

Avaliação “in vitro” do efeito de inibidores de proteases contra larvas de primeiro estágio de *Cochliomyia hominivorax*: estudos preliminares

Márcia Cristina de Sena Oliveira¹; Rodrigo Giglioti²

ABSTRACT:- OLIVEIRA, M.C.S., GIGLIOTI, R., [In vitro evaluation of proteases inhibitors effect against first stage larvae of *Cochliomyia hominivorax*: Preliminary study]. ¹Rod. Washington Luiz, km 234 - Caixa Postal 339, 13560-970, São Carlos, SP, Brazil. E-mail: marcia@cnpq.br, ² Aluno da UNESP, Jaboticabal.

The excretory/secretory products (E/SP) of *Cochliomyia hominivorax* first stage larvae (L1) were prepared using eggs from a colony maintained in the laboratory. The protein profiles of the E/SP was obtained using sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and the proteolytic activity was investigated in the same gels, using gelatin as substrate. The characterization of the proteases also was investigated in gels with gelatin as substrate, treating E/SP samples with the following proteases inhibitors: *phenylmethylsulfonyl fluoride* (PMSF), *tosylphenylalanyl chloromethyl ketone* (TPCK), *tosylphenylalanine chloromethyl ketone* (TPCK), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and *3,4-dichloroisocoumarin* (DCI). The protein profile produced for L1 revealed the presence of a diverse array of proteins with molecular weight between 97 KDa and 14 KDa. There was wide proteolytic activity of the L1 ES/P on gelatin, including high, medium and low molecular weights. The studies with proteases inhibitors showed predominance of the serine-protease and metalloprotease enzymes. The first “in vitro” study for verification of the protease inhibitor effects on the larvae development was done using an EDTA solution. This inhibitor, at the concentration used, was lethal to 40% of the larvae after two hours of exposure and 100% of the larvae after 12 hours. New laboratory studies are necessary to determine the best concentrations for EDTA effect and for the other protease inhibitors identified.

KEY WORDS: enzymes, excretory/secretory products, myiasis

RESUMO:

Os produtos de excreção/secreção (PE/S) das larvas de primeiro estágio de *Cochliomyia hominivorax* (L1) foram preparados usando-se ovos originados de uma colônia mantida em laboratório. O perfil das proteínas dos PE/S foi obtido usando a eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e a atividade proteolítica foi investigada nos mesmos géis, utilizando gelatina como substrato. A caracterização das proteases foi investigada também em géis com gelatina como substrato, tratando-se as amostras dos PE/S com os seguintes inibidores sintéticos de proteases: phenilmetilsulfonil fluoride = PMSF, tosifenilalanil clorometil cetona = TPCK, tosil lisil clorometil cetona = TLCK, ácido etileno diamino tetracético = EDTA e 3,4- dicloroisocumarina = DCI. O perfil das proteínas produzidas por L1 revelou a presença de diversas bandas protéicas com massas moleculares entre 97 KDa e 14 KDa. Foi verificada ampla atividade proteolítica dos PE/S de L1 sobre a gelatina, desde a região correspondente às proteases de maiores massas moleculares como as intermediárias e baixas. Nos ensaios com inibidores de proteases, foi verificado um predomínio de enzimas do grupo das serina-proteases e metalo-proteases. O primeiro ensaio conduzido “in vitro” para verificação do efeito dos inibidores de proteases sobre o desenvolvimento larvar, foi feito utilizando solução de EDTA. Esse inibidor, na concentração utilizada, foi letal para 40% das larvas após duas horas de exposição e 100% das larvas após 12 horas de exposição. Novos estudos serão conduzidos no laboratório a fim de determinar as melhores concentrações para o EDTA e também para os demais inibidores de proteases identificados.

