

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**ANÁLISE BIOQUÍMICA DO PRODUTO DE SECREÇÃO/EXCREÇÃO DE LARVAS
DE *Cochliomyia hominivorax* (COQUEREL, 1858) (DIPTERA, CALLIPHORIDAE)**

Denise Gonçalves Teixeira

Orientadora: Prof^a Dr^a Lúgia Miranda Ferreira Borges

GOIÂNIA
2015



Termo de Ciência e de Autorização para Disponibilizar as Teses e Dissertações Eletrônicas (TE-DE) na Biblioteca Digital da UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás-UFG a disponibilizar gratuitamente através da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações – BDTD/UFG, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☒ Dissertação ☐ Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor: **DENISE GONÇALVES TEIXEIRA** E-mail: **denisegteixeira@gmail.com**

Seu e-mail pode ser disponibilizado na página? ☒ Sim ☐ Não

Vínculo Empregatício do autor: **Não** Agência de fomento: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

País: **BRASIL** UF: **GOIÁS** CNPJ: Sigla: **CAPE**

Título: **ANÁLISE BIOQUÍMICA DO PRODUTO DE SECREÇÃO/EXCREÇÃO DE LARVAS DE Cochliomyia hominivorax (COQUEREL, 1858) (DIPTERA, CALLIPHORIDAE)** Palavras-chave: **Díptero, enzima, parasitos, mosca, miíase.**

Título em outra língua: **BIOCHEMISTRY ANALYSIS OF THE SECRETION PRODUCT / EXCRETION OF Cochliomyia hominivorax LARVAE (COQUEREL, 1858) (DIPTERA, CALLIPHORIDAE)**

Palavras-chave em outra língua: **Diptera, enzyme, parasites, fly, myiasis.**

Área de concentração: **Sanidade Animal, Higiene e Tecnologia de Alimentos** Data defesa: (dd/mm/aaaa) **03/07/2015**

Programa de Pós-Graduação: **Ciência Animal**

Orientador(a): **Lígia Miranda Ferreira Borges** E-mail: **borges.ligia@gmail.com**

Co-orientador(1): **Thiago de Araújo Mastrangelo** E-mail: **thiagomastangelo@gmail.com**

Co-orientador(2): **Valdirene Neves Montelro** E-mail: **montelro.valdirene@gmail.com**

3. Informações de acesso ao documento:

Liberação para disponibilização? ☒ total ☐ parcial

Em caso de disponibilização parcial, assinale as permissões:

[] Capítulos. Especifique:

[] Outras restrições:

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, toma-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O Sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Goiânia 26 de outubro de 2015

Denise Gonçalves Teixeira
Assinatura do(a) autor(a)

¹ Em caso de restrição, esta poderá ser mantida por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Todo resumo e metadados ficarão sempre disponibilizados.

DENISE GONÇALVES TEIXEIRA

**ANÁLISE BIOQUÍMICA DO PRODUTO DE SECREÇÃO/EXCREÇÃO DE LARVAS
DE *Cochliomyia hominivorax* (COQUEREL, 1858) (DIPTERA, CALLIPHORIDAE)**

Dissertação apresentada para obtenção
do grau de Mestre em Ciência Animal
junto à Escola de Veterinária e Zootecnia
da Universidade Federal de Goiás.

Área de Concentração:

Sanidade Animal, Higiene e Tecnologia de Alimentos

Orientadora:

Prof^a Dr^a Lígia Miranda Ferreira Borges

Comitê de orientação:

Dr. Thiago de Araújo Mastrangelo

Dra. Valdirene Neves Monteiro

GOIÂNIA

2015

Ficha catalográfica elaborada automaticamente
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob orientação do Sibi/UFG.

Gonçalves Teixeira, Denise

ANÁLISE BIOQUÍMICA DO PRODUTO DE SECREÇÃO/EXCREÇÃO
DE LARVAS DE *Cochliomyia hominivorax* (COQUERÉL, 1858)
(DIPTERA, CALLIPHORIDAE) [manuscrito] / Denise Gonçalves
Teixeira. - 2015.

XLII, 42 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Lígia Miranda Ferreira Borges; co-orientador
Dr. Thiago de Araújo Mastrângelo; co-orientador Dr. Valdirene Neves
Monteiro.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Escola de
Veterinária e Zootecnia (EVZ), Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal, Goiânia, 2015.

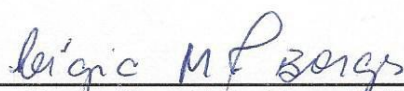
Bibliografia.

Inclui abreviaturas, gráfico, lista de figuras.

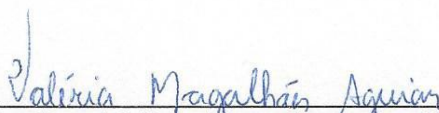
1. Díptero. 2. Enzima. 3. Parasito. 4. Mosca. 5. Miíase. I. Miranda
Ferreira Borges, Lígia, orient. II. de Araújo Mastrângelo, Thiago, co
orient. III. Título.

Denise Gonçalves Teixeira

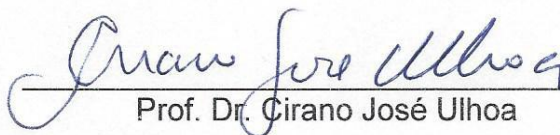
Dissertação defendida e aprovada em **03/07/2015**, pela Banca Examinadora constituída pelos professores:



Profa. Dra. Lígia Miranda Ferreira Borges
(ORIENTADOR (A))



Profa. Dra. Valéria Magalhães Aguiar - UNIRIO



Prof. Dr. Cirano José Ulhoa

Àqueles que se sacrificam em prol do conhecimento e não se deixam subverter em meio às
dificuldades que surgem no caminho, dedico.

AGRADECIMENTOS

Sou grata a Deus e minha família por me sustentarem durante essa caminhada. Aos meus pais Osvander e Aparecida pela compreensão, amor e apoio incondicionais. À minha irmã Daniela pelo companheirismo e ajuda de sempre. Às minhas sobrinhas Sofia e Larissa pela alegria proporcionada no decorrer dos dias, sobretudo naqueles de forte desânimo.

À minha orientadora Lígia, por ter me acolhido em seu laboratório, pela compreensão nos momentos difíceis, pela disposição de ajudar sempre que precisei, pela paciência, muito obrigada.

À Val por ter acreditado em mim, por ter sido a minha “fada madrinha”, com quem pude contar sempre, uma pessoa que tive a honra de conviver e aprender não só sobre bioquímica, mas sobre a vida. Obrigada Valzinha, por ser essa pessoa que tanto admiro.

Ao meu coorientador que hoje posso chamar de amigo, Thiago Mastrangelo, por todos os ensinamentos, que foram muitos e em diversas áreas. Pela sabedoria e incentivo ao dizer sempre que fé e trabalho duro resolvem tudo... Por ser pra mim um exemplo de pesquisador e de amigo.

Aos meus amigos Lorena, Jaires, Alex e Marcelo. Vocês são os melhores colegas de laboratório que eu poderia ter! Obrigada pelo privilégio de ter vocês por perto durante esses dois anos, obrigada pela ajuda de sempre, vocês são muito especiais. E agradeço também por terem suportado o cheiro ruim da salinha nos dias de período larval, e, por conseguinte, terem me suportado!

Aos amigos que fiz durante minha passagem pelo laboratório de enzimologia, Cirano, Juliana, Stéphanie, Marcela, Paulo, Kênia, Alonso, Eva, Bianca, Gabi, obrigada pelos ensinamentos e acolhimento.

Às minhas amigas da “preventiva” Bárbara, Ana Maria, Samantha, Rebeka, Gisele, Adriana, Nazareth, por fazerem parte do meu “ponto de apoio” e que estiveram presentes nesta caminhada, me ajudando de várias formas.

À Universidade Federal de Goiás e ao Programa de Pós Graduação em Ciência animal pela oportunidade de estudar e realizar essa pesquisa.

Ao Djalma do Centro de Manutenção de Equipamentos, não só por ter consertado várias vezes a estufa com que eu trabalhava e consequentemente ter salvado minha colônia, mas também pela sua pronta disposição em ajudar sempre que eu precisei.

Ao pessoal da UNIRIO, professora Valéria, Dri, Rafa, Andreia, Débora, obrigada por me receberem com tanto carinho e me ensinarem sobre a criação de califórdeos com tamanha dedicação. Tenho certeza que além de adquirir conhecimento, ganhei amigos nesse período em que convivi com vocês.

Ao Sebo Hidolândia (Fuga Couros), em especial ao gerente Clauton por doar a farinha de sangue pro meu experimento.

À minha família em geral pelo apoio e doação de recipientes de polietileno (principalmente tia Eugênia), aos meus primos Deyvid e Kellen por me ajudarem na confecção das gaiolas de criação, caixas de pupação e caixas entomológicas.

Ao pessoal da segurança da Escola de Veterinária e Zootecnia - UFG que sempre esteve presente e disposto a ajudar, principalmente nos trabalhos noturnos e em finais de semana.

Ao pessoal da limpeza, que tinha que “sobreviver” ao cheiro forte exalado principalmente nos dias de período larval. Em especial à Raquel, que num certo dia me perguntou se não tinha nenhum “bicho morto” dentro da sala.

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

À professora Cíntia Minafra e Andréia Santana da secretaria do Programa de Pós Graduação em Ciência Animal por terem sido sempre solícitas e empenhadas a ajudar no que fosse necessário. Vocês fazem a diferença neste programa.

Aos funcionários da UFG e àquelas pessoas que de algum modo fizeram parte deste trabalho e que por algum motivo não foram citadas.

E a todos aqueles que, de alguma forma dificultaram o caminho, ofereço uma máxima de José Saramago: “Das habilidades que o mundo sabe, essa ainda é a que faz melhor: dar voltas”.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Definição de miíase e principais espécies causadoras.....	3
2.2 <i>Cochliomyia hominivorax</i> : biologia, distribuição e importância	4
2.3 Produtos de excreção/secreção (PE/S)	5
3. OBJETIVO	10
3.1 Objetivo geral.....	10
3.2 Objetivos específicos.....	10
4. MATERIAL E MÉTODOS	11
4.1 Local e duração do experimento	11
4.2 Obtenção de larvas de <i>C. hominivorax</i>	11
4.3 Manutenção da colônia	11
4.3.1 Dieta para adultos.....	12
4.3.2 Período de cópula e oviposição	12
4.3.3 Dieta larval	13
4.4 Obtenção dos produtos de excreção/secreção de larvas de <i>C. hominivorax</i>	14
4.5 Dosagem de proteínas dos produtos de excreção/secreção	15
4.6 Ensaios enzimáticos	16
4.6.1 Ensaio para atividade de proteases totais	16
4.6.2 Efeito de inibidores de proteases sobre a clivagem da azocaseína	16
4.6.3 Ensaio para atividade de tripsina	17
4.6.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	17
4.7 Coloração dos géis	18
4.7.1 Prata.....	18
4.7.2 Coomassie Blue.....	18
4.8 Zimograma	18
4.9 Efeito dos inibidores de proteases sobre os produtos de excreção/secreção de larvas de <i>C. hominivorax</i>	19

4.10	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	20
5.	RESULTADOS	21
5.1	Ensaio para atividade de proteases totais.....	21
5.2	Efeito dos inibidores de proteases sobre a clivagem da azocaseína	21
5.3	Ensaio para atividade de tripsina.....	23
5.4	SDS-PAGE dos PE/S de larvas de <i>C. hominivorax</i>	23
5.5	Zimograma dos PE/S de larvas de primeiro, segundo e terceiro estádios.....	24
5.6	Efeito de inibidores de proteases sobre o padrão de hidrólise do PE/S de larvas de <i>C. hominivorax</i>	26
6.0	DISCUSSÃO	28
7.0	CONCLUSÕES.....	33
8.0	REFERÊNCIAS.....	34

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – A- Gaiola de madeira e tela metálica (tipo mosquiteiro) com dimensões de 55 x 55 x 55 cm³ utilizada no início do estabelecimento da colônia. B- Gaiola de madeira e tela metálica com dimensões de 30 x 30 x 30 cm³ utilizada nos últimos seis meses de criação da mosca *C. hominivorax*

FIGURA 2 – A- Substrato de oviposição (dieta larval podre adicionada de sangue suíno citratado) acondicionados em tampas plásticas e aquecidos a 120 °C em estufa. B- Massas de ovos depositadas sobre o papel filtro e nas paredes laterais da tampa plástica.

