

ESTUDO DAS PROTEÍNAS PRODUZIDAS POR LARVAS DE DÍPTEROS

Márcia Cristina de Sena Oliveira

Embrapa Pecuária Sudeste, Rodovia Washington Luiz, km 234, Fazenda Canchim, Caixa Postal 339, CEP 13560-970, São Carlos, SP, Brasil. Endereço eletrônico: <marcia@cppse.embrapa.br>.

Introdução

Miíases são definidas como infestações de tecidos e órgãos de vertebrados por larvas de dípteros. Essas larvas se alimentam de tecidos e de fluídos do hospedeiro, provocando danos proporcionais ao período de parasitismo. Muitas espécies de mamíferos, inclusive o homem, podem desenvolver essa enfermidade. Entre os animais domésticos afetados por miíases, os bovinos se destacam. Os prejuízos provocados pela doença incluem redução na produção de carne e de leite, perda de peso e desvalorização do couro de forma mais ou menos grave, dependendo da intensidade da miíase. No entanto, são os tratamentos preventivos e os tratamentos curativos que mais oneram a produção de bovinos e que deixam resíduos indesejáveis na carne e no leite, e dessa maneira se tornam grave problema de saúde pública.

Estudos recentes mostraram que as proteínas produzidas por larvas de vários dípteros causadoras de miíases são essenciais no estabelecimento da doença. Essas proteínas podem constituir a chave para o desenvolvimento de novos medicamentos e novos imunógenos, além de esclarecer importantes questões sobre a relação parasita-hospedeiro.

No Brasil as infestações por larvas de *Cochliomyia hominivorax*, conhecida como mosca-varejeira, e *Dermatobia hominis*, a mosca-do-berne, são consideradas as principais miíases que afetam os bovinos e, por isso, serão objeto dos comentários neste trabalho.

Miíases por larvas de mosca-varejeira

As larvas de *C. hominivorax* (Coquerel, 1858) (Díptera: Calliphoridae) são parasitas obrigatórios, que tendem a se localizar profundamente em feridas,

originando miíases graves. As moscas só realizam a postura nos bordos de ferimentos recentes de mamíferos domésticos ou selvagens e também no homem.

Essa mosca, cuja distribuição está restrita à América do Sul, é encontrada em todos os estados brasileiros, com prevalência variável ao longo do ano. Os insetos adultos possuem aparelho bucal lamedor e coloração verde ou azul metálica, e medem de 8 a 10 mm de comprimento. As moscas caracterizam-se por apresentar três listras negras longitudinais no tórax e por se alimentarem de seivas vegetais. O número de ovos por postura pode ser de até 390 e chegar a 2.800 por fêmea. O período de incubação dos ovos varia de 11 a 21h e as larvas recém-eclodidas penetram nos tecidos dos quais se alimentam, conservando os espiráculos respiratórios voltados para o exterior. Todo o ciclo larval (L_1 , L_2 e L_3) se dá entre quatro e oito dias. Após esse período as larvas se desprendem do hospedeiro, caem e desenvolvem a pupação no solo. O período pupal é de sete dias no verão e até dois meses no inverno. As fêmeas copulam uma única vez e iniciam a postura cinco a dez dias após haverem emergido do pupário (OLIVEIRA-SEQUERA e AMARANTE, 2002). As práticas de rotina no manejo dos bovinos nas fazendas produtoras, tais como castração e descorna, predispõem os animais ao parasitismo por essas larvas, causando graves prejuízos aos produtores.

Em razão da sua grande importância econômica, muitos esforços foram concentrados na eliminação de *C. hominivorax* nos Estados Unidos, até sua erradicação, entre os anos de 1950 e 1960. Na atualidade, encontra-se em fase de erradicação nos países da América Central, região de grande importância estratégica para que a mosca não seja introduzida novamente na América do Norte.

Miíases por larvas de mosca-do-berne

As larvas da mosca *D. hominis* (Linnaeus, Jr., 1781), (Diptera: Cuterebridae) são vulgarmente conhecidas no Brasil por berne e causam miíases furunculosas em animais domésticos ou silvestres e também no homem. As larvas são parasitas obrigatórias que penetram ativamente na pele íntegra, auxiliadas provavelmente pelas proteínas secretadas e excretadas por elas e se desenvolvem em nódulos subcutâneos (OLIVEIRA-SEQUERA et al., 1996). A respiração traqueal das larvas ocorre por um orifício fistular, que conecta o tecido subcutâneo ao ambiente.

