proteases and pathogenicity of parasitic protozoa. **Annual review of microbiology**, United States, v. 47, p. 821-853, 1993.

MÉNARD, R. Structure-function studies in the papain family of cysteine proteases. **Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science**, Brasil, v. 45, n. 5, p. 292-298, 1993.

MITIDIARI, E. & AFFONSO, M.O.R. **Problemas e Exercícios em Bioquímica**. Editora: Interciência. Brasil, 1978, 380 p.

MONROY, F.G., CAYZER, C.J.R., ADAMS, J.H., DOBSON, C. Proteolytic enzymes in excretory-secretory products from adult *Nematospiroides dubius*. **International Journal for Parasitology**, England, v. 19, p.129–131, 1989.

MOTTRAM, J.C., FRAME, M.J., BROOKS, D.R., TETLEY, L., HUTCHISON, J.E., SOUZA, A.E., COOMBS, G.H. The multiple cpb cysteine proteinase genes of *Leishmania mexicana* encode isoenzymes that differ in their stage regulation and substrate preferences. **The Journal of Biological Chemistry**, United States, v. 272, n. 22, p. 14285-14293, 1997.

MOYA BORJA, G. E. Erradicação ou Manejo Integrado das Miíases Neotropicais das Américas? Tópico de Interesse Geral **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Brasil, v. 23, n. 32, p. 131-138, 2003.

MOYA BORJA, G. E. **Estudios sobre la biología, morfología y esterilización del torsalo, Dermatobia hominis (L. Jr.)**. 1966, 63 p. Dissertação (Tese M.S., Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la OEA). Centro de Enseñanza e Investigación. Turrialba, Costa Rica, 1966.

MOYA BORJA, G.E. Effects of *Macrocheles muscadomesticae* (Scopoli) on sexual behavior and longevity of *Dermatobia hominis* (L.Jr.) **Revista Brasileira de Biologia**, Brasil, v. 41, n. 2, p. 237-241, 1981.

MOYA BORJA, G.E. O Berne: Biologia, Comportamento e Controle. **Agroquímica**, Brasil, v. 17, p. 19-26, 1982.

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 Biochemistry and Molecular Biology**, England, v. 31, n.11, p.1029-1040, 2001.

NAVEH, V.H., BANDANI, A.R., AZMAYESHFARD, P., HOSSEINKHANI, S. Digestive proteinase activity of the Khapra beetle, *Trogoderma granarium* Everts (Coleoptera: Dermestidae). **Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences**, Belgium, v. 70, p. 879-882, 2005.

NEEL, W.W.; URBINA, O.; VIALE, E.; ALBA, J. Ciclo Biológico Del Torsalo *Dermatobia hominis*, L. Jr., en Turrialba. **Turrialba**, Costa Rica, v. 5, n. 3, p. 91-104, 1955.

NEIVA, A. & GOMES, J.F. - Biologia da mosca do berne (*Dermatobia hominis*) observada em todas a suas fases. **Anais Paulistas de Medicina Cirúrgica**, Brasil, v. 8, n. 9, p.197-209, 1917.

NORTH, M. J. Comparative Biochemistry of the proteinases of eukaryotic Microorganisms. **Microbiological Reviews**, United States, v. 308, p.340, 1982.

- NORTH, M.J., MOTTRAM, J.C. & COOMBS, G.H. Cysteine proteinases of parasitic protozoa. **Parasitology Today**, England, v. 6, p. 270-275, 1990.
- OTRANTO, D. & STEVENS, J.R. Molecular approaches to the study of myiasis-causing larvae. **International Journal for Parasitology**, England, v. 32, n. 11, p.1345-1360, 2002.
- PATTON, W.S. Notes on the myiasis-producing Diptera of man and animals. **Bulletin of Entomological Research**, England, v. 12, p. 239-261, 1922.
- PIMENTA, P.F, TURCO, S.J, MCCONVILLE, M.J., LAWYER, P.G., PERKINS, P.V., SACKS, D.L. Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to the sandfly midgut. **Science**, United States, v. 256, p. 1812-1815, 1992.
- RAWLINGS, N.D. & BARRETT, A.J. Families of serine peptidases. **Methods in Enzymology**, United States, v. 244, p. 19-61, 1994.
- REDI, F. *Experimenta circa generationem insectorum* and *Carol. Dati*, **Amstelodami**. Italy, 1671.
- REICHARD, R.E. Area-wide biological control of disease vectors and agents affecting wildlife. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, France, v. 21, n. 1, p. 179-185, 2002.
- REY, L. **Bases da Parasitologia Médica**. Rio de Janeiro: 2.a edição, Guanabara Koogan, Brasil, 2002, 379 p.
- ROSENTHAL, P.J.; SIJWALI, P.S.; SINGH, A.; SHENAI, B.R. Cysteine Proteases of Malaria Parasites: Targets for Chemotherapy. **Current Pharmaceutical Design**, Netherlands, v. 8, n. 18, p. 1659-1672, 2002.
- SACKS, D.L, MODI, G., ROWTON, E., SPATH, G., EPSTEIN, L., TURCO, S.J., BEVERLEY, S.M. The role of phosphoglycans in *Leishmania*-sand fly interactions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, United States, v. 97, p. 406-411, 2000.
- SAJID, M. & MCKERROW, J.H. Cysteine proteases of parasitic organisms. **Molecular and biochemical parasitology**, Netherlands, v. 20, p. 1-21, 2002.
- SANAVRIA, A., GUIMARAES BARBOSA, C., E. S. BEZERRA, M. C. MORAIS, P. C. GIUPPONI. Distribuição e frequência de larvas de *Dermatobia hominis* (Linnaeus Jr., 1781) (Diptera: Cuterebridae) em peles de bovinos. **Parasitología latinoamericana**, Chile, v. 57, p. 21 - 24, 2002.
- SANCHO, E. *Dermatobia*, The Neotropical Warble Fly. **Parasitology Today**, England, v. 4, n. 9, 1988.
- SCHACHTER, M. Kallikreins (kininogenases)-a group of serine proteases with bioregulatory actions. **Pharmacological Reviews**, United States, v. 31, p. 1-17, 1980.
- SCHNEIDER, P., ROSAT, J.P., BOUVIER, J., LOUIS, J., BORDIER, C. *Leishmania major*: differential regulation of the surface metalloprotease in amastigote and promastigote stages. **Experimental Parasitology**, United States, v. 75, p. 196-206, 1992.