FIGURA 3 – Dieta larval a base de Agar nutriente contendo cerca de 10 g de carne bovina moída para permitir eclosão de larvas de primeiro estágio (L1).

FIGURA 4 – A- Larvas de terceiro estágio incubadas em água milli-Q estéril contendo 1% de antibiótico. B- Produto da incubação das larvas de *C. hominivorax* após centrifugação – *pellet* e sobrenadante.

FIGURA 5 – Atividade proteolítica dos PE/S de larvas de primeiro, segundo e terceiro estádios (L1, L2 e L3) de *C. hominivorax* sobre a azocaseína em diferentes faixas de pH. Cada marcador indica a média da absorvância obtida nas duplicatas. Letras iguais representam que não houve diferença estatística significativa entre as médias (ANOVA seguida de Scott-Knott, $p < 0,05$).

FIGURA 6 – Taxa de inibição da atividade proteolítica obtidos pela incubação da azocaseína com os PE/S de L1 (A), L2 (B), L3 (C) tratados com diferentes inibidores de proteases. Cada marcador indica a média da taxa de inibição obtida com a incubação dos inibidores. Letras

minúsculas iguais representam que não houve diferença estatística significativa entre as médias (ANOVA seguida de Scott-Knott, $p < 0,05$).

FIGURA 7 – Ensaio de atividade especificados PE/S de larvas de primeiro, segundo e terceiro estágio (L1, L2 e L3) sobre o substrato BAPNA ao longo de quatro horas.

FIGURA 8 – Perfil proteico dos produtos de excreção/secreção de larvas de primeiro, segundo e terceiro estádios (L1, L2 e L3) de *C. hominivorax*. Marcador molecular (M) e padrão de peso molecular aparente (kDa) indicado à esquerda (SDS-PAGE – Coomassie Blue/Prata).

FIGURA 9 – Gel de atividade proteolítica dos PE/S de larvas de *C. hominivorax*. (A): 10 µg; (B): 20 µg; (C): 30 µg; (D): 50 µg. a- L1, b- L2, c- L3.

FIGURA 10 – Efeito dos inibidores de proteases sobre a atividade proteolítica dos PE/S de larvas de primeiro, segundo e terceiro estádios (L1, L2 e L3) de *C. hominivorax*. Amostra não tratada - controle: (A). Amostras tratadas com inibidores: (B):Benzamidina; (C):Pepstatin A; (D): AEBSF; (E):TLCK; (F):TPCK; (G): EDTA; (H): Leupeptina; (I): E-64.

LISTA DE ABREVIATURAS

AEBSF: 4-(2-*aminoetil*)*benzenosulfonil* fluoreto hidrocloreto

ANOVA: Análise de variância

BAPNA: N- α -benzoil-L-anginil-p-nitroanilida

BOD: Demanda Bioquímica de Oxigênio

CaCl₂: Cloreto de Cálcio

CPV: Centro de Parasitologia Veterinária

DTT:Ditiotreitol

E-64: Trans-epoxysuccinyl L-leucylamido-4-guanidino butano

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra acético

EVZ: Escola de Veterinária e Zootecnia

g: Força centrífuga

IgG: Imunoglobulina G

kDa: kilo Daltons

M: Molar

mM: Milimolar

nm: Nanômetros

SDS:Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida

T: Temperatura

TCA: Ácido tricloroacético

TLCK: N- α -tosil-L-lisina clorometil cetona

TPCK: N- α -tosil-L-fenilalanina clorometil cetona

UFG: Universidade Federal de Goiás

UP: Unidade de atividade proteolítica

UR: Umidade Relativa

UV: Ultravioleta

V: Volt

v/v: Volume por volume

W: Watt

μ g: Microgramas

μ L: Microlitros

RESUMO

Cochliomyia hominivorax (COQUEREL, 1858), conhecida popularmente como mosca da bicheira, é um díptero pertencente à família Calliphoridae. Suas larvas são parasitos obrigatórios de animais de sangue quente e sua área de distribuição estende-se por toda a América Latina. Alguns estudos realizados com dípteros que produzem miíases chegaram à conclusão que a produção de enzimas digestivas excretadas e secretadas pelas larvas tem participação crucial para o estabelecimento e a sobrevivência desses parasitos nos hospedeiros. Devido à falta de estudos com esta abordagem em *C. hominivorax*, este trabalho teve como objetivo caracterizar e classificar as enzimas presentes na excreção e secreção das larvas desta mosca, analisando seu perfil bioquímico. Para a execução do mesmo, foi estabelecida uma colônia dessa espécie em condições de laboratório, para colheita do material necessário para a análise. Essa colônia foi estabelecida por meio da obtenção de larvas de terceiro estágio presentes em animais naturalmente infestados, e a partir do cultivo dessas, foram obtidas as larvas de primeiro, segundo e terceiro estádios. A análise do perfil proteico dos produtos de excreção e secreção (PE/S) foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida e a atividade proteolítica foi analisada utilizando gelatina, azocaseína e N-a-benzoil-arginina-nitroanilida como substratos. Nos PE/S dos três estádios foram detectadas proteínas com peso molecular aparente que variou entre 116 e 20 kDa. No ensaio com azocaseína em diferentes faixas de pH observou-se que a maior atividade proteolítica ocorre em pH 7,5 para todos os estádios larvais. Para caracterização das enzimas foram realizados ensaios utilizando estes mesmos substratos, nos quais as amostras foram tratadas com os inibidores Benzamidina, Pepstatin A, AEBSF, TLCK, TPCK, EDTA, Leupeptina e E-64. As proteinases presentes no PE/S de L1 são em sua maioria serina proteases do tipo tripsina e quimotripsina, enquanto que para os PE/S de L2 e L3 foi evidenciada a presença de serina proteases e aspartil proteases.

Palavras chave: Díptero, enzima, parasitos, mosca, miíase.

ABSTRACT

The species *Cochliomyia hominivorax*, popularly known as screwworm fly, is a Diptera belonging to the family Calliphoridae. Its larvae are obligated parasites of warm-blooded animals and its geographic range extends throughout Latin America. Some studies accomplished with flies that produce myiasis concluded that the production of digestive enzymes secreted and / or excreted by the larvae has crucial contribution to the establishment and survival of these parasites in the host. Due to the lack of information approaching this subject on *C. hominivorax*, this project aimed to characterize and classify the enzymes in the secretion and excretion (S/E) of the larva of this fly, analyzing its biochemical profile. A colony of this species was established in laboratory conditions in order to accomplish this study. The colony was established by obtaining third instar larvae (L3) on naturally infested animals, and from the cultivation of these was obtained first (L1), second (L2) and third (L3) larvae instars,. The profile of proteins of S/E was obtained by polyacrylamide gel electrophoresis and proteolytic activity was analyzed using gelatin, azocasein and Na-benzoyl-arginine-nitroanilide as substrate. In S/E of the three instars proteins were detected with an apparent molecular weight ranging between 116 and 20 kDa. In the azocasein assay, at different pH ranges, it was observed that the major proteolytic activity occurs at pH 7.5 for all larvae instars. For characterization of the enzyme, assays were performed using these same substrates in which the samples were treated with inhibitors Benzamidine, Pepstatin A, AEBSF, TLCK, TPCK, EDTA, leupeptin and E-64. Proteinases present in the E/S of L1 are mostly serine proteases trypsin and chymotrypsin, whereas for L2 and L3 the presence of serine proteases and aspartyl proteases were observed.

Keywords: Diptera, enzyme, parasites, fly, myiasis.

1. INTRODUÇÃO

Cochliomyia hominivorax é um dos principais parasitos que causam injúria na população de animais em países Sul Americanos, exceto no Chile¹. O parasitismo por *C. hominivorax* é de caráter obrigatório no período larval, suas larvas se desenvolvem em tecidos vivos de hospedeiros vertebrados, causando as miíases, que são caracterizadas por gerarem irritação, febre, crescimento reduzido, e em infestações graves podem levar até a morte². As miíases provocadas por larvas dessa mosca apresentam grande morbidade e mortalidade, sobretudo em animais domésticos como bovinos e ovinos, acarretando grandes prejuízos econômicos ao agronegócio³. Os seres humanos também são parasitados, sendo a doença comum em áreas rurais e urbanas, atingindo com mais frequência indivíduos com distúrbios psiquiátricos^{4,5}, etilistas crônicos⁶, desnutridos, imunodeprimidos, e pessoas com precários hábitos de higiene corporal e de baixo grau de instrução⁷, contudo, podem ocorrer também em indivíduos saudáveis. Em reservas ecológicas, parques florestais e zoológicos, animais selvagens também são parasitados por esse díptero, tais como veados, tatus, tamanduás, pacas, elefantes, lobos marinhos, avestruzes e várias espécies de felinos⁸.

A espécie *C. hominivorax* é holometábola, ou seja, tem metamorfose completa. Em temperaturas médias de 22°C, o ciclo de vida ocorre em aproximadamente 24 dias, porém, dependendo das condições ambientais, este pode se estender até por 50 dias. As fêmeas depositam seus ovos em bordas de ferimentos ou nas mucosas de animais nas primeiras 24 horas, as larvas eclodem e começam a se alimentar dos fluidos corporais e tecidos vivos do hospedeiro⁹. Cada fêmea coloca em média 200 ovos (variando de 10 a 500) e quando atraída pelo odor característico de feridas já infestadas, pode levar a infestações com centenas ou milhares de larvas, sendo capaz de ocasionar a morte do hospedeiro¹⁰. As larvas completam seu desenvolvimento em um período que varia entre quatro a oito dias, dependendo das condições ambientais. Abandonam a ferida e em seguida se enterram para transformarem-se em pupas¹¹. Os adultos emergem em aproximadamente oito dias, estando prontos para copular após os primeiros três dias.

Em estudos com vários dípteros que produzem miíases verificou-se que a produção de enzimas digestivas secretadas e/ou excretadas pelas larvas é responsável pelo estabelecimento e sobrevivência desses parasitos nos hospedeiros¹². Dessa forma, vários pesquisadores investigaram essas substâncias secretadas e/ou excretadas por larvas de dípteros que produzem miíases. Alguns utilizam os resultados para fins de desenvolvimento de vacinas contra esses parasitos, pois, até o presente momento, não foram desenvolvidas vacinas

comerciais que ofereçam proteção contra as miíases¹³, outros usam as informações obtidas para investigar a dinâmica desse parasita no hospedeiro em questão.

Sabe-se que larvas de *C. hominivorax* produzem enzimas proteolíticas que servem como agentes facilitadores da sua manutenção no hospedeiro, digerindo o tecido, fazendo com que tenham maior facilidade para penetrar na pele do animal que estão parasitando. Existe um interesse na investigação de enzimas proteolíticas nos diferentes sistemas biológicos, pois há a possibilidade de que estas possam constituir um alvo potencial para produção de drogas e de imunógenos¹⁴. No entanto, estes estudos são ainda incipientes para grande parte dos dípteros causadores de miíases, principalmente para *C. hominivorax*, o que torna importante a realização de pesquisas com esta mosca, já que esta é uma espécie presente no Brasil e que causa danos consideráveis aos animais e consequentemente à economia.