Palavras chave: enzimas, produtos de excreção/secreção, míases

Introdução

O parasitismo pelas larvas da mosca *Cochliomyia hominivorax* produzem míases primárias nos animais domésticos, causando considerável prejuízo para a pecuária nacional. Em virtude dessa importância econômica, surgiu a necessidade de se conhecer detalhes da interação entre parasito e hospedeiro que pudessem levar ao desenvolvimento de medicamentos mais eficazes e a criação de novos métodos de controle dessa doença. Sabe-se que o processo de estabelecimento e nutrição das larvas de vários dípteros cujas larvas produzem míases envolvem a excreção/secreção de enzimas proteolíticas. Essas proteases estariam ainda envolvidas em outros processos vitais para as larvas como mudança de estágio e mecanismos de escape da resposta

imune dos hospedeiros. Em vista de tais considerações, esse trabalho de pesquisa teve como objetivo conhecer o perfil das proteínas presentes nos produtos de excreção/secreção (PE/S) das larvas de primeiro estágio (L1), caracterizar sua atividade proteolítica por meio da eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) copolimerizado com gelatina e estudar o efeito dos inibidores de proteases sobre L1 “in vitro”.

Manutenção da cultura de *C. hominivorax* e preparo dos PE/S das larvas

A colônia de *C. hominivorax* estabelecida no Laboratório de Sanidade Animal da Embrapa Pecuária Sudeste é mantida por meio da colheita de larvas em bovinos naturalmente infestados. As larvas de terceiro estágio são identificadas por apresentarem pigmentação nos troncos traqueais que atingem os 3-4 últimos segmentos. Essas larvas são incubadas em meio de cultura composto por carne moída e sangue bovino colhido com citrato de sódio, conforme descrito por SMITH (1960), com adaptações.

Fêmeas oriundas dessa cultura foram utilizadas para obtenção de posturas e L1. Para o preparo dos PE/S, grupos de 50 larvas foram lavadas 3 vezes: em água destilada, água adicionada de antibiótico e novamente em água pura. Essas larvas foram cuidadosamente secas com papel de filtro e colocadas em placa de Petri contendo 5 mL de meio RPMI adicionado de Vancomicina^R. A placa foi incubada por 10 horas, em estufa a 37 ° C. Após esse período, as larvas foram descartadas e o meio foi submetido a centrifugação a 6.000g por 20 minutos a 4°C. Alíquotas de sobrenadante foram transferidas para microtubos que foram devidamente marcados e identificados.

Os PE/S foram armazenadas em congelador à temperatura de -80°C até o momento das análises.

Determinação da concentração de proteínas nos PE/S de L1

A dosagem das proteínas totais presentes nos PE/S de L1 de *C. hominivorax* foi realizada pelo método do ácido bicinconínico (BCA - Protein Assay Reagent Kit – Pierce), de acordo com as instruções do fabricante, utilizando soroalbumina bovina (BSA) como padrão. As análises eletroforéticas foram feitas utilizando as concentrações de 10, 20 e 30 µg de proteína.

Análise eletroforética das proteínas dos PE/S de L1

A metodologia utilizada para análise do perfil protéico foi a eletroforese em gel de poliacrilamida a 10 % com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) segundo técnica descrita por LAEMMLI (1970). Amostras foram concentradas com aplicadas diluídas v/v em tampão (TRIS-HCl 500mM, pH 6,8; SDS 1%, 2-mercaptoetanol 128mM, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,05%). As corridas eletroforéticas foram realizadas em sistema vertical (Bio América) em corrente constante de 30 mA. Foram utilizados os padrões de peso molecular HMW e LMW (Pharmacia). Os géis foram corados com nitrato de prata segundo WRAY et al., (1981). O cálculo das massas moleculares aparentes das proteínas foram feitos usando o programa Lab Image (KodaK). Os perfis eletroforéticos dos PE/S de L1 estão apresentados na Figura 1, e não se observou diferença no padrão de migração nas duas concentrações protéicas usadas (30 e 40 µg).

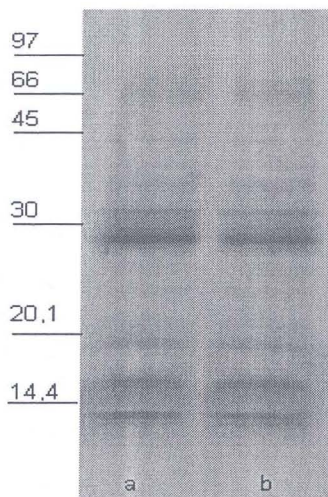


Figura 1-Perfis protéicos dos produtos de excreção/secreção de larvas de primeiro estágio de *C. hominivorax* (a=30 µg, b= 40 µg). Padrão de massa molecular indicado à esquerda. (SDS-PAGE-Prata).