- SILVA JUNIOR, V.P., LEANDRO, A.S., BORJA, G.E.M. Ocorrência do Berne, *Dermatobia Hominis* (Diptera: Cuterebridae) em vários hospedeiros no Rio de Janeiro, Brasil. **Parasitología al día**, Chile, v. 22, p. 97-100, 1998.
- SILVA JUNIOR, V.P., MOYA BORJA, G.E. & LEANDRO, A.S. Duration and viability of the larval instars of *Dermatobia hominis* (Diptera: Cuterebridae) in bovines. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Brasli, v. 8, n. 2, p. 103-106, 2002.
- SIMONET, G., CLAEYS, I., VANDEN BROECK, J. Structural and functional properties of a novel serine protease inhibiting peptide family in arthropods. **Comparative Biochemistry and Physiology**, England, v. 132, p. 247–255, 2002.
- SNOW, J.W., WHITTEN, C.J., SALINAS, A., FERRER, J., SUDLOW, W.H. The screwworm, *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae), in Central America and proposed plans for its eradication south to the Darien Gap in Panama. **Journal of medical entomology**, United States, v. 22, n. 4, p. 353-360, 1985.
- SPATH, G.F., GARRAWAY, L.A., TURCO, S.J., BEVERLEY, S.M. The role(s) of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of *Leishmania major* infections in mammalian hosts. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, United States, v. 100, p. 9536-9541, 2003a.
- SPATH, G.F., LYE, L.F., SEGAWA, H., SACKS, D.L., TURCO, S.J., BEVERLEY, S.M. Persistence without pathology in phosphoglycan-deficient *Leishmania major*. **Science**, United States, v. 301, p. 1241-1243, 2003b.
- STEPHAN, A. & FUENTEFRÍA, N.B. Mifase Oral: Parasita versus hospedeiro. **Revista da Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas**, Brasil, v. 53, p. 47-49, 1999.
- STRYER, L. **Bioquímica**, 4ªed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brasil, 1996, 1000p.
- TABOURET, G.L., BRET-BENNIS, PH. DORCHIES, PH. JACQUIET. Serine protease activity in excretory–secretory products of *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae) larvae. **Veterinary Parasitology**, United States, v. 114, n. 4, p. 305-314, 2003.
- TAUSSIG, S.J. The mechanism of the physiological action of bromelain. **Medical Hypotheses**, Scotland, v. 6, p. 99-104, 1980.
- TELANG, M.A., GIRI, A.P., SAINANI, M.N., GUPTA, V.S. Characterization of two midgut proteinases of *Helicoverpa armigera* and their interaction with proteinase inhibitors. **Journal of Insect Physiology**, England, v. 51, p. 513–522, 2005.
- TELLAM, R.L., C.H. EISEMANN, R. D. Pearson. Vaccination of sheep with purified serine proteases from the secretory and excretory material of *Lucilia cuprina* larvae. **International Journal for Parasitology**, England, v. 24, n. 5, p. 757-764, 1994.
- VERMELHO, A. B. **Proteases**. Disponível na Internet via WWW. URL: <http://www.protease.ufrj.br/ProteaseApres.html>. Arquivo acessado em 15 de dezembro de 2006.
- VOET, D. & VOET, J. G. **Biochemistry**. 2ªed. New York: Jonh Wiley & Sons, United States, 1995, 1360p.
- WERBOVETZ, K.A. Promising therapeutic targets for antileishmanial drugs. **Expert opinion on therapeutic targets**, England, v. 6, n. 4, p. 407-22, 2002.