Diante do exposto acima, faz-se necessário um estudo mais aprofundado sobre as substâncias presentes no produto da secreção e/ou excreção das larvas de *C. hominivorax*, possibilitando a caracterização e classificação das proteases presentes nessas substâncias. A análise do perfil bioquímico dessas substâncias além de auxiliar na ampliação do conhecimento sobre o mecanismo parasitário, pode gerar aplicação dessas enzimas no contexto da Medicina Veterinária e Humana.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Definição de miíase e principais espécies causadoras

Miíase é definida como a infestação por larvas histiófagas de dípteros (moscas) em hospedeiros vertebrados, que encontram em tecidos vitalizados (biontófagas) ou necróticos (necrobiontófagas) fonte nutricional para seu desenvolvimento e reserva energética para a fase de pupa. Atualmente, as miíases podem ser vistas sob dois aspectos: clínico ou parasitológico. Na primeira, a classificação está fundamentada nos locais do corpo do hospedeiro onde as larvas se instalam ou são encontradas, assim sendo designadas como cutâneas, cavitárias (nasofaríngeal, ocular e urogenital) ou intestinais. Quanto ao aspecto parasitário, a infestação pode ser classificada como do tipo obrigatória, facultativa e acidental (quando leva em conta a biologia do inseto) ou primária e secundária. No caso das miíases obrigatórias (primárias), os imaturos se desenvolvem exclusivamente em tecidos vivos de animais, não possuindo outra fonte de recurso alimentar, ou seja, não sobreviveriam se não parasitassem um hospedeiro, enquanto que nas miíases facultativas (secundárias) as larvas podem se desenvolver a partir de tecido necrosado do hospedeiro ou decarças encontradas na natureza¹⁵⁻¹⁷.

Além de *C. hominivorax*, estão entre as principais espécies causadoras de miíases: *Chrysomya bezziana*, *Lucilia cuprina*, *Lucilia sericata*, *Dermatobia hominis*, *Hypoderma bovis*, *Hypoderma lineatum*, *Oestrus ovis*, *Gasterophilus nasalis*, *Gasterophilus intestinalis* e *Sarconesiopsis magellanica*. A espécie *C. bezziana* conhecida também como “bicheira do velho mundo”, causa miíase ulcerativa/traumática de caráter obrigatório, suas larvas são biontófagas. Está distribuída pela Índia, Península Arábica, Indonésia, Filipinas e Nova Guiné, não ocorrendo no Brasil. Tem como hospedeiros os ovinos e humanos¹⁸. *L. cuprina* é classificada por produzir miíase de caráter facultativo. Tem sua distribuição mais concentrada na África do Sul e Austrália, mas pode ser encontrada em outras partes do mundo, inclusive no Brasil. O mecanismo de infestação se dá por meio da deposição de ovos em cadáveres, em feridas negligenciadas e supuradas, ou ainda, em particular, sobre a lã de ovelhas que possam estar sujas com urina, fezes ou sangue. Pode causar miíase secundária em humanos¹⁹. *L. sericata* causadora de miíase usualmente de caráter benigno, é conhecida principalmente por sua utilização em terapia larval, alimentando-se de tecido necrosado, é usada em resposta à busca de métodos adequados para controlar infecções de feridas crônicas^{20,21}. *D. hominis* causa miíase de caráter obrigatório. Suas larvas são biontófagas e a forma furuncular é a mais comum. Entre os hospedeiros estão humanos, bovinos, suínos, cães, gatos, cavalos, ovelhas,

outros mamíferos e algumas aves^{22,23}. *H. bovis* e *H. lineatum* são duas espécies de grande distribuição no Hemisfério Norte, onde causam prejuízos semelhantes aos determinados pela *D. hominis* na América tropical. Suas larvas são biontófagas, causando miíase obrigatória em ruminantes domésticos e selvagens e a infestação humana ocorre mais frequentemente em pessoas que estão em estreita proximidade com o gado²⁴. *O. ovis* é uma espécie cosmopolita, suas larvas são biontófagas e causam miíase cavitária de caráter obrigatório. Tem como hospedeiros ovinos, caprinos, e ocasionalmente humanos²⁵. As larvas do gênero *Gastrophilus* são parasitos obrigatórios do trato gastrintestinal de eqüídeos, causando a gasterofilose. Localizam-se no estômago de eqüinos e são eliminadas com as fezes²⁶. *S. magellanica* é uma mosca varejeira de importância médica e forense, suas larvas são necrobiontófagas e é uma espécie que tem sido relatada em vários países como Argentina, Bolívia, Chile, Colômbia, Equador e Peru²⁷ e inclusive em localidades que vão de 1.200 a 3.100 metros acima do nível do mar²⁸.

2.2 *Cochliomyia hominivorax*: biologia, distribuição e importância

A espécie *C. hominivorax* faz parte da família Calliphoridae, Ordem Diptera e é classificada como agente causador de miíase primária obrigatória em animais de sangue quente. É biontófaga, se desenvolvendo exclusivamente nos tecidos vivos de animais vertebrados, e é conhecida vulgarmente como “mosca da bicheira”. Atualmente sua distribuição se estende por toda a América Latina, desde o México até o Norte do Chile e Argentina²⁹.

C. hominivorax, antes de atingir a fase adulta, passa pelos estágios de ovo, larva, pupa e adulto. O desenvolvimento larval inclui três estádios (L1, L2 e L3) cuja duração desde a eclosão até o abandono do hospedeiro para evoluir ao estágio de pupa leva cerca de quatro dias. Fêmeas grávidas fazem suas posturas ao redor de feridas ou lesões existentes nos animais e, após eclosão, as larvas de primeiro estágio adentram o interior destas feridas, de modo a se alimentar de líquidos provenientes de exsudato inflamatório, no caso das larvas de primeiro estágio, e do próprio tecido vivo, no caso de larvas de segundo e terceiro estádios. Após completarem seu desenvolvimento, larvas maduras abandonam o hospedeiro e caem no solo para pupar. Aproximadamente após oito dias há a emergência dos adultos. Sob condições ideais de temperatura e umidade, todo o ciclo de vida pode ser completado em apenas 14 dias, podendo levar a epidemias³⁰.

Em condições de laboratório observa-se que as posturas se iniciam do 7º ao 8º dia de vida e variam de 88 a 330 ovos, com média de 191,10 ovos. O período de incubação dos ovos varia de 14 a 18 horas a 27°C e 80,00 a 90,00% de umidade relativa, sendo a média de eclosão de 99,68%. O período larval varia de 3 a 4 dias, tendo 8,26% abandonado o meio a partir do 3º dia, 89,10% no 6º dia e 2,64% no 5º dia. Vinte e quatro horas após eclosão, 61,00% das larvas foram L2, e 48 horas após 50,00% foram L3. O período pré-pupa varia entre 12 a 36 horas com média de 24 horas, a emergência dos adultos ocorre entre 6 a 10 dias com média de 7,3 dias, a razão sexual de 1:1 entre machos e fêmeas foi constatada na criação artificial. Entre o 2º e 3º dia após a emergência inicia-se a cópula, entretanto, em temperatura de 10°C as fêmeas morrem antes de copular. Os machos apresentam-se aptos a cópula entre o 4º e 6º dia pós-emergência¹⁶.

A condição climática em grande parte do Brasil, durante maior parte do ano é bastante favorável para as infestações por este parasito, como já descrito por vários autores³¹⁻³³.

O parasitismo por *C. hominivorax* provoca alterações clínicas³⁴ hematológicas e bioquímicas em bovinos^{35,36}.

No Brasil, a pecuária possui expressiva importância econômica; é caracterizada como extensiva e ocupa grandes áreas. Nestas condições, a miíase causada pela mosca *C. hominivorax* destaca-se por acarretar prejuízos à bovinocultura, principalmente como agente nas miíases umbilicais dos bezerros recém-nascidos, bem como diminuindo a produção leiteira e os índices de fertilidade, reduzindo a taxa de conversão alimentar e o ganho de peso, podendo, eventualmente, levar os animais infestados à morte. No Brasil, os prejuízos causados por esta mosca, ocorridas pela queda de produtividade, pelos custos dos medicamentos para o tratamento como também pela mão de obra para o manejo dos animais susceptíveis e/ou doentes somam 340 milhões de dólares por ano³⁷.

2.3 Produtos de excreção/secreção (PE/S)

As proteases ou enzimas proteolíticas são substâncias que catalisam a quebra das ligações peptídicas das proteínas³⁸. Estas enzimas têm sido identificadas em diferentes sistemas biológicos, desde vírus até vertebrados. Enzimas proteolíticas de invertebrados tem sido alvo de muitos estudos e uma atenção especial tem sido direcionada para o grupo das tripsinas por estas fazerem parte de uma série de processos fisiológicos, desempenhando um papel importante na hidrólise de proteínas alimentares³⁹⁻⁴¹. Os estudos de sequenciamento genômico têm revelado que as proteases correspondem a aproximadamente 2% dos genes

expressos e que elas apresentam pequenas variações entre os organismos. Estas proteínas apresentam massas que variam de monômeros de 10 kDa a complexos de várias centenas de kDa. De acordo com a natureza da atividade catalítica utilizada no processo de hidrólise, as proteases são classificadas nos seguintes grupos: serina proteases, aspartato proteases, treonina proteases, metalo proteases e cisteína proteases⁴².

Proteases estão sujeitas à inibição de sua ação por agentes moleculares que interferem com a catálise, diminuindo ou inibindo completamente as reações enzimáticas. Ensaio 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, não competitiva 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 não competitivos 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/S¹⁴.

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 farmacêuticamente 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 membrana⁴³.

Os produtos de secreção e excreção de larvas de dípteros que causam miíases têm função primordial para o seu desenvolvimento nos hospedeiros, particularmente na nutrição e escape do sistema imune⁴⁴. Em geral as proteases presentes nos produtos de secreção e excreção são usadas para a digestão de nutrientes dentro e fora do tubo digestivo. Estas são alvos potenciais para diagnóstico e controle, incluindo vacinas ou outros fármacos que poderiam interromper a penetração ou desenvolvimento das larvas causadoras de miíases⁴⁵.

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

Estudos realizados com PE/S de larvas de primeiro estágio de *H. lineatum* culminaram com a caracterização de três proteases do grupo serina, denominadas hipodermina A (HA), hipodermina B (HB) e hipodermina C (HC) que são produzidas durante a migração das larvas de primeiro estágio e estão envolvidas na digestão extra-intestinal^{46,47}. A utilização dessas proteases purificadas na imunização de bovinos propiciou níveis de proteção superiores a 90%⁴⁸. Além de estarem envolvidas no desenvolvimento da resposta imune efetiva, verificou-se que algumas dessas proteases, principalmente HA, estão envolvidas nos mecanismos de evasão da resposta imune⁴⁹ tais como a clivagem de imunoglobulinas e degradação de proteínas do sistema de complemento⁵⁰ e inibição da proliferação de linfócitos⁵¹.

Kerlin e East⁵² demonstraram que o extrato total de secreção e excreção de *L. cuprina* tem a capacidade de suprimir a proliferação de linfócitos *in vitro* e a produção de anticorpos em ovelhas. Testes de diagnóstico utilizando extrato total de secreção e excreção foram usados para a seleção de ovelhas resistentes a infestação por *L. cuprina*⁵³. Outros estudos feitos com *L. cuprina*, verificaram que a maioria das proteases secretadas e/ou excretadas pelas larvas são do tipo serina proteases e incluem enzimas como tripsina, quimotripsina⁵⁴ e enzimas com atividade colagenolítica⁵⁵. A constatação de que a inibição dessas proteases pode provocar a morte das larvas e de que anticorpos contra essas moléculas podem afetar a sobrevivência das larvas “*in vitro*”⁵⁴ constituíram a base para que fosse avaliada a possibilidade de se utilizar essas proteases na imunização de animais. Com isso, CASU et al.⁵⁶ purificaram duas quimotripsinas a partir dos PE/S de larvas de primeiro estágio e verificaram que, embora essas proteases induzissem a uma significativa produção de anticorpos, essa resposta não foi capaz de prevenir a infestação dos animais imunizados. Outros estudos com PE/S de *L. cuprina* foram realizados para avaliar a atividade

antimicrobiana dessas substâncias produzidas pelas larvas e foi demonstrado que o extrato larval dessa espécie foi significativamente potente contra todas as bactérias testadas, principalmente contra *Pseudomonas aeruginosa*⁵⁷.