Os perfis mostram a presença de bandas protéicas com massas aparentes superiores a 66 KDa, várias bandas com massas intermediárias e baixas que se estendem até a região final do gel (cerca de 14 KDa).

Atividade proteolítica dos PE/S das larvas de *C. hominivorax* zimograma em SDS-PAGE copolimerizado com gelatina

A atividade proteolítica dos PE/S foi analisada em géis de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) seguindo metodologia descrita por WILLIAMS &

COOMBS (1995). Para esse fim, as amostras de PE/S foram diluídas (v/v) em tampão (TRIS-HCl 500mM, pH 6,8; SDS 1%, 2-mercaptoetanol 128mM, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,05%) e aplicadas ao gel de acrilamida 5-12,5% copolimerizado com gelatina a 0,2% (p/v). Após a corrida os géis foram incubados em triton X-100 (2,5% v/v) por 30 minutos sob agitação, enxaguados e incubados em tampão TRIS-HCl pH 8,15 contendo CaCl₂ 1mM, ditioneitol (DTT Sigma) 1 mM, por 15 horas a 37° C. Ao final desse período os géis foram corados em Amido Black 0,1% em metanol : ácido acético : água (30:10:60) e descorados neste mesmo solvente. O perfil de proteólise (Figura 2) revelou a presença de hidrólise difusa na faixa que se estende desde a região de massa molecular aparente maior que 220 KDa e por zonas de hidrólise intensa nas regiões de 170 kDa e aproximadamente 70 kDa. Por meio desse experimento pôde-se observar essas larvas produzem uma ampla gama de enzimas que atuam sobre a gelatina.

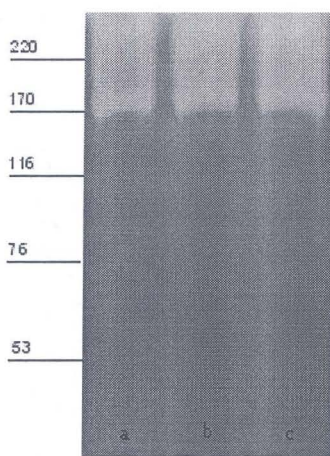


Figura 2-Atividade proteolítica dos PE/S de L1 de *C. hominivorax* (a=10 µg, b=20 µg, c= 30 µg) em gel de poliacrilamida 5-12,5% e coloração por Amido Black. Padrão de massa molecular indicado à esquerda.

Efeito dos inibidores de proteases sobre os PE/S de L1 de *C. hominivorax*

A inibição da atividade proteolítica dos PE/S das larvas foram analisadas nos mesmos géis descritos para o zimograma. As amostras foram previamente incubadas com cada um dos inibidores (phenilmetilsulfonil fluoride = PMSF, tosilfenilalanil clorometil cetona = TPCK, tosil lisil clorometil cetona = TLCK, ácido etileno diamino tetracético = EDTA e 3,4- dicloroisocumarina = DCI) diluídas em tampão da amostra

(TRIS-HCl 500mM, pH 6,8; SDS 1%, 2-mercaptoetanol 128mM, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,05%) e aplicadas ao gel. Os géis foram corados segundo técnica descrita para detecção da atividade proteolítica. O resultado da análise (Figura 3) mostrou que a inibição da atividade proteolítica dos extratos de L1 foi obtida principalmente pela incubação com DCI e PMSF. Inibições moderadas foram conseguidas com TLCK e EDTA. A inibição da atividade enzimática dos PE/S de L1 sobre a gelatina pelos inibidores DCI, PMSF e TLCK, mostraram que as enzimas predominantes nesses extratos foram do tipo serina-proteases. A inibição parcial pelo EDTA indica a presença de enzima do grupo das metalo-proteases. A presença de enzimas desses dois grupos nos PE/S de larvas de dípteros que invadem tecidos, foi verificada por McKERROW (1989) e CHAMBERS et al., (2003).