WHITAKER, J. R. **Principles of enzymology for food sciences**. Marcel Dekker Inc. New York, Unites States, 1972, 636p.

ZAPATA, M.A.L., SANTAMARÍA, R.M.M., ALVAREZ, I.M., MULLER, U. Organochlorine pesticide residues in cow's milk, Nicaragua. **Boletín De La Oficina Sanitaria Panamericana**, United States, v. 120, p. 483-490, 1996.

ZUMPT, F. **Myiasis in man and animals in the Old World**. London, Butterworths, England, 1965, 267p.

7 ANEXO

Publicação em revista indexada

PIRES, F.A., MOYA-BORJA, G.E., BARREIRA, J.D., PINHO, R.T., ALVES, C.R. The main proteinases in *Dermatobia hominis* second and third instars larvae are serine-proteinases. **Veterinary Parasitology**, Netherlands, v. 145, n. 3-4, p. 326-331, 2007.



The main proteinases in *Dermatobia hominis* second and third instars larvae are serine-proteinases

F.A. Pires^{a,c}, G.E. Moya-Borja^c, J.D. Barreira^c, R.T. Pinho^b, C.R. Alves^{a,*}

^a Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Av. Brasil 4365, CEP 21.045-900, Marquês, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^b Departamento de Imunologia, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Av. Brasil 4365, CEP 21.045-900, Marquês, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^c Departamento de Parasitologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Br 465, Km 7, CEP 23.890-000, Seropédica, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Received 14 September 2006; received in revised form 27 December 2006; accepted 2 January 2007

Abstract

We performed a combination of proteinase assay, either in solution or immobilized in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel copolymerized with gelatin, to detect and quantify proteinases of *Dermatobia hominis* second (L2) and third (L3) instar larvae. In the quantitative assay, we examined proteinase activity by hydrolysis of a panel of peptide bonds specific for the main proteinase classes. We verified that the pGlu-Phe-Leu *p*-nitroanilide substrate was hydrolyzed by crude extracts of L2 ($3.0 \pm 0.2 \text{ nmol h}^{-1} \text{ mg of protein}^{-1}$) and L3 ($7.7 \pm 0.1 \text{ nmol h}^{-1} \text{ mg of protein}^{-1}$) and that both activities were partially inhibited by *trans*-epoxysuccinyl-L-leucylamido-(4-guanidino)butane, 15% and 3%, respectively. Also, we demonstrated that the *N* α -*p*-Tosyl-L-Arg methyl ester substrate was hydrolyzed by crude extracts of L2 ($11.7 \pm 2.4 \text{ nmol h}^{-1} \text{ mg of protein}^{-1}$) and L3 ($11.1 \pm 1.0 \text{ nmol h}^{-1} \text{ mg of protein}^{-1}$), suggesting a predominance of esterase activity in the crude larval preparation. Interestingly, the specific activity of serine-proteinases was totally inhibited by phenylmethylsulphonyl fluoride in the L3 crude extract, while only 10% of this enzyme class activity was inhibited in the L2 crude extract. The results of the qualitative assays with substrate gels suggested that L2 and L3 larvae express serine-proteinases with similar (13 and 22 kDa) and distinct (50 kDa in L2 and 30 kDa in L3) relative molecular masses. These findings contribute to the biochemical characterization of *D. hominis* L2 and L3 larvae.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: *Dermatobia hominis*; Proteinases; Cysteine-proteinase; Serine-proteinases; *N* α -*p*-Tosyl-L-Arg-methyl ester hydrochloride; *trans*-epoxysuccinyl-L-leucylamido-(4-guanidino)butane; pGlu-Phe-Leu *p*-nitroanilide; Phenylmethylsulphonyl fluoride

1. Introduction

Dermatobia hominis (L. Jr., 1781) (Diptera: Ctenobryidae) disperses its eggs through phoresy. During its life cycle, fertilized *D. hominis* females lay eggs on the body of zoophilous flies and mosquitoes (Artigas and

Serra, 1965). First instar larvae penetrate the skin of a vertebrate host and subsequently develop into second and third instar larvae. The larvae cause myiasis of domestic and wild animals, often predisposing the animals to secondary bacterial infections. The L3 stage leaves the animal, drops to the soil, pupates, and develops into an adult fly (Marcondes, 2001).

In endemic areas, young susceptible animals can be infested by more than 1000 larvae. Damages caused by *D. hominis* in Latin America have been estimated to be about 260 million dollars per year because of the

* Corresponding author. Tel.: +55 21 38658153;

fax: +55 21 25903495.

E-mail address: cvalves@ioc.fiocruz.br (C.R. Alves).

decrease in production of milk and meat and deprecation of the skins (Sancho, 1988; Grisi et al., 2002; Moya-Borja, 2003). In Brasil, *D. hominis* is found mainly in the states of Rio de Janeiro, Espírito Santo, Mato Grosso do Norte, Mato Grosso do Sul, Bahia Goias, and Minas Gerais.