Uma caracterização bioquímica preliminar, em larvas de *O. ovis* utilizando gelatina-SDS-PAGE e análise da sensibilidade aos inibidores, demonstrou a presença de pelo menos seis principais serina proteinases, principalmente “tripsina-like”, secretadas do tubo digestório das larvas⁵⁸. Um teste de diagnóstico sorológico para a detecção da infecção provocada por *O. ovis* foi realizado por meio de reações antígeno-anticorpo detectáveis através de reações enzimáticas (ELISA) e foi usado para analisar e comparar a produção de imunoglobulina G (IgG) de anticorpos contra PE/S de todas as diferentes fases larvais nos soros de ovelhas adultas⁵⁹. Estudos utilizando PE/S de *G. nasalis* e *G. intestinalis* também foram realizados com esta perspectiva, no qual antígenos de larvas de segundo estágio se mostraram adequados para o diagnóstico de gasterofilose em equinos⁶⁰.

Estudos com *L. sericata* investigaram o efeito dos seus PE/S em fibroblastos utilizando modelos *in vitro*, com o colágeno e a fibronectina como substratos. Estes mostraram que o PE/S desempenha um papel importante em processos tais como a proliferação celular, remodelação e reepitelização do tecido⁶¹. Outros trabalhos seguindo essa linha de pesquisa foram feitos com PE/S de larvas de *S. magellanica* que revelaram pela primeira vez o efeito desses produtos sobre o comportamento dos fibroblastos. Os resultados demonstraram que há uma redução na adesão celular de fibronectina e colágeno devido a atividade proteolítica dos PE/S, o que promoveria a formação de um tecido novo dentro da ferida, além do aumento da migração de células e propagação de fibroblastos modificados, bem como o aumento da proliferação destes⁶². Pesquisas com essas duas espécies de moscas também foram feitas para avaliar a atividade antimicrobiana dos PE/S das larvas⁶³⁻⁶⁸. Para *S. magellanica* o PE/S das larvas teve atividade potente contra seis estirpes bacterianas avaliadas, correspondendo a três espécies (*Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*)⁶⁹. Um estudo preliminar feito recentemente avaliou a atividade antimicrobiana dos PE/S de larvas de terceiro estágio de três espécies de califorídeos brasileiros, *Chrysomya megacephala*, *Chrysomya albiceps* e *C. putoria* e os resultados deste estudo indicaram que esses califorídeos possuem fatores antibacterianos capazes de inibir *in vitro* tanto bactérias Gram-positivas como Gram-negativas⁷⁰.

No estudo feito por BRANT⁷¹, foram analisados os PE/S de larvas de *D. hominis*, chegando à conclusão de que nos produtos de larvas de primeiro estágio predominam proteases da classe metalo proteases, enquanto que as serina proteases predominam em larvas

de segundo e terceiro estádios. Nas larvas de terceiro estágio, a atividade de proteases do tipo tripsina mostrou-se mais expressiva.

Estudos com *C. hominivorax* são ainda incipientes. Um estudo sobre avaliação *in vitro* do efeito de inibidores de proteases contra larvas de primeiro estágio foi realizado e foi verificado um predomínio de enzimas do grupo das serina proteases e metalo proteases nesse estágio larvar⁷².

Devido à falta de informação sobre a caracterização de PE/S em larvas de *C. hominivorax*, que é no Brasil uma espécie causadora de miíases tão importante, este trabalho objetiva iniciar os estudos sobre a caracterização bioquímica desses produtos em cada estágio do desenvolvimento larval do parasita.

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

Analisar bioquimicamente o produto de excreção/secreção de larvas da espécie *C. hominivorax*, caracterizando e classificando as proteases presentes neste produto.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar por SDS-PAGE o perfil protéico dos produtos de excreção/secreção de larvas de primeiro, segundo e terceiro estádios de *C. hominivorax*;
- Investigar a atividade proteolítica dos PE/S de larvas de *C. hominivorax* em géis contendo gelatina como substrato;
- Caracterizar as proteases por meio do tratamento das enzimas com inibidores específicos de proteases em géis contendo gelatina como substrato;
- Avaliar a cinética e a inibição específica da proteólise dos PE/S das larvas em ensaios com substratos cromóforos e avaliar também essa atividade em diferentes faixas de pH.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local e duração do experimento

O experimento foi realizado no Centro de Parasitologia Veterinária da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás (CPV/EVZ/UFG) e no Laboratório de Enzimologia do Instituto de Ciências Biológicas II da Universidade Federal de Goiás, no período de fevereiro de 2014 a abril de 2015.

4.2 Obtenção de larvas de *C. hominivorax*

Larvas de terceiro estágio foram coletadas de animais naturalmente infestados, provenientes do Hospital Veterinário da UFG e colocadas em recipientes de polietileno contendo vermiculita e tampados com tecido voil até a pupação. No terceiro dia após pupação, as pupas foram colocadas em gaiolas até a emergência dos adultos. Além destas larvas, para implementar a colônia, foram utilizados cerca de 85 mL de pupas provenientes de uma colônia de *C. hominivorax* já estabelecida na Universidade Estadual de Campinas. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais - UFG pelo protocolo de número 006/14.

4.3 Manutenção da colônia

No início do estabelecimento da colônia, foi utilizada uma gaiola confeccionada em madeira e tela metálica com dimensões de 55 x 55 x 55 cm³ (Figura 1-A). Nos últimos seis meses de criação foi utilizada uma gaiola fabricada com os mesmos materiais da gaiola inicial, mas com dimensões de 30 x 30 x 30 cm³ (Figura 1-B). A gaiola maior foi substituída para que um número menor de moscas fosse necessário para manter a colônia, diminuindo assim a quantidade de dieta e a mão de obra para mantê-la. Foi utilizada uma densidade de 0,17 moscas/cm² de moscas de acordo com Mastrangelo³⁰. Sobre o piso da gaiola foram colocadas folhas de jornal ou papel toalha para evitar que com o decorrer do tempo de vida de uma geração, as moscas ficassem presas a dejetos produzidos por elas mesmas, mantendo a limpeza da gaiola.



FIGURA 1 – A- Gaiola de madeira e tela metálica (tipo mosquiteiro) com dimensões de 55 x 55 x 55 cm³ utilizada no início do estabelecimento da colônia. B- Gaiola de madeira e tela metálica com dimensões de 30 x 30 x 30 cm³ utilizada nos últimos seis meses de criação da mosca *C. hominivorax*.

4.3.1 Dieta para adultos

No primeiro dia após a emergência, as moscas foram alimentadas com água destilada, solução de mel (50%) e raspas de rapadura. Placas de Petri (60 x 15 mm) foram utilizadas para acondicionar cada um desses substratos e em cada uma delas, foram dispostas tiras de tecido voil para que as moscas não se aderissem à dieta, nem se afogassem na água. No terceiro dia após a emergência, aproximadamente 2g de ovo em pó (Luz Alimentos[®]) foram adicionados à solução de mel (50%). Os substratos foram trocados diariamente.

4.3.2 Período de cópula e oviposição

O substrato de oviposição consistiu em uma mistura de dieta larval putrefata obtida com farinha de carne (Fuga Couros – Sebo Hidrolândia) e sangue suíno citratado (Frigorífico Suíno). Essa mistura era colocada em recipientes plásticos, cobertas com papel filtro (que serviu para oferecer melhor adesão e superfície para as moscas oviporem, além de facilitar a retirada das massas de ovos) e aquecidas em estufa a 120 °C por 15 minutos. Logo em seguida foram levadas à gaiola e deixadas por aproximadamente cinco horas. Após esse período, os recipientes com os ovos foram retirados das gaiolas e, com o auxílio de uma

lâmina de estilete, as massas de ovos foram descoladas do substrato e das paredes da tampa e colocadas na dieta larval.

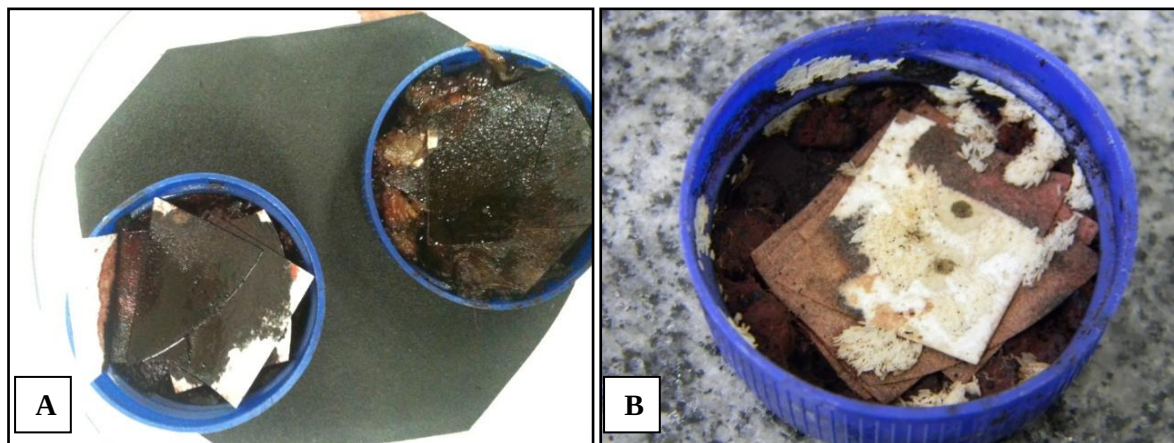


FIGURA 2–A- Substrato de oviposição (dieta larval putrefata adicionada de sangue suíno citratado) acondicionados em tampas plásticas e aquecidos a 120 °C em estufa. B- Massas de ovos depositadas sobre o papel filtro e nas paredes laterais da tampa plástica.

4.3.3 Dieta larval

Foram utilizados dois tipos de dieta larval. No início do estabelecimento da colônia, foi utilizada uma dieta a base de carne bovina moída adicionada a uma dieta líquida composta por 60 g de farinha de sangue (Fuga Couros – Sebo Hidrolândia), 40 g de ovo em pó, 40 g de leite em pó desnatado, 1mL de formaldeído e 800 mL de água (para 1 L de dieta). A carne moída era disposta em recipientes de polietileno de 12 cm por 13 cm, com capacidade de 1L, e a dieta líquida era produzida batendo os substratos em liquidificador. Aproximadamente 200 mL dessa dieta líquida era adicionada aos recipientes de polietileno contendo carne, de maneira que cobrisse toda a carne. As massas de ovos foram colocadas sobre papel de filtro picado em pedaços de dois centímetros e estes foram colocados sobre a dieta^{73,74}. Os recipientes de polietileno foram tampados com tecido voil e colocados em estufa B.O.D (T = 35 °C e UR de aproximadamente 75%).

A primeira troca de dieta ocorria 40 horas após a eclosão das larvas e diariamente a partir do segundo dia pós eclosão das larvas. Essas trocas eram feitas com auxílio de uma peneira, para facilitar a retirada das larvas com o mínimo de dieta anterior possível. No quarto dia após eclosão, as larvas foram retiradas dos recipientes de polietileno juntamente com o resto de dieta larval e colocadas em vasilhas plásticas sobre vermiculita para permitir a pupação.

Após o estabelecimento da colônia, foi utilizada uma dieta larval a base de Agar nutriente, na qual se utilizava 75 g de hemácia em pó (AP 301- APC do Brasil), 40 g de ovo em pó, 30 g de leite em pó desnatado, 1,2 mL de formaldeído, 13 g de Agar e 900 mL de água. O Agar foi dissolvido em água fervente e misturado aos substratos e batidos em liquidificador. Após ser misturada, a dieta era colocada nos recipientes de polietileno e ao resfriar, se solidificava. As massas de ovos foram então colocadas sobre esta dieta. Os potes foram tampados com tecido *voil* e colocados em estufa B.O.D nas mesmas condições utilizadas com a dieta inicial.