D. hominis ocorre do México à Argentina, com distribuição ampla no território brasileiro e concentração na proximidade de matas, em regiões quentes e úmidas e

de altitude inferior a 1.000 m. Os insetos adultos de *D. hominis* são moscas relativamente grandes, com cerca de 15 mm de comprimento, cuja longevidade é de 3 a 19 dias. O aparelho bucal é do tipo vestigial, porque essas moscas não se alimentam. O abdome é de cor azul metálica, o tórax é castanho-escuro e a cabeça e as patas são amareladas. Esses insetos são raramente vistos na natureza ou mesmo perto dos hospedeiros, mantendo-se protegidos pela vegetação próxima aos pastos. Os insetos adultos copulam nas primeiras 24h após a emergência do pupário. As fêmeas realizam a postura no abdome de moscas de outras espécies, que são capturadas no ar e que atuam como vetores de seus ovos (moscas foréticas). Entre as espécies mais utilizadas como transportadoras de ovos de *D. hominis* estão a mosca-doméstica (*Musca domestica*), a mosca-dos-estábulos (*Stomoxys calcitrans*), a mosca-dos-chifres (*Haematobia irritans*) e outros dípteros, como mosquitos e mutucas. O período de incubação dos ovos é em média de seis dias. Em cada postura, cerca de 30 ovos são depositados no abdome da mosca vetora e o total de ovos produzidos por uma fêmea durante o seu período fértil pode chegar a 700 unidades.

A infestação dos bovinos ocorre quando os insetos vetores pousam no corpo desses animais. O calor emanado da pele e a liberação de gás carbônico dos bovinos parecem constituir os principais estímulos para que ocorra a eclosão das larvas. As larvas recém-eclodidas penetram ativamente na pele íntegra ou nos folículos pilosos do hospedeiro. Os parasitas migram até o tecido subcutâneo, onde iniciam o desenvolvimento larval, que dura de 29 a 45 dias. A larva de terceiro estágio cai no solo e inicia a fase de pupação. A fase de pupa dura cerca de 30 dias em condições ótimas de temperatura e umidade, mas pode se estender por até 120 dias em condições pouco favoráveis, quando a pupa entra em estado de dormência. Todo o ciclo de desenvolvimento de *D. hominis* pode se completar em 100 a 140 dias.

Produtos de secreção e excreção

O conjunto de proteínas produzido pelas larvas de dípteros é conhecido como produtos de secreção e excreção (PE/S) e são a matéria-prima para a análise proteica. A literatura disponível mostra que já existem dados significativos a respeito das proteínas produzidas por várias espécies de moscas que causam miases: *Hypoderma lineatum* (BELINSKAIA, 1973; BARON e COLWELL, 1991; PRUETT,

1993); *Lucilia cuprina* (BOWLES et al., 1989; SANDEMAN et al., 1990; TELLAM et al., 1994); *Oestrus ovis* (INNOCENTI et al., 1995; TABOURET et al., 2001, 2003); e *Chrysomya bezziana* (MUHARSINI et al., 2000).

No Brasil, poucos estudos foram desenvolvidos com foco nas espécies mais importantes, no que se refere à caracterização dos PE/S. As proteínas produzidas por larvas de *D. hominis* foram parcialmente estudadas por Brant (2004) e as de *C. hominivorax* por Oliveira e Giglioti (2008). Esses estudos, no entanto, são ainda muito pontuais e necessitam de mais investimento.

Os PE/S são compostos principalmente de enzimas proteolíticas, ou proteases. As proteases apresentam grande capacidade catalítica e alto grau de especificidade com seus substratos. Essas substâncias são capazes de regular processos metabólicos altamente coordenados e por isso são essenciais em todos os processos biológicos envolvidos na manutenção da vida. Os parasitas, para se desenvolverem, se reproduzirem e causarem doença, produzem uma série de enzimas que regulam esses processos vitais e também os mecanismos de escape frente ao sistema imunológico do seu hospedeiro.