The proposed strategies for the control of this parasite are poor and new strategies are needed. There are few chemical products with efficacy against *D. hominis*, and some may cause contamination to the environment and to humans (McConnell and Hruska, 1993), or leave toxic residues in meat and milk (Zapata et al., 1996). We are examining proteinases as possible new target for drugs that could be used to kill larvae infesting cattle. We currently document that serine-proteinases with esterase, followed by cysteine-proteinases are the prevailing proteinases in L2 and L3 instars.

2. Materials and methods

2.1. Protein extraction from *D. hominis* larvae

Six *D. hominis* second and third instar larvae, collected from bovines in farms, were washed three times in distilled water, placed in 10 mL of lyses buffer (10 mM Tris-HCl, pH 6.8) containing 1% CHAPS detergent (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Missouri, USA) and triturated in a tissue grinder in wet ice. The crude soluble protein extracts were centrifuged (30,000 × g, 60 min, 4 °C) and stored at 70 °C. Protein concentration was determined as previously described (Lowry et al., 1951), using BSA as standard.

2.2. Determination of the proteolytic activity in solution

Enzymatic activity assays were performed according to Alves et al. (2005). Briefly, the enzymatic activity was evaluated in 5 µg of crude extract resuspended in activation buffer (final volume of 400 µL, 25 °C, 30 min). The following chromogenic substrates were used with their respective activation buffer: *N*-Cbz-Pro-Phe-His-Leu-Leu-Val-Tyr-Ser 4-methoxy-β-Naphthylamide (for aspartic-proteinases) in 10 mM sodium acetate pH 3.5, with an optical density (OD) determined at 340 nm; *N*-(3-[2-Furyl]acryloyl)-Leu-Gly-Pro-Ala (for metallo-proteinases) in 50 mM Tris-HCl pH 8.0 containing 10 mM CaCl₂ and an OD determined at 283 nm; pGlu-Phe-Leu *p*-nitroanilide (for cysteine-proteinases) in 10 mM Tris-HCl pH 5.5 containing 1 mM dithiothreitol and an OD determined at 405 nm. Three chromogenic substrates for serine-proteinases were

assayed in 10 mM Tris-HCl pH 7.5: *N*-benzoyl-DL-Arg-*p*-nitroanilide, with OD determined at 405 nm; *N*-benzoyl-L-Tyr-*p*-nitroanilide, with OD determined at 405 nm; *N*α-*p*-Tosyl-L-Arg-methyl ester, with OD determined at 247 nm. Inhibition assays were performed with different inhibitor reagents for each proteinase class: 100 µM *L*-trans-epoxysuccinyl-L-leucylamido-(β-guanidino)butane (E-64; for cysteine-proteinases); 10 µM 1,10-phenanthroline (O-phe; for metallo-proteinases); 10 µM pepstatin A (Pep A; for aspartic-proteinases); 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF); and 100 µM benzamidine hydrochloride hydrate (Bzn; for serine-proteinases).

The variation of the absorbance at each wave length was followed during 30 min and the velocity of the reaction was defined using the formula $v = [s - s_0] / (t - t_0)$, where v = velocity, $[s - s_0]$ = final substrate concentration subtracted from the initial substrate concentration, and $(t - t_0)$ = final time subtracted from the initial time. The assays were controlled by verifying the self-liberation of the conjugated chromogenic in the same intervals of time. The enzymatic activity was expressed in nmol h⁻¹ mg of protein⁻¹, being the enzymatic activity values represented by the average and standard deviation (±) of three independent experiments. All of the chromogenic substrates and inhibitors were obtained from Sigma-Aldrich.

2.3. Electrophoresis

Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed at room temperature in 12% acrylamide gels according to Laemmli (1970). Samples were dissolved in sample buffer (80 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 12% glycerol, 5% β-mercaptoethanol, and 0.015% bromophenol blue). After electrophoresis, the gels were stained with silver nitrate (Gonçalves et al., 1990). The molecular mass markers (SDS-6H) used were from Sigma-Aldrich and SDS-PAGE reagents were from BioRad Laboratories Inc.

2.4. Zymographic assays

Proteinase activity was determined using SDS-PAGE with acrylamide copolymerized with gelatin (substrate-SDS-PAGE) as previously described (Heussen and Dowdle, 1980; Alves et al., 1993, 2004). Briefly, the soluble larval proteins were subjected to electrophoresis under reducing conditions (in sample buffer) using 12% acrylamide gels copolymerized with 0.1% gelatin. Following electrophoresis, the gel was

washed (1 h, 25 °C) with 2.5% Triton X-100 and then incubated (16 h, 37 °C) with 10 mM sodium acetate (pH 3.5 and 5.5) and 10 mM phosphate buffer (pH 7.5 and 9.0). The effect of 10 μ M PMSF was also observed after its addition to the incubation buffer. Hydrolysis of gelatin was detected by staining the gels with 0.1% (w/v) amide black, prepared in a methanol:acetic acid:water (3:1:6, v/v/v) solution.