FIGURA 3– Dieta larval a base de Agar nutriente contendo cerca de 10g de carne bovina moída para permitir eclosão de larvas de primeiro estágio.

4.4 Obtenção dos produtos de excreção/secreção de larvas de *C. hominivorax*

Para a obtenção dos PE/S das larvas de primeiro estágio, foram incubadas 400 larvas em meio composto de água milli-Q estéril contendo 1% de penicilina/estreptomicina⁷⁵. Cada larva foi retirada da dieta larval com o auxílio de pinça anatômica, lavada uma vez em solução de hipoclorito a 10% por aproximadamente cinco segundos e em seguida em água destilada estéril pelo mesmo período de tempo. Após as lavagens, as larvas foram colocadas em béquer de 25 mL contendo 1 mL do meio. Após 16 horas de incubação em temperatura ambiente, as larvas foram descartadas e o meio contendo o PE/S foi recolhido. Para obtenção do PE/S das larvas de segundo estágio, foram incubadas 300 larvas em 2 mL do meio

mencionado acima. Essas larvas foram lavadas por duas vezes em solução de hipoclorito a 10% e água destilada estéril antes de serem adicionadas ao meio. Após 24 horas de incubação em temperatura ambiente, as larvas foram descartadas e o meio contendo o PE/S recolhido. Os mesmos procedimentos foram feitos também para as larvas de terceiro estágio, mas estas foram lavadas por três vezes, sendo 110 incubadas em 10 mL de meio. Após 48 horas de incubação, as larvas de terceiro estágio foram descartadas e o PE/S recolhido. Para todos os estádios, os meios contendo o PE/S foram centrifugados a 7000g por 20 minutos a 4°C e os sobrenadantes recolhidos (Microcentrífuga 5417 EPPENDORF®). Após devidamente identificados, os PE/S foram estocados em freezer -80°C até o momento do uso.

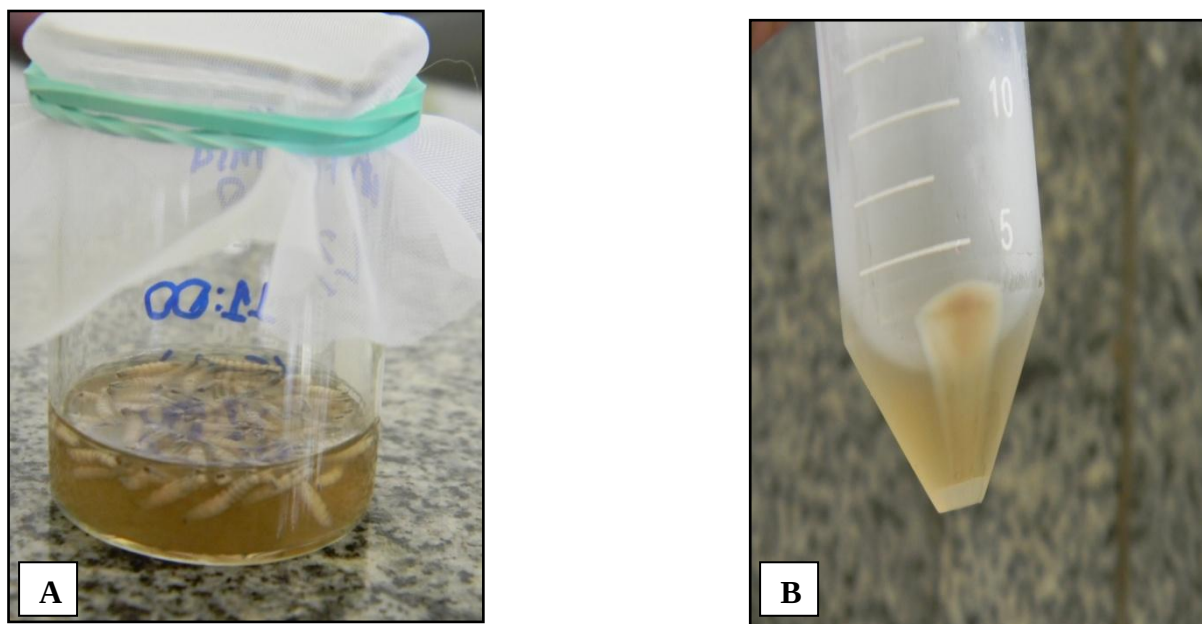


FIGURA 4– A- Larvas de terceiro estágio incubadas em água milli-Q estéril contendo 1% de antibiótico. B- Produto da incubação das larvas de *C. hominivorax* após centrifugação – *pellet* e sobrenadante.

4.5 Dosagem de proteínas dos produtos de excreção/secreção

Para quantificar as proteínas totais presentes nas amostras, foi utilizado o método de Bradford⁷⁶. A curva padrão foi construída com albumina de soro bovino e a leitura feita com espectrofotômetro UV/visível no comprimento de onda de 595 nm. Após a dosagem, as amostras foram separadas em alíquotas contendo aproximadamente 50 µg de proteína e algumas delas foram liofilizadas e armazenadas em freezer.

4.6 Ensaios enzimáticos

4.6.1 Ensaio para atividade de proteases totais

Para avaliar a atividade proteolítica dos PE/S de larvas de *C. hominivorax* utilizou-se a azocaseína como substrato⁷⁷. Em tubos de microcentrífuga foram incubados, a 37 °C, por 1h, 20 µL da amostra, 40µL de azocaseína a 0,25% e 40 µL de tampão. Foram utilizados quatro tipos de tampões com pH diferentes, sendo eles o tampão Tris-HCl (50mM) pH 7,5; Fosfato (50mM) pH 6,0; Acetato de sódio pH 5,0 e pH 4,0. Após a incubação foram adicionados em cada tubo 100 µL de Ácido tricloroacético (TCA a 10%) e estocados a 4°C por 10 minutos. Decorrido este intervalo, os tubos foram centrifugados a 2500 g por 30 minutos. Após centrifugação, 100 µL do sobrenadante foi transferido para microplaca contendo 100 µL de NaOH (1M). A absorbância de cada amostra foi lida em leitor de ELISA a 450 nm. O ensaio foi realizado em duplicata assim como os controles, que foram preparados substituindo-se as amostras pelo tampão equivalente. Uma unidade proteolítica foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir uma variação da absorbância por mL de amostra por minuto, sob condições padrões.

4.6.2 Efeito de inibidores de proteases sobre a clivagem da azocaseína

Diferentes inibidores de proteases foram testados quanto ao seu efeito sobre a atividade proteolítica presente nos PE/S de larvas de *C. hominivorax*. Os ensaios de inibição foram realizados utilizando os seguintes inibidores: benzamidina a 10 mM (inibidor reversível de serina proteases), pepstatin a 0,1 M (inibidor de aspártico proteases), 4-(2-aminoetil)benzenosulfonil fluoreto hidrocloreto - AEBSF a 10 mM (inibidor irreversível de serina proteases), N- α -tosil-L-fenilalanina clorometil cetona - TPCK a 1 mM (inibidor irreversível de quimotripsina e algumas cisteíno proteases), N- α -tosil-L-lisina clorometil cetona - TLCK a 1 mM (inibidor irreversível de tripsina), ácido etileno diamino tetra acético - EDTA a 10 mM (inibidor de metalo proteases), trans-epoxysuccinyl L-leucylamido-4-guanidino butano - E-64 a 0,1 mM (inibe reversível e competitivamente cisteíno proteases) e leupeptina a 0,1 mM (inibidor competitivo e reversível de cisteína e serina proteases).

Em microtubos contendo 20 µL da amostra e 20 µL de azocaseína a 3% foram adicionados 60 µL de cada um dos inibidores citados acima e incubados a 37 °C por 15 horas. Após incubação, aos microtubos foram adicionados 120 µL de TCA a 10% e transferidos para a geladeira por 15 minutos. Após esse intervalo o material foi centrifugado a 9000 g por cinco

minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para outro microtubo ao qual foram adicionados 100 µL de NaOH para interromper a reação. Em seguida, 100 µL da solução de cada microtubo foi transferido para microplacas de polipropileno e a leitura foi realizada em leitor de ELISA a 405 nm. Microtubos contendo os PE/S de cada estágio larval sem adição de inibidores foram submetidos aos mesmos procedimentos para controle das reações. O controle foi realizado em duplicata, assim como o ensaio com inibidores.

4.6.3 Ensaio para atividade de tripsina

Ensaio utilizando o substrato N- α -benzoil-L-arginil-p-nitroanilida (BAPNA) foram realizados para investigar a cinética da atividade enzimática específica para tripsina dos PE/S de larvas de *C. hominivorax*. O protocolo foi seguido de acordo com Caroci et al.⁷⁸ com algumas modificações. Em placas de polipropileno foram adicionados aos poços 190 µL de solução do substrato (BAPNA 3 mM em tampão Tris-HCl pH 8,15; CaCl₂ 1 mM) e 10 µL de cada amostra dos PE/S das larvas em seus diferentes estádios. A absorbância foi medida a 405 nm e as leituras foram registradas a cada 10 minutos durante quatro horas. Para cada amostra foram realizadas reações em triplicata e os resultados foram expressos com as médias das absorbâncias. O controle negativo da reação também foi realizado em triplicata, incluindo nos poços apenas substrato.

4.6.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Para a visualização do perfil eletroforético dos PE/S das larvas de primeiro, segundo e terceiro estádios de *C. hominivorax*, foi realizada uma eletroforese em gel de poliacrilamida de acordo com a metodologia de Laemmli⁷⁹ utilizando gel de acrilamida/bisacrilamida 12% na presença de dodecil sulfato de sódio 10% (SDS). Para aplicação no gel, amostras contendo 15 µg de proteína para larvas de primeiro estágio, 9 µg de proteína para larvas de segundo estágio e 7 µg de proteína para larvas de terceiro estágio foram diluídas, volume a volume, em tampão da amostra (Tris-HCl 500 mM, pH 6,8; SDS 10%; 2-mercaptoetanol 120 mM; glicerol 10%; azul de bromofenol 0,05%) e foram então submetidas à fervura por 2 minutos e em seguida aplicadas no gel num volume de 20 µL por canaleta. A corrida eletroforética foi realizada em temperatura ambiente, sob corrente de 120 V, 40 mA e 60 W, no equipamento Mini-Protean da marca Bio-Rad[®] de acordo com as instruções do fornecedor. Um padrão de peso molecular (#SM0431; Fermentas[®]) composto pelas proteínas β -galactosidase (116 kDa), albumina bovina (66,2 kDa), albumina de ovo (45

kDa), lactato desidrogenase (35 kDa), REase Bsp 98I (25 kDa), β -lactoglobulina (18,4 kDa) e lisozima (14,4 kDa) foi incluído nas corridas a fim de se fazer uma estimativa comparativa com os pesos moleculares das proteínas da amostra.

4.7 Coloração dos géis

4.7.1 Prata

Após a eletroforese, o gel foi incubado em solução fixadora composta de metanol a 50%, ácido acético a 12% e formaldeído 0,1% por uma hora. Posteriormente o gel foi incubado por 20 minutos em solução de etanol a 50% (três trocas) e em solução de tiosulfato de sódio (0,2g/L) por um minuto. Após esse procedimento, o gel foi lavado três vezes com água destilada durante 20 segundos.

A impregnação com prata foi feita com nitrato de prata a 0,2% e formaldeído 0,075% por 20 minutos. Em seguida o gel foi lavado novamente com água destilada e colocado em solução reveladora composta de carbonato de sódio a 6%, formaldeído a 0,1% e tiosulfato de sódio (0,2g/L). Após a coloração das bandas, o gel foi lavado duas vezes com água destilada e colocado em solução de parada composta de metanol a 50% e ácido acético a 12%⁸⁰.