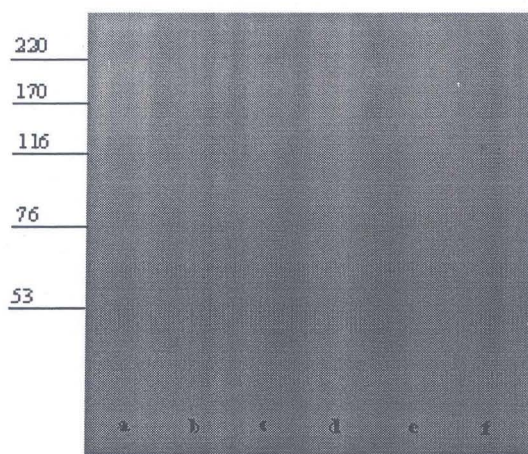


Figura. 3- Efeito de inibidores sobre a atividade proteolítica dos PE/S de L1 de *Cochliomyia hominivorax* (a = controle; b = PMSF; c = TPCK; d = TLCK; e = EDTA; f = DCI) em gel de poliacrilamida 5-12,5% e coloração por Amido Black. Padrão de massa molecular indicado à esquerda.

Efeito do EDTA sobre L1 de *C. hominivorax*

Tendo em vista os tipos de enzimas presentes nos PE/S de L1 de *C. hominivorax*, os estudos iniciais do efeito desses inibidores de proteases sobre o desenvolvimento larvar “in vitro” foram feitos usando o EDTA, por ser o inibidor mais acessível. O teste foi feito utilizando a mesma metodologia que está sendo desenvolvida no laboratório (OLIVEIRA et al., 2008) para a análise do efeito de fitoterápicos sobre essas larvas. Foram usadas L1, provenientes de cultura mantida em laboratório. Sangue bovino foi diluído em solução de EDTA para concentração final de

60 µg/mL. Essa solução foi incorporada a 1 g de carne moída, compondo assim o meio de cultura que foi distribuído em placas de Petri. Os controles foram preparados da mesma forma, utilizando apenas o sangue bovino colhido com citrato de sódio e a carne moída, sendo quatro repetições por tratamento. Vinte e cinco L1 com cerca de 6 horas, foram colocadas sobre o meio de cultura em cada placa. As placas foram incubadas em estufa a 37°C. As leituras foram feitas com duas e doze horas após a incubação. Nas quatro placas controles as larvas desenvolveram-se normalmente, completando o ciclo. Verificou-se que o EDTA, na concentração usada foi letal para 40% das larvas nas primeiras 2 horas e para 100% após 12 horas de exposição. Esses resultados preliminares indicam que um antiparasitário tópico adicionado desse inibidor de proteases poderia ser eficiente, atuando inclusive na redução da população de *C. hominivorax*. Novos estudos estão sendo conduzidos no laboratório a fim de se determinar as melhores concentrações de trabalho para o EDTA e também para os demais inibidores de proteases identificados.

Referências bibliográficas

- CHAMBERS, L., WOODROW, S., BROWN, A.P., HARRIS, P.D., PHILLIPS, D., HALL, M., CHURCH, J.C.T., PRITCHARD, D.I. Degradation of extracellular matrix components by defined proteinases from the greenbottle larva *Lucilia sericata* used for the clinical debridement of non-healing wounds. **Br. J. Dermatol.**, v. 148, p.14-23, 2003.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural protein during the assembly of the bacteriophage T4. **Nature**, p. 277-80, 1970.
- McKERROW, J.; H. Molecular and biochemical studies of the cercarial proteinase of *Schistosoma mansoni*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 84 Supl. 1, p.209-10, 1989.
- OLIVEIRA, M.C.S.; CHAGAS, A. C. S.; FERREZINI, J.; CARVALHO, C.O. Efeito do óleo essencial de *Eucalyptus staigeriana* sobre larvas de terceiro estágio de *Cochliomyia hominivorax*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 15., 2008, Curitiba. **Anais...** Curitiba: CBPV, 2008. CD ROM.
- SMITH, C.L. Mass Production of Screw-Worms (*Callitroga hominivorax*) for the Eradication Program in Southeastern States. **J. Econ. Entomol.**, v.53, n.6, p.1110-1116, 1960.
- WILLIAMS, A.G., COOMBS, G.H. Multiple protease activities in *Giardia intestinalis* trophozoites. **Int. J. Parasitol.**, v. 25, p.771-778, 1995.

WRAY, W., BOULIKAS, T., WRAY, V.P., KANCOL, J.R. Silver staining of proteins in polyacrilamide gels. **Anal. Biochem.**, v. 118, p. 197-203, 1981.