3. Results and discussion

Proteinases of metazoan parasites have important biological functions. The possibility of developing selective inhibitors for these enzymes has been explored in the design of new chemotherapeutic strategies (Simonet et al., 2002). The putative roles of some proteinases have been demonstrated for reproduction, development, and defense (Gorman and Paskewitz, 2001). However, no proteinases have been described for *D. hominis*. In this work, the combination of proteinases assays in solution and immobilized in acrylamide gels was used in the quantitative and qualitative characterization of serine-proteinases in *D. hominis*.

We measured the enzymatic activity of four proteinase classes in *D. hominis* larvae. The detection level of metallo- and aspartic-proteinases in L2 and L3 crude extract was lower than 0.1 nmol h⁻¹ mg of protein⁻¹ (Table 1), while cysteine- and serine-proteinase activities were more easily detected in our experimental conditions.

The acid cysteine-proteinase activities were detected in L2 and L3 crude extract (Table 1). Both protein extracts showed hydrolysis activity on the pGlu-Phe-Leu *p*-nitroanilide substrate, which is specific for proteinases with thiol groups in the enzyme active centre, such as papain (*Carica papaya*), ficin (*Ficus carica*), and bromelain (*Ananas comosus*) (Filippova et al., 1984). Both activities were inhibited (L2 = 15% and L3 = 3%) by E-64, a thiol blocking reagent

Table 2

Activity of proteinase inhibitors on the L2 and L3 larvae extracts

Inhibitors	Specific activity inhibition			
	L2		L3	
	Sp	Cp	Sp	Cp
Pep A	0	0	0	0
O-phe	0	0	0	0
E-64	0	15	0	3
PMSF	10	0	100	0
Bzn	0	0	0	0

The inhibitor reagents were assayed with *N* α -*p*-Tosyl-L-Arg-methyl ester hydrochloride (serine-proteinase—SP) and pGlu-Phe-Leu *p*-nitroanilide (cysteine-proteinase—CP) substrates. The L2 and L3 larvae specific inhibition activities are expressed in percentile (%). The maximal activity detected for serine-proteinases and cysteine-proteinases are indicated in Table 1. The values represent the average of three independent experiments.

(Table 2). The acid cysteine-proteinase detected in both crude extracts contrasts with previous studies, which suggested that this proteinase class activity was generally observed at alkaline pH (Bode and Huber, 1992). Possible, the activity of cysteine-proteinase at alkaline pH can be better detected in *D. hominis* larvae with further use of synthetic substrates that are more stable at this pH. On the other hand, this finding may reveal several important biological functions of thiol-containing proteinases with optimal activity in acidic pH during infestation of the skin by larvae. It is known that enzymes that hydrolyze the pGlu-Phe-Leu *p*-nitroanilide substrate can inhibit the biosynthesis of proinflammatory prostaglandins (Taussig, 1980) and reduce clotting efficiency by affecting fibrinogen (Livio et al., 1978).

Both larval protein preparations showed a greater serine-proteinase activity when compared to cysteine-proteinase activity, 39 times higher in L2 and 14 times higher in L3 (Table 1). The panel of peptide bonds assayed was satisfactory to verify serine-proteinase

Table 1

Proteinase activities of L2 and L3 larvae extracts on synthetic peptides

Substrates	Enzymatic activity	
	L2	L3
<i>N</i> -Cbz-Pro-Phe-His-Leu-Leu-Val-Tyr-Ser β -naphthylamide	<0.1	<0.1
<i>N</i> -(3-[2-Furyl]acryloyl)-Leu-Gly-Pro-Ala	<0.1	<0.1
pGlu-Phe-Leu <i>p</i> -nitroanilide	3.0 \pm 0.2	7.7 \pm 0.1
<i>N</i> -Benzoyl- <i>l</i> -Arg <i>p</i> -nitroanilide	<0.1	<0.1
<i>N</i> -Benzoyl- <i>l</i> -Tyr-NHNa	<0.1	<0.1
<i>N</i> α - <i>p</i> -Tosyl- <i>l</i> -Arg-methyl ester hydrochloride	117 \pm 24	111 \pm 10

The specific enzymatic activity of L2 and L3 larvae is expressed in nmol h⁻¹ mg of protein⁻¹. The values represent the average of three independent experiments.

activity, since the protein extracts preferentially hydrolyzed peptide substrates containing an arginine in the ester bond, such as *N* α -*p*-Tosyl-L-Arg methyl ester, thereby demonstrating the predominance of esterase activity in the crude larval preparation.

The L2 and L3 extract activities were very similar, reaching 117 (± 24) nmol h⁻¹ mg of protein⁻¹ and 111 (± 10) nmol h⁻¹ mg of protein⁻¹, respectively. Interestingly, only the L3- of serine-proteinases activity was totally inhibited by PMSF, while only 10% of this activity was inhibited in L2 extract (Table 2). The L2 and L3 extracts enzymatic activities detected with *N* α -*p*-Tosyl-L-Arg methyl ester were not inhibited by other serine-proteinase inhibitor reagents, such as benzamidine (Table 2). These data suggest that serine-proteinases from *D. hominis* L2 and L3 larvae may be a serine-type different from trypsin-like serine-proteinases, such as thrombin and plasmin (Schachter, 1980).