As proteases têm sido identificadas em vários sistemas biológicos, desde vírus até vertebrados, e são classificadas em dois grandes grupos principais: exopeptidases e endopeptidases, de acordo com a região da molécula onde atuam preferencialmente. As endopeptidases agem nas regiões internas das cadeias polipeptídicas e, de acordo com seu mecanismo catalítico, podem ser classificadas em serinoproteases, aspartatoproteases, treoninaproteases, metaloproteases e cisteínoproteases (BOND e BUTLER, 1987). As serinoproteases possuem uma molécula de serina no seu sítio ativo e agrupam-se em 20 famílias, que foram subdivididas em aproximadamente seis clãs com antepassados comuns. Essas enzimas são abundantes em vários organismos, tais como bactérias, vírus e eucariotos. Também em larvas de dípteros, essa classe de proteases tem sido amplamente identificada (PRUETT, 1993; CASU et al., 1996; BRANT, 2004; OLIVEIRA e GIGLIOTTI, 2008) e parece desempenhar papel importante no estabelecimento das larvas e também na clivagem de anticorpos produzidos pelos hospedeiros (escape frente ao sistema imunológico do hospedeiro). As aspartatoproteases dependem de um resíduo de ácido aspártico para a sua atividade catalítica. A atividade das cisteínoproteases depende de um composto de cisteína e histidina. As metaloproteases agrupam-se em cerca de 30 famílias que

apresentam como característica a necessidade de um íon metálico divalente para sua atividade (HIBBS et al., 1985). Elas representam os mais diversos tipos catalíticos, tais como as colagenases e as termolisinas de bactérias. Essa classe de protease foi identificada nos PE/S de larvas de *Lucilia sericata* (CHAMBERS et al., 2003).

Preparo dos produtos de secreção e excreção

A obtenção dos PE/S de larvas de dípteros envolve várias etapas. É necessário que seja formada uma colônia desses parasitas em laboratório, para maior facilidade na obtenção e na identificação das larvas a serem estudadas. O estabelecimento da colônia pode ser iniciado pela colheita de larvas de terceiro estágio, em animais naturalmente infestados. Essas larvas são então incubadas em substratos, de acordo com suas necessidades específicas. Após a pupação obtém-se as moscas adultas, que darão origem aos ovos. Com base nesses ovos é que se conseguirá as larvas de primeiro, de segundo e de terceiro estágio para o preparo dos PE/S.

As larvas deverão ser lavadas algumas vezes com água destilada estéril, depois com água adicionada de antibióticos e novamente com água pura, antes de serem colocadas no meio de cultura, onde serão preparados os PE/S. Geralmente o meio RPMI ou simplesmente água pode ser usado, dependendo do período no qual serão incubadas as larvas. Após a incubação, o meio deve ser centrifugado, adicionado ou não de uma mistura de inibidores de proteases e armazenado a – 80°C, a fim de se minimizar a degradação proteica.

Os PE/S devem ainda ser quantificados quanto ao seu teor de proteínas, utilizando-se métodos colorimétricos. O método do ácido bicinconílico, em que se usa como padrão soroalbumina bovina, apresenta sensibilidade ideal para a determinação da concentração de proteínas nesse tipo de amostra.

Métodos de análise empregados no estudo dos produtos de secreção e excreção

Estudo do perfil proteico

Vários métodos de purificação de proteínas podem ser utilizados nos estudos dos PE/S de larvas. Nos mais simples usa-se o fracionamento por meio de eletroforese em géis de poliacrilamida.

Para a análise do perfil proteico dos PE/S dos estágios larvares, é usada a eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE) segundo metodologia descrita por Laemmli (1970). Devem ser testadas várias concentrações de acrilamida e proteínas dos PE/S, a fim de se obter a melhor separação e a melhor visualização das proteínas presentes nas amostras.

Para a aplicação nos géis, as proteínas são diluídas volume a volume em tampão (Tris-HCl 500 mM com pH 6,8; SDS-PAGE a 1%; 2-mercaptopetanol 128 mM; glicerol a 10%; e azul-de-bromofenol a 0,05%). As corridas são realizadas em temperatura ambiente, em minicubas, em razão da restrição na quantidade dos PE/S geralmente obtidos. O tampão de corrida é composto de Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM e SDS-PAGE a 0,1%, com pH 8,6. Padrões compostos de proteínas conhecidas devem ser incluídos em todas as corridas, a fim de serem usados na estimativa da massa molecular aparente das proteínas presentes nas amostras. Para melhor visualização das bandas proteicas, os géis devem ser corados com nitrato de prata. Outros métodos de purificação, como a eletroforese bidimensional, a cromatografia em colunas de Sephadex® e a cromatografia por afinidade, podem ser utilizados.