4.7.2 Comassie Blue

Após a eletroforese, o gel foi corado com Comassie Blue (solução de Azul de Comassie G-250 0,1%, metanol 25%, ácido acético 5%) ficando em agitação por uma hora. Após esse procedimento, o gel foi descorado com solução de ácido acético a 10%.

4.8 Zimograma

Para analisar o perfil de hidrólise de proteases contidas nos produtos de excreção/secreção de larvas de *C. hominivorax* foi realizado zimograma em gel de SDS-PAGE copolimerizado com gelatina de acordo com WILLIAMS & COOMBS⁸¹ com algumas modificações. As amostras dos PE/S de cada estágio foram liofilizadas quando necessário a fim de padronizar a concentração de proteínas em cada uma delas. Assim, amostras de cada estágio larval sem tratamento prévio com inibidores de proteases foram padronizadas em 10, 20, 30 e 50 μ g para aplicação no gel. Cada amostra foi diluída (v/v) em tampão da amostra (Tris-HCl 500 mM, pH 6,8; SDS 10%; 2-mercaptoetanol 120 mM; glicerol 10%; azul de

bromofenol 0,05%) e aplicadas num volume de 20 µL por canaleta. A eletroforese foi realizada aplicando-se as amostras em gel de acrilamida a 12% copolimerizado com gelatina a 0,5% e a corrida foi realizada sob uma corrente de 80 V. Após corrida, os géis foram incubados em Triton X-100 (2,5% - v/v) a 37 °C por 30 minutos sob agitação constante. Para detectar a atividade proteolítica, os géis foram incubados em tampão Tris-HCl pH 8,15 contendo CaCl₂ 1 mM e ditioneitol (DTT a 1 mM) durante 15 horas a 37°C⁷⁹. Para a visualização das bandas de proteólise, os géis foram corados com comassie blue (solução de Azul de Comassie G-250 0,1%, metanol 25%, ácido acético 5%) por uma hora e descorados com solução de ácido acético a 10%.

4.9 Efeito dos inibidores de proteases sobre os produtos de excreção/secreção de larvas de *C. hominivorax*

A inibição da atividade proteolítica dos PE/S de larvas de *C. hominivorax* foi analisada por meio de zimograma em géis de poliacrilamida a 12% copolimerizado com gelatina a 0,5%, nos quais as amostras foram aplicadas após incubação prévia com os inibidores de proteases. Amostras dos três estádios larvais contendo o equivalente 30 µg de proteínas foram incubadas por uma hora a 37 °C com cada um dos inibidores. Após a incubação, as amostras foram diluídas em tampão da amostra (Tris-HCl 500 mM, pH 6,8; SDS 10%; 2-mercaptoetanol 120 mM; glicerol 10%; azul de bromofenol 0,05%) e aplicadas ao gel num volume final de 20 µL. A corrida eletroforética foi realizada sob corrente de 80 V. Após corrida, os géis foram submetidos aos mesmos procedimentos descritos para o zimograma.

4.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram analisados utilizando o software Assistat Versão 7.7 beta. Variáveis com distribuição normal foram comparadas por ANOVA em delineamento inteiramente casualizado, seguida pelo teste de Skott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

5. RESULTADOS

5.1 Ensaio para atividade de proteases totais

A atividade proteolítica dos PE/S dos três estádios larvais de *C. hominivorax* utilizando a azocaseína como substrato mostrou-se variável em todas as faixas de pH. Para larvas de primeiro e segundo estágio essa variação foi estatisticamente diferente em todos os níveis de pH testados, sendo que em pH 7,5 verificou-se maior atividade proteolítica. Para PE/S de larvas de terceiro estágio a atividade proteolítica em pH 7,5 foi igual estatisticamente à atividade observada em pH 6,0, mas maiores do que no pH 5,0 e 4,0 os quais foram estatisticamente iguais.

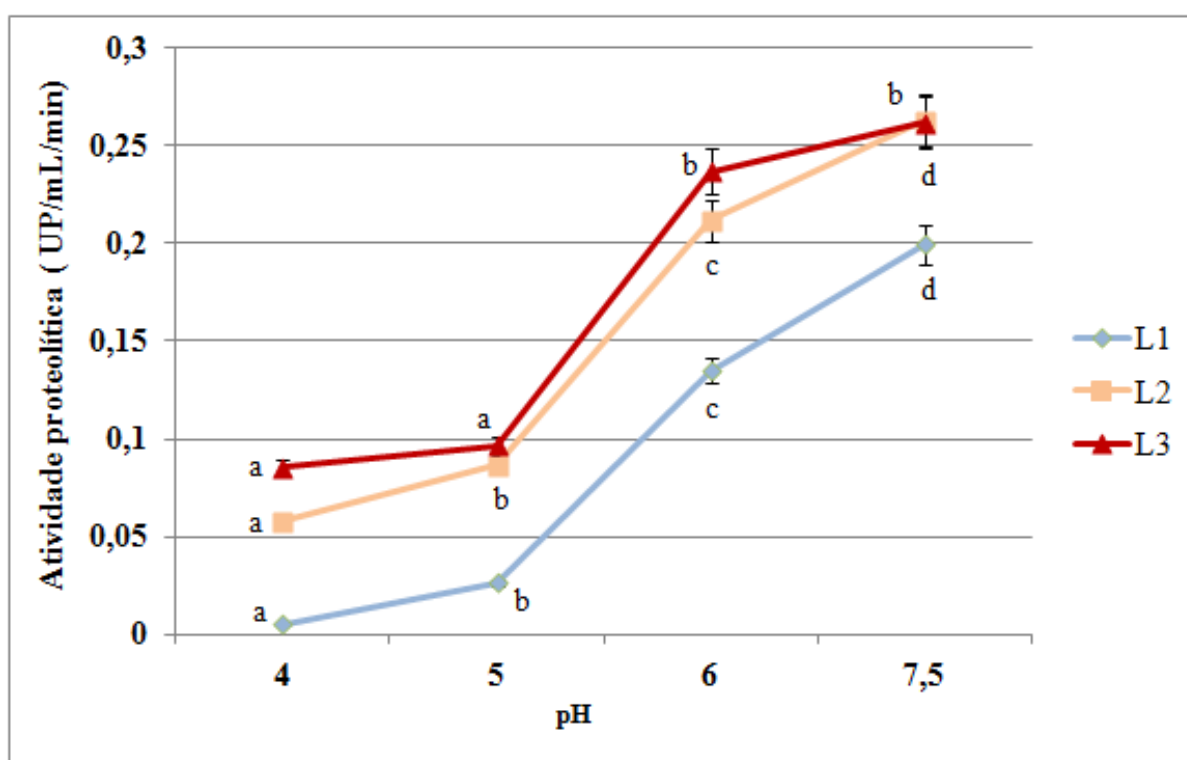


FIGURA 5– Atividade proteolítica dos PE/S de larvas de primeiro, segundo e terceiro estádios (L1, L2 e L3) de *C. hominivorax* sobre a azocaseína em diferentes faixas de pH. Cada marcador indica a média da absorvância obtida nas duplicatas. Letras iguais representam que não houve diferença estatística significativa entre as médias (ANOVA seguida de Scott-Knott, $p < 0,05$)

5.2 Efeito dos inibidores de proteases sobre a clivagem da azocaseína

Os dados obtidos pela incubação dos PE/S de larvas de primeiro estágio com os inibidores de proteases mostraram que os reagentes AEBSF e TPCK inibiram similarmente a atividade proteolítica. Em seguida, os inibidores Pepstatin-A e TLCK inibiram cerca de 50% a

atividade proteolítica dessas larvas, não diferindo estatisticamente entre si. Benzamidina, EDTA, Leupeptina e E-64 inibiram a atividade proteolítica de forma igual estatisticamente, porém em porcentagem inferior aos demais inibidores. Para PE/S de larvas de segundo estágio, a incubação com Pepstatin-A, AEBSF e TPCK causou a maior redução da atividade proteolítica, não tendo diferença significativa entre os três inibidores. O reagente TLCK inibiu a atividade dos PE/S dessas larvas de forma intermediária e o restante dos inibidores não diferiram estatisticamente entre si, inibindo de forma bastante inferior comparando-os aos três inibidores supracitados. Incubando os PE/S de larvas de terceiro estágio com Pepstatin A, AEBSF e TPCK também se verificou maior inibição da atividade proteolítica, seguido do TLCK, que inibiu em menor porcentagem a atividade proteolítica desse produto. Para este último estágio larval os demais inibidores não diferiram estatisticamente do controle.

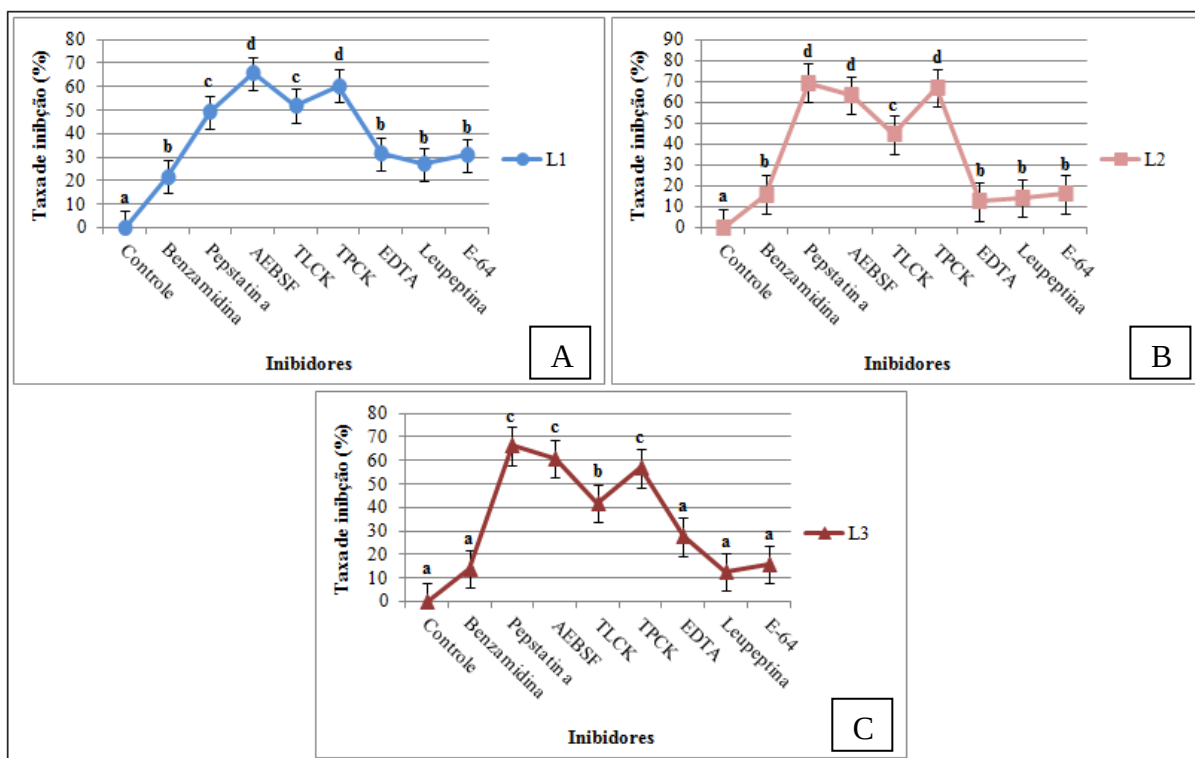


FIGURA 6 – Taxa de inibição da atividade proteolítica obtidos pela incubação da azocaseína com os PE/S de L1 (A), L2 (B), L3 (C) tratados com diferentes inibidores de proteases. Cada marcador indica a média da taxa de inibição obtida com a incubação dos inibidores. Letras minúsculas iguais representam que não houve diferença estatística significativa entre as médias (ANOVA seguida de Scott-Knott, $p < 0,05$)

5.3 Ensaio para atividade de tripsina

O ensaio com BAPNA mostrou que nos PE/S de larvas de primeiro estágio a atividade enzimática específica para tripsina é pequena, no entanto cresce com o decorrer do tempo. Para os PE/S de larvas de segundo estágio a atividade enzimática específica se mostrou maior do que para larvas de primeiro estágio e se manteve praticamente constante com o decorrer do tempo. A atividade enzimática específica para tripsina teve seu pico aos 60 minutos para larvas de terceiro estágio e com o decorrer do tempo foi diminuindo, ficando constante após as duas primeiras horas de incubação.