We have confirmed the presence of serine-proteinase activity in L2 and L3 crude extracts by a qualitative analysis, zymography in substrate-SDS-PAGE. The optimal pH assay showed that these enzymes also have catalytic properties with complex substrates, such as gelatin above pH 7.5. Despite the complex and distinct (L2, 96–14 kDa and L3, 63–21 kDa) profile of protein bands detected in SDS-PAGE after staining by silver nitrate (Fig. 1), the zymogram profile indicated that both larvae instars has similar (13 and 22 kDa) and different (50 kDa in L2 and 30 kDa in L3) proteolytic bands (Fig. 2).

We observed that these bands are sensitive to PMSF presence, particularly in L3 extract (Fig. 2). As the inhibition intensity of PMSF was different for L2 and L3 larvae proteinases, it is reasonable to suggest that the 13, 22, and 30 kDa bands from L3 are more sensitive to the presence of PMSF than the 13, 22, and 50 kDa bands from L2 larvae. Our results corroborate the expected profile of insect serine-type enzymes that has been described already (Hanson et al., 2003; Telang et al., 2005; Gupta et al., 2005), it is also considered that the different molecular weights of serine-proteinases were the result of protein degradation. In addition, this study suggests that these differences in sensitivity to inhibitors might signify that these larvae have serine-proteinases with distinct catalytic properties. The use of more selective inhibitors may allow further distinction of the mechanistic subclass of the serine-type proteinases.

Moreover, our results concerning serine-proteinases of *D. hominis* L2 and L3 larvae reflect the efficiency of the nucleophilic attack of the active centre of these enzymes to the different peptide bonds in alkaline solution as assayed with substrates with multiple or

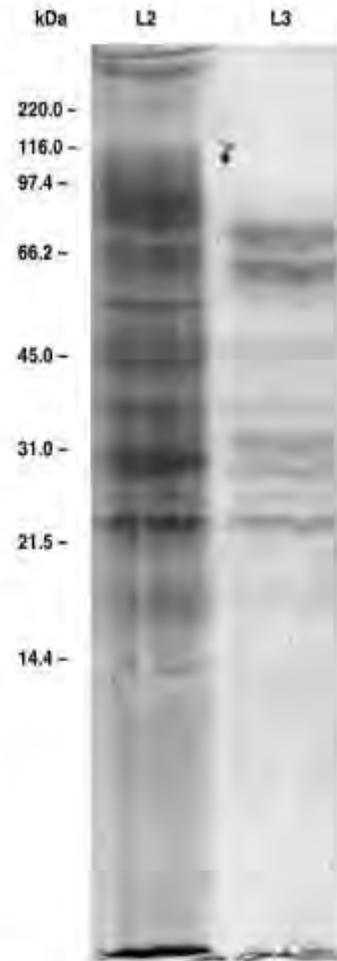


Fig. 1. Protein profile of *Dermatitis hominis* larvae analyzed by SDS-PAGE. Larvae (L2 and L3) extracts (30 μ g) were resolved with electrophoresis under denaturing conditions and the gels were silver stained. Molecular mass markers are indicated (kDa). These results are representative of two independent experiments.

defined peptide bonds. Many physiological processes rely on serine-proteinases that activate specific proteins by proteolytic cleavage (Rawlings and Barrett, 1994). The detection of enzyme activity at this pH with complex substrates is an indication of the action of these enzymes when the larvae is invading the skin tissue, as proposed for other parasitic models in diverse processes, such as in the facilitation of invasion of host tissues, digestion of host proteins or evasion of host immune responses (Marikowsky et al., 1988; McKerrow, 1989; Montoy et al., 1989; Fishelson et al., 1992). In this environment, it is possible to find hemoglobin, serum albumin and collagen, all of which can be hydrolyzed by these proteinases. Furthermore, the maximal catalytic activity of the various non-vertebrate serine-proteinases occurs near alkaline pH (Naveh et al., 2005) and these enzymes