Avaliação da atividade proteolítica dos produtos de secreção e excreção das larvas

A atividade proteolítica dos PE/S das larvas pode ser testada em géis de poliacrilamida co-polimerizados com o substrato que se quer testar (gelatina, colágeno, hemoglobina, etc.). A metodologia descrita por Williams e Coombs (1995) pode ser adaptada para esses estudos, usando-se como substrato a gelatina. Os géis de SDS-PAGE são preparados em concentrações adequadas aos tamanhos das bandas proteicas presentes nos PE/S e já adicionados do substrato. As amostras sem tratamento prévio com inibidores de proteases são então diluídas em tampão da amostra (Tris-HCl 500 mM, com pH 6,8; SDS-PAGE a 1%; 2-mercaptopetanol 128 mM; glicerol a 10%; azul-de-bromofenol a 0,05%) e aplicadas ao gel. A eletroforese deve ser realizada a 4°C e, após a corrida, os géis devem ser incubados com *Triton X-100*® (2,5% v/v) a 37°C por cerca de 30min sob agitação. Os géis co-polimerizados com gelatina são incubados em tampão Tris-HCl com pH 8,15 contendo CaCl₂ 1 mM e ditiotreitol 1 mM, durante 15h a 37°C segund o metodologia descrita por Young et al. (1996).

As zonas de hidrólise são visualizadas com auxílio da coloração por negro de amido a 0,1% em metanol, ácido acético e água, na proporção de 30:10:60, por cerca de uma hora. Após esse período, os géis são descorados no mesmo solvente do corante.

Estudos da inibição da proteólise

Enzimas são sujeitas à inibição de sua ação por agentes moleculares que interferem com a catálise, diminuindo ou inibindo completamente as reações enzimáticas. Muitos produtos químicos atuam na inibição de enzimas. Um exemplo clássico é o ácido acetilsalicílico, que inibe a síntese de prostaglandinas, compostos envolvidos em muitos processos que produzem dor.

Ensaios em que se utilizam inibidores de proteases fornecem valiosas informações a respeito dos mecanismos de ação das enzimas. Os inibidores enzimáticos podem ser classificados em reversíveis e irreversíveis. A inibição do tipo reversível pode ser competitiva, incompetitiva ou mista. Os inibidores do tipo competitivo atuam concorrendo pelo sítio ativo da enzima, porque a sua estrutura molecular lembra a do substrato. Os inibidores incompetitivos se ligam a um sítio diferente do sítio ativo do substrato, alterando a cinética da reação. Os inibidores mistos podem se ligar tanto à enzima como ao complexo enzima–substrato.

Os inibidores irreversíveis são ferramentas importantes na pesquisa em farmacologia. Esses tipos de inibidores combinam-se com um grupo funcional na molécula da enzima e o destroem ou formam com ele uma ligação covalente bastante estável. O maior incentivo na pesquisa de inibidores de proteases é que o controle dessas enzimas é um princípio farmacológico eficaz no tratamento de várias doenças.

Assim, ensaios em que se utilizam gel de poliacrilamida e substratos específicos servem para caracterizar a inibição da atividade proteolítica das enzimas presentes em quaisquer PE/S. Nesses ensaios, vários inibidores sintéticos de proteases podem ser usados e seu efeito analisado.

Para estudo dos PE/S de larvas de dípteros empregam-se vários desses inibidores sintéticos, tais como fluoreto de fenilmetsulfonila (PMSF), 3,4 dicloroisocumarina (3,4 DCI), tosil-lisil-clorometil cetona (TLCK), tosil-fenilalanil-clorometil cetona (TPCK) e elastatinal, inibidores de serinoproteases; etilenodiaminotetraacetato (EDTA), inibidor de metalo-proteases; e E-64, inibidor de

cisteínopeptidases. Cada uma dessas substâncias apresenta atividade contra uma classe específica de enzimas, o que torna possível, por meio da interpretação dos resultados obtidos, classificar a atividade das enzimas purificadas.