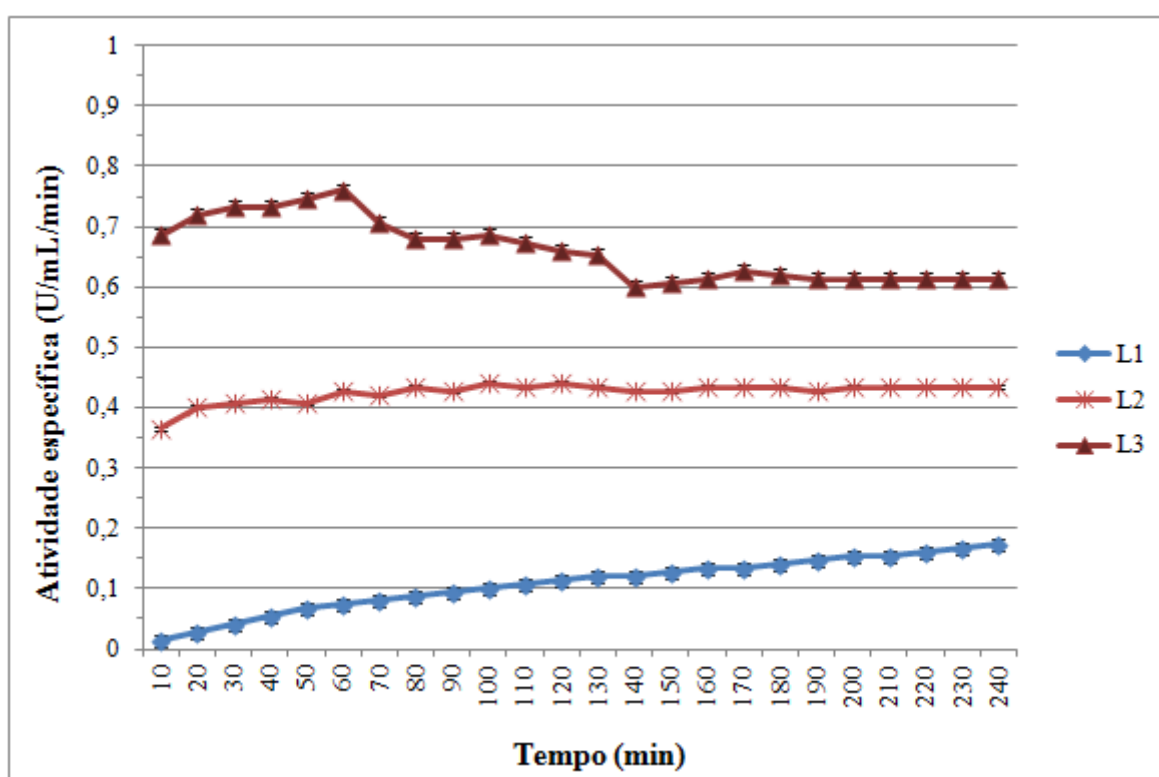


FIGURA 7– Ensaio de atividade específica dos PE/S de larvas de primeiro, segundo e terceiro estágio (L1, L2 e L3) sobre o substrato BAPNA ao longo de quatro horas.

5.4 SDS-PAGE dos PE/S de larvas de *C. hominivorax*

Os perfis eletroforéticos dos PE/S de larvas de primeiro estágio de *C. hominivorax* estão apresentados na Figura 8. Em larvas de primeiro estágio evidencia-se a presença de bandas de proteínas com pesos moleculares aparentes variando entre 115 kDa a 24 kDa. O perfil protéico dos PE/S de larvas de segundo estágio revela a presença de proteínas cujas bandas encontram-se distribuídas entre 116 e 20 kDa. Nos PE/S de larvas de terceiro

estádiovizualizam-se proteínas evidentes entre 116 kDa e 23 kDa, destacando-se dentro deste intervalo bandas com 68, 65, 38 e 35 kDa.

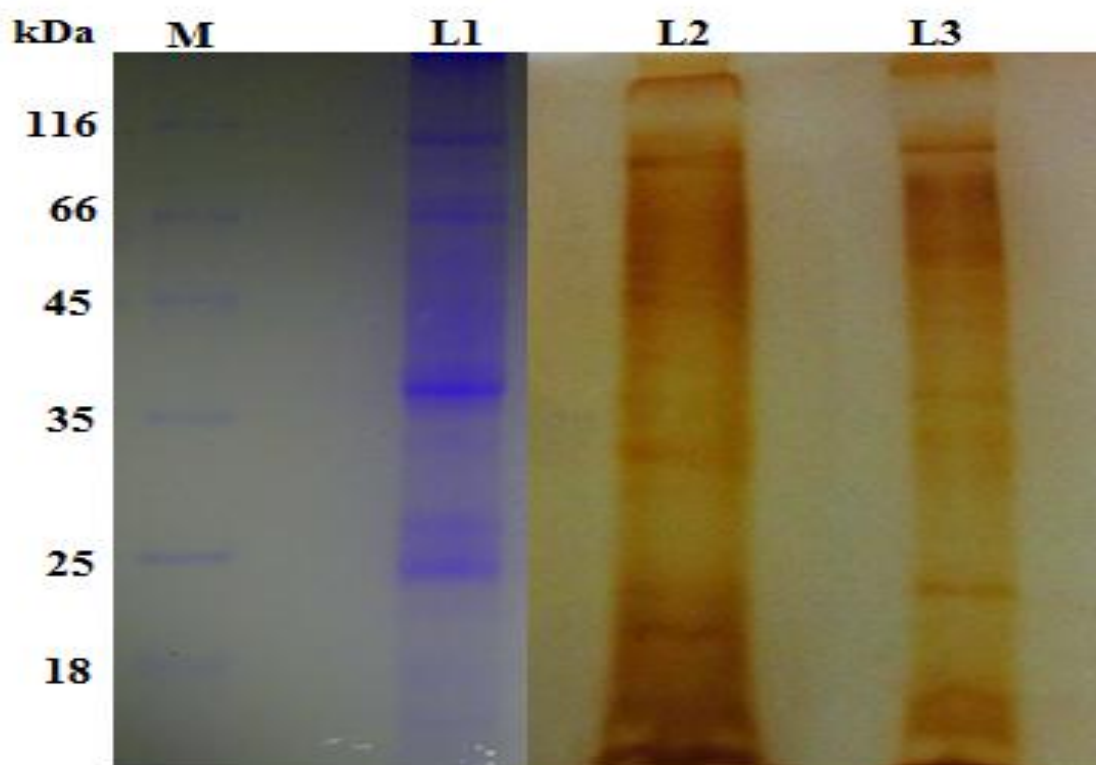


FIGURA 8 – Perfil proteico dos produtos de excreção/secreção de larvas de primeiro, segundo e terceiro estádios (L1, L2 e L3) de *C. hominivorax*. Marcador molecular (M) e padrão de peso molecular aparente (kDa) indicado à esquerda (SDS-PAGE – Comassie Blue/Prata).

5.5 Zimograma dos PE/S de larvas de primeiro, segundo e terceiro estádios

A análise do zimograma (Figura 9) mostra o perfil de hidrólise da gelatina (bandas referentes às enzimas capazes de digerir a gelatina presente no gel) produzidos por amostras dos PE/S de larvas de primeiro, segundo e terceiro estágio de *C. hominivorax*, nas concentrações de 10, 20, 30 e 50µg.

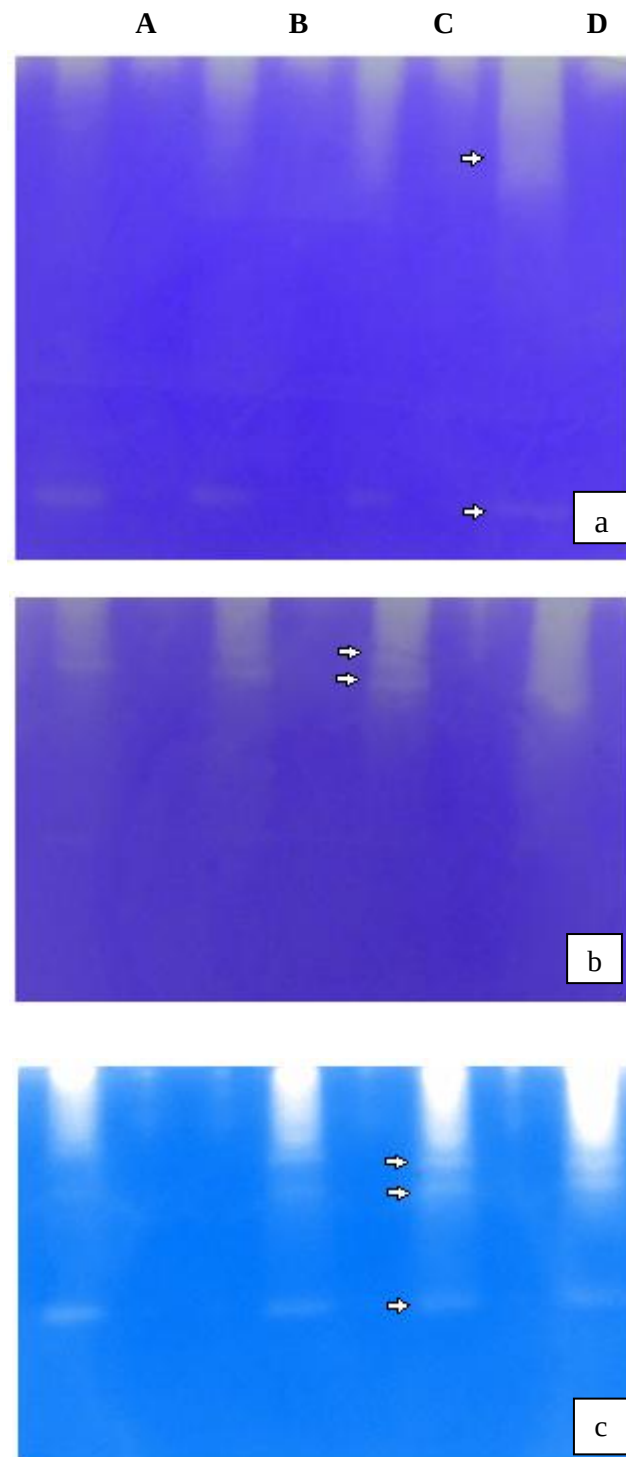


Figura 9 - Gel de atividade proteolítica dos PE/S de larvas de *C. hominivorax*. (A): 10 µg; (B): 20 µg; (C): 30 µg; (D): 50 µg. a- L1, b- L2, c- L3. Setas indicam as bandas de hidrólise da gelatina produzidos pelos PE/S das larvas.

A utilização de diferentes concentrações de PE/S não produziu alteração no padrão de migração das enzimas para amostras das larvas de primeiro estágio de *C. hominivorax*, entretanto, quando utilizados em concentrações maiores, produziram hidrólise ainda mais intensa do substrato. A análise do zimograma de amostras dos PE/S de larvas de segundo estágio permitiu identificar duas bandas referentes às enzimas capazes de digerir a gelatina presente no gel. Para amostras dos PE/S de larvas de terceiro estágio pôde-se observar a presença de três bandas de hidrólise.