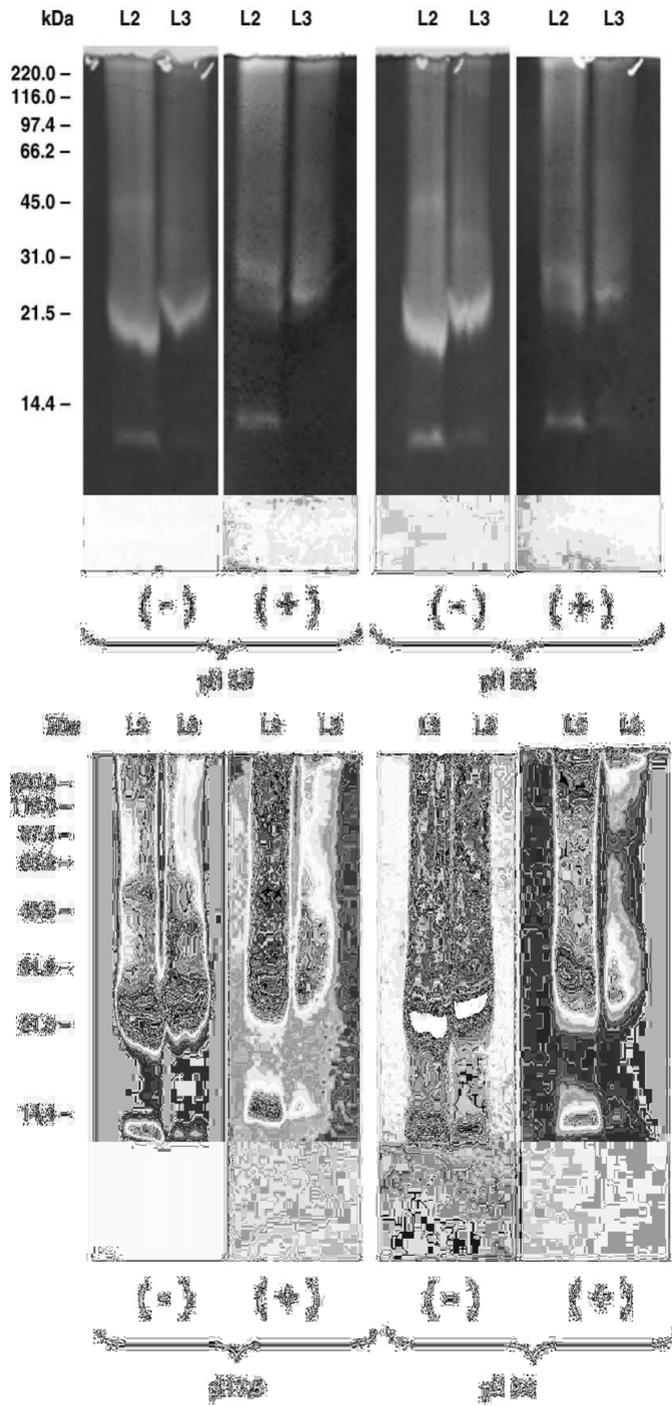


Fig. 5. Immunoblotting analysis of the parasite stages L2 and L3 under (-) and without (+) treatment. The immunoblotting analysis was performed using the anti-*Trichostrongylus axei* IgG (1:1000) and the anti-*Trichostrongylus axei* IgG (1:1000) as a secondary antibody. The immunoblotting analysis was performed using the anti-*Trichostrongylus axei* IgG (1:1000) and the anti-*Trichostrongylus axei* IgG (1:1000) as a secondary antibody. The immunoblotting analysis was performed using the anti-*Trichostrongylus axei* IgG (1:1000) and the anti-*Trichostrongylus axei* IgG (1:1000) as a secondary antibody. The immunoblotting analysis was performed using the anti-*Trichostrongylus axei* IgG (1:1000) and the anti-*Trichostrongylus axei* IgG (1:1000) as a secondary antibody.

may regulate several protection responses, including hemolymph coagulation, antimicrobial peptide synthesis and melanization of pathogen surfaces, which have been described for mosquito immune responses (Gorman and Paskewitz, 2001).

We are sure that the biochemical characterization of *D. hominis* L2 and L3 larvae serine-proteinases improves the knowledge of insect physiology and insect–host interaction. The real function of these enzymes during the *D. hominis* biological cycle remains unclear. However, the observation of enzymatic activity on gelatin in a broad pH range may suggest that these enzymes could be important in several moments of the insect life cycle. Thus, further studies are necessary in order to determine the role of these enzymes on the biological cycle of *D. hominis*.

Acknowledgements

We would like to thank PAPES IV (Fiocruz) and CNPq for partial financial support of this research. Fabiano A. Pires was a fellow student from UFRRJ/CNPq.