Referências bibliográficas

- BARON, R. W.; COLWELL, D. D. Enhanced resistance to cattle grub infestation (*Hipoderma lineatum* de Vill.) in calves immunized with purified hypodermin A, B and C plus monophosphoryl lipid A (MPL). **Veterinary Parasitology**, v. 38, n. 2-3, p. 185-197, 1991.
- BELINSKAIA, V. Z. The permeability of the integument of first-stage larvae of *Hypoderma bovis* (De Geer) to amino acids labeled with radioisotopes. **Parazitologija**, v. 7, n. 2, p. 116-122, 1973.
- BOND, J. S.; BUTLER, P. E. Intracellular proteases. **Annual Review of Biochemistry**, v. 56, p. 333-364, 1987.
- BOWLES, V. M.; FEEHAN, J. P.; SANDEMAN, R. M. Sheep plasma protease inhibitors influencing protease activity and growth of *Lucilia cuprina* larvae in vitro. **International Journal of Parasitology**, v. 20, n. 2, p. 169-174, 1989.
- BRANT, M. P. R. C. **Análise bioquímica dos produtos de excreção secreção de larvas de *Dermatobia hominis***. 2004. 80f. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, 2004.
- CASU, R. E.; EISEMANN, C. H.; VUOCOLO, T.; TELLAM, R. L. The major excretory/secretory protease from *Lucilia cuprina* larvae is also a gut digestive protease. **International Journal of Parasitology**, v. 26, n. 6, p. 623-628, 1996.
- 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. **British Journal of Dermatology**, v. 148, n. 1, p. 14-23, 2003.
- HIBBS, M. S.; HASTY, K. A.; SEYER, J. M.; KANG, A. H.; MAINARD, C. L. Biochemical and immunological characterization of the secreted forms of human neutrophil gelatinase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 260, n. 4, p. 2493-2500, 1985.
- INNOCENTI, L.; MASETTI, M.; MACCHIONI, F.; GIORGI, F. Larval salivary gland proteins of the sheep nasal bot fly, (*Oestrus ovis* L.), are major immunogens in infested sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 60, n. 3-4, p. 273-282, 1995.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. **Nature**, v. 277, n. 5259, p. 680-685, 1970.

MUHARSHINI, S.; SUKARSIH, D.; RIDING, G.; PARTOUTOMO, S.; HAMILTON, S.; WILLADSEN, P.; WIJFFELS, G. Identification and characterization of the excreted/secreted serine protease of larvae of the Old World Screwworm Fly, *Chrysomya bezziana*. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 6, p. 705-714, 2000.

OLIVEIRA, M. C. S.; GIGLIOTTI, R. Avaliação “in vitro” do efeito de inibidores de proteases contra larvas de primeiro estágio de *Cochliomyia hominivorax*: estudos preliminares. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 15., 2008, Cutitiba. **Anais...** Curitiba: CBPV, 2008.

OLIVEIRA-SEQUERA, T. C. G.; AMARANTE, A. F. T. **Parasitologia animal: animais de produção**. Rio de Janeiro: EPUB, 2002. p. 20-23.

OLIVEIRA-SEQUERA, T. C. G.; SEQUEIRA, J. L.; SCHMITT, F. L.; LELLO, E. Histological and immunological reaction of cattle skin to first-instar larvae of *Dermatobia hominis*. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 10, n. 4, p. 323-330, 1996.

PRUETT, J. H. Proteolytic cleavage of bovine IgG by hypoermin A, a serine protease of *Hypodremma lineatum* (Diptera: Oestridae). **The Journal of Parasitology**, v. 79, n. 6, p. 829-833, 1993.

SANDEMAN, R. M.; FEEHAN, J. P.; CHANDLER, R. A.; BOWLES, V. M. Tryptic and chymotryptic proteases released by larvae of the blowfly, *Lucilia cuprina*. **International Journal of Parasitology**, v. 20, n. 8, p. 1019-1023, 1990.

TABOURET, G.; BRET-BENNIS, L.; DORCHIES, P.; JACQUIET, P. Serine protease activity in excretory-secretory products of *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae) larvae. **Veterinary Parasitology**, v. 114, n. 4, p. 305-314, 2003.

TABOURET, G.; PREVOT, F.; BERGEAUD, J. P.; DORCHIES, P.; JACQUIET, P. *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae): sheep humoral immune response to purified excreted/secreted salivary gland 28 KDa antigen complex from second and third instar larvae. **Veterinary Parasitology**, v. 101, n. 1, p. 53-66, 2001.

TELLAM, R. L.; EISEMANN, C. H.; PEARSON, R. D. Vaccination of sheep with purified serine proteases from the secretory and excretory material of *Lucilia cuprina* larvae. **International Journal of Parasitology**, v. 24, n. 5, p. 757-764, 1994.

WILLIAMS, A. G.; COOMBS, G. H. Multiple protease activities in *Giardia intestinalis* trophozoites. **International Journal of Parasitology**, v. 25, n. 7, p. 771-778, 1995.

YOUNG, A. R.; MEEUSEN, E. N. T.; BOWLES, V. M. Characterization of ES products involved in wound initiation by *Lucilia cuprina* larvae. **International Journal of Parasitology**, v. 26, n. 3, p. 245-252, 1996.

Literatura consultada

BEYNON, R. J.; BOND, J. S. (Ed.). **Proteolytic enzymes: a practical approach**. Oxford: Oxford University Press, 1996. 258 p.