References

- Alves, C.R., Marzochi, M.C., Giovanni-de-Simone, S., 1993. Heterogeneity of cysteine proteinases in *Leishmania braziliensis* and *Leishmania major*. Braz. J. Med. Biol. Res. 26, 167–171.
- Alves, J.L., Mendonça-Cima, P.W., Alves, C.R., 2004. The use of metal chelate affinity chromatography on the isolation of *Leishmania chagasi* promastigote hydrophobic proteinases. Vet. Parasitol. 119, 137–145.
- Alves, C.R., Corte-Real, S., Bourguignon, S.C., Chaves, C.S., Saraiva, E.M., 2005. *Leishmania amazonensis*: early proteinase activities during promastigote–amastigote differentiation in vitro. Exp. Parasitol. 109, 38–48.
- Artigas, P.T., Serra, R.G., 1965. Portadores de ovos de *Dermatobia hominis* (L. Jr., 1781). Atualização da lista de fóreticos, com a enumeração de novos agentes transmissores de Berne. Ciênc. Cult. S. Paulo 17, 21–29.
- Bode, W., Huber, R., 1992. Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. Eur. J. Biochem. 204, 433–451.
- Filippova, I.Y., Lysogorskaya, E.N., Oksenoit, E.S., Rusenskaya, G.N., Stepanov, V.M., 1984. L-Pyroglutamyl-L-phenylalanyl-L-leucine-p-nitroanilide. A chromogenic substrate for thiol proteinase assay. Anal. Biochem. 143, 293–297.
- Fishelson, Z., Antri, P., Friend, D.S., Marikowsky, M., Petri, M., Newport, G., McKerrow, J.H., 1992. *Schistosoma mansoni*: cell-specific expression and secretion of a serine protease during development of cercariae. Exp. Parasitol. 75, 87–98.
- Gorman, M.J., Paskewitz, S.M., 2001. Serine proteases as mediators of mosquito immune responses. Insect. Biochem. Mol. Biol. 31, 257–262.
- Gonçalves, A.M., Nehme, N.S., Morel, C.M., 1990. An improved silver staining procedure for schistosoma analysis in polyacrylamide gradient gels. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 85, 101–106.
- Grisi, L., Massad, C.L., Moya-Buaja, G.E., Pereira, J.B., 2002. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. Hora Vet. Porto Alegre. 21, 8–10.
- Gupta, S., Wang, Y., Jiang, H., 2005. Purification and characterization of *Manduca sexta* prophenoloxidase-activating proteinase-1, an enzyme involved in insect immune responses. Protein Expr. Purif. 39, 261–268.
- Hanzon, J., Smirnov, P., Applebaum, S.W., Mamo, A.K., Bink, Y., 2003. Thiol-activated serine proteinases from nymphal hemolymph of the African migratory locust, *Locusta migratoria migratorioides*. Arch. Biochem. Biophys. 410, 83–88.
- Heussen, C., Dowdle, E.B., 1980. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. Anal. Biochem. 102, 196–202.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680–685.
- Livio, M., Bertoni, M.P., De Gaetano, G., Donati, M.B., 1978. Effect of bromelain on fibrinogen level, prothrombin complex factors and platelet aggregation in Prostaglandin and in the rat. Drugs Clin. Exp. Res. 4, 49–53.
- Lowry, O.H., Rosebough, N.J., Farr, L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265–275.
- Marcondes, C.B., 2001. Entomologia Médica e Veterinária. Ateneua Ed. São Paulo, p. 432.
- Marikowsky, M., Fishelson, Z., Aron, R., 1988. Purification and characterization of proteases secreted by transforming *Schistosoma mansoni*. Mol. Biochem. Parasitol. 30, 45–54.
- McCormell, R., Hruska, A.J., 1993. An epidemic of pesticide poisoning in Nicaragua: implications for prevention in developing countries. Am. J. Public Health 83, 1559–1662.
- McKerrow, J.H., 1989. Parasite proteinases. Exp. Parasitol. 68, 111–115.
- Mouray, F.G., Cayzer, C.J.R., Adams, J.H., Dobson, C., 1989. Proteolytic enzymes in excretory-secretory products from adult *Nematostoloides dubius*. Int. J. Parasitol. 19, 129–131.
- Moya-Boja, G.E., 2003. Erradicação ou Manejo Integrado das Míases Neotrópicas das Américas? Tópico de Interesse Geral. Pesq. Vet. Bras. 23, 131–138.
- Naveh, V.H., Baslam, A.R., Azmayestafard, P., Housseinkhani, S., 2005. Digestive proteinase activity of the *Khapa beetie*, *Trogoderma granarium* Everis (Coleoptera: Dermestidae). Commun. Agric. Appl. Biol. Sci. 70, 879–882.
- Rawlings, N.D., Barrett, A.J., 1994. Families of serine peptidases. Mech. Enzymol. 244, 19–61.
- Sancho, E., 1988. *Dermatobia*, the neotropical warble fly. Parasitol. Today 4, 242–246.
- Selzacher, M., 1980. Kallikreins (kininogenases)—a group of serine proteases with bioregulatory actions. Pharmacol. Rev. 31, 1–17.
- Simonet, G., Claeys, J., Vanden Broeck, J., 2002. Structural and functional properties of a novel serine protease inhibiting peptide family in arthropods. Comp. Biochem. Physiol. 132, 247–255.
- Taussig, S.J., 1980. The mechanism of the physiological action of bromelain. Med. Hypoth. 6, 99–104.
- Telang, M.A., Giri, A.P., Sainani, M.N., Gupta, V.S., 2005. Characterization of two midgut proteinases of *Helicoverpa armigera* and their interaction with proteinase inhibitors. J. Insect Physiol. 51, 513–522.
- Zapata, M.A.L., Santamaría, R.M.M., Alvarez, I.M., Muller, U., 1996. Organochlorine pesticide residues in cow's milk Nicaragua. Bol. Oficina Sanit. Panamá. 120, 483–490.