5.6 Efeito de inibidores de proteases sobre o padrão de hidrólise do PE/S de larvas de *C. hominivorax*

Na Figura 10 encontram-se os perfis de hidrólise de gelatina produzidos pelos PE/S de larvas de primeiro, segundo e terceiro estágios. Para o PE/S de larvas de primeiro estágio nota-se que os inibidores que produziram maior inibição da atividade enzimática foram AEBSF, TLCK e EDTA. Comparando-se os padrões de hidrólise produzidos pela amostra de larvas de segundo estágio tratadas com os inibidores, nota-se que os inibidores que produziram maior inibição da atividade enzimática foram AEBSF e TLCK, inibindo boa parte da atividade proteolítica dessas larvas. A análise do gel em que os inibidores de proteases foram adicionados à amostra dos PE/S de larvas de terceiro estágio permite-nos observar o desaparecimento de bandas quando utilizados os inibidores AEBSF e TLCK.

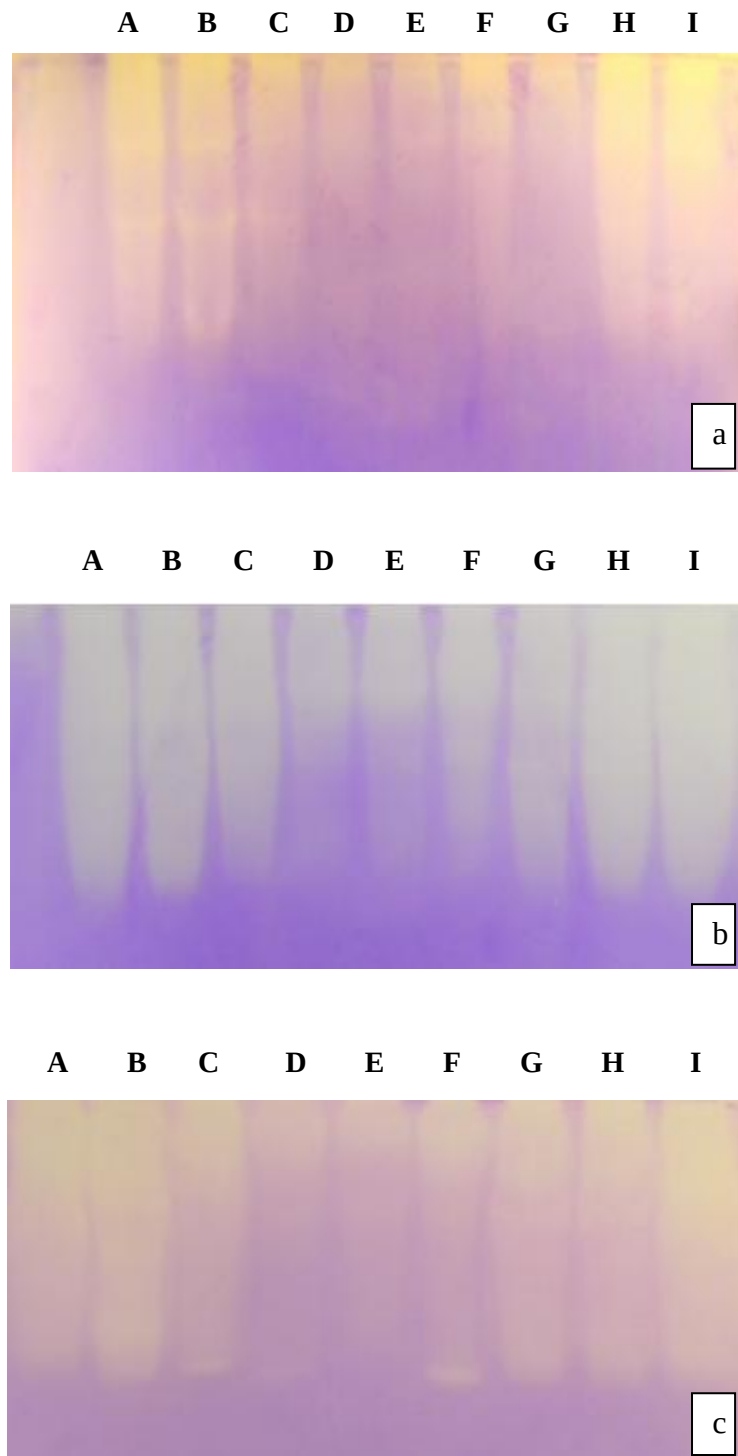


FIGURA 10– Efeito dos inibidores de proteases sobre a atividade proteolítica dos PE/S de L1, L2 e L3 de *C. hominivorax*. a- L1; b- L2; c- L3. Amostra não tratada - controle: (A). Amostras tratadas com inibidores: (B):Benzamidina; (C):Pepstatin A; (D): AEBSF; (E):TLCK; (F):TPCK; (G): EDTA; (H): Leupeptina; (I): E-64.

6.0 DISCUSSÃO

Neste estudo o perfil bioquímico de algumas proteinases produzidas por larvas de diferentes estádios de *C. hominivorax* foi caracterizado. Poucos estudos foram realizados com as espécies causadoras de miíases mais importantes no Brasil, no que se refere à caracterização dos PE/S. As proteínas produzidas por larvas de *D. hominis* foram parcialmente estudadas por Brant⁷¹ e as de *C. hominivorax* por Oliveira e Giglioti¹⁴. No presente trabalho, foram realizados estudos que ainda não tinham sido feitos com *C. hominivorax*, ou seja, além da eletroforese (SDS-PAGE), foram feitos ensaios com dois substratos diferentes, azocaseína para avaliação da atividade de proteases totais em diferentes faixas de pH e BAPNA para avaliação de atividade específica para tripsina, além dos zimogramas com e sem inibidores de proteases para os três estádios larvais.

Comparando os resultados obtidos no ensaio com azocaseína em faixas de pH que variaram de 4,0 a 7,5 com outros dípteros que produzem miíases verifica-se que o resultado foi semelhante em várias espécies de moscas causadoras de miíases. Por exemplo, para produtos de excreção e secreção de larvas de terceiro estágio de *O. ovis* a atividade enzimática máxima foi observada em pH 8,0⁵⁸. O pH ótimo para enzimas digestivas de insetos abrange uma ampla faixa variando de ácida a alcalina, no entanto, muitas proteases secretadas (especialmente serina proteases) e amino peptidases têm atividade ótima em meio neutro ou alcalino⁸². O pH ótimo observado para as proteases oriundas de produtos de excreção e secreção de *L. sericata*, *L. cuprina* e *Oxysarcodexia thornax* (Diptera: Sarcophagidae) esteve entre 7,0 e 9,5^{20,58,83,84}. Estudos caracterizando enzimas hidrolíticas em produtos de glândulas salivares de *O. ovis* obtiveram atividade proteolítica máxima em pH 8,0⁸⁵ o que se assemelha com os resultados obtidos para *C. hominivorax*.

Pesquisas com cultura *in vitro* de larvas de primeiro estágio de *O. ovis* obtiveram maior sobrevivência larval em pH 7,7⁸⁶. Em *L. cuprina*, Guerrini et al.⁸⁷ relataram que o maior crescimento e sobrevivência das larvas foi conseguido com pH 8,0-9,0 em ovelhas infestadas artificialmente. Hipodermina (A) e (B) produzidas por *H. lineatum* tiveram atividade ótima em pH 8,5⁸⁸. Em *Hypoderma*, por exemplo, o pH ótimo de collagenase foi entre 8,0 e 8,5 e diminuiu 22% em pH 9,0^{89,90}. Estes resultados corroboram com os encontrados para *C. hominivorax* no presente estudo. Em contraste ao mencionado anteriormente, a atividade de tripsina e quimotripsina de produtos de excreção e secreção de larvas de *C. bezziana* foi alta sobre uma ampla gama de pH, variando entre 5,0 a 10,0¹².

A atividade proteolítica dos PE/S de *D. hominis* sem a avaliação de pH mostrou uma atividade muito baixa para PE/S de larvas de primeiro estágio que se manteve constante no decorrer de 24 horas, uma atividade intermediária em larvas de segundo estágio e a maior atividade foi observada para PE/S de larvas de terceiro estágio, similar ao encontrado no presente estudo para *C. hominivorax*⁷¹.

A análise do SDS-PAGE dos PE/S de larvas de *C. hominivorax* revela a presença de proteínas cujas bandas encontram-se distribuídas entre 116 e 20 kDa para os três estádios larvais. Em estudos feitos com PE/S de *D. hominis* foram identificadas bandas protéicas que situavam em uma faixa de distribuição entre 100 e 14 kDa⁷¹ e a partir do sobrenadante de macerado total de larvas de *D. hominis* em SDS-PAGE a 12% corado por prata foram reveladas proteínas entre 14 a 94 kDa em larvas de segundo estágio e 21 a 63 kDa em larvas de terceiro estágio⁹¹, resultados que se assemelham com os valores de pesos moleculares encontrados para os PE/S de larvas de *C. hominivorax*. Estudos com PE/S de outros dípteros como *S. magellanica* revelaram perfil de proteínas produzidos por larvas de terceiro estágio caracterizado por bandas de 23 kDa a 63 kDa⁹². Para *C. bezziana* foram identificadas bandas entre 65 e 14 kDa¹². Analisando o SDS-PAGE dos PE/S de larvas segundo e terceiro estádios de *O. ovis* verificou-se a presença de um complexo conjunto de bandas de proteínas que variaram em peso molecular de 79,0 a 14,6 kDa⁹³. A análise de PE/S de larvas de terceiro estágio de *C. megacephala* produziu uma única banda a 16 kDa, uma banda entre 16 kDa e 23 kDa e uma ampla faixa entre 23 kDa e 45 kDa⁷⁵. Comparando os pesos moleculares das proteínas identificadas nos PE/S desses dípteros nota-se que as espécies biontófagas como *C. hominivorax*, *D. hominis*, *O. ovis* e *C. bezziana* produzem proteínas com massas moleculares superiores às espécies necrobiontófagas. É provável que essa diferença esteja relacionada à biologia destas espécies, já que espécies necrobiontófagas geralmente não penetram ativamente nos tecidos, alimentando-se superficialmente.

Ao analisarmos o efeito de inibidores de proteases sobre a clivagem da azocaseína para PE/S de larvas de primeiro estágio de *C. hominivorax* observa-se que a maior taxa de inibição foi verificada com os seguintes inibidores: AEBSF (inibidor irreversível de serina proteases); TPCK (inibidor irreversível de quimotripsina e algumas cisteíno proteases) os quais foram estatisticamente iguais em sua inibição, evidenciando que as proteinases presentes no PE/S de larvas de primeiro estágio são em sua maioria serina proteases do tipo quimotripsina. Esses resultados são semelhantes aos observados no zimograma, em que os perfis de hidrólise de gelatina produzidos pelos PE/S de larvas de primeiro estágio tratados com os diferentes inibidores de proteases mostraram a inibição de amostras tratadas com

AEBSF e TLCK, confirmando a presença de serina proteases nos PE/S dessas larvas. Os resultados corroboram os obtidos por vários autores que estudaram parasitos invasores de tecidos⁹⁴ incluindo as principais espécies causadoras de miíases.

Em *H. lineatum*, a degradação de proteínas (C3) do sistema complemento^{95,96} foi atribuída a uma enzima digestiva produzida pelas larvas de primeiro estágio e caracterizada como uma protease (HyA) da classe das serinaproteases. Em *O. ovis*¹² e em *L. cuprina*⁹⁷, a clivagem de IgG foi atribuída a uma protease digestiva identificada como serina protease. Estudos realizados por Cuervo et al.⁸⁴ identificaram também que as principais proteases expressas por *O. thornax* pertencem à classe de serina proteases. Pires et al.⁹¹ detectaram atividades de cisteína e serina proteinases em larvas de segundo e terceiro estádios de *D. hominis*, e mostraram uma maior atividade de serina proteinase quando comparada a atividade de cisteína proteinase para esta espécie. Esses resultados corroboram com o encontrado para *C. hominivorax* e confirmam o perfil esperado de enzimas do tipo serina proteases que já foram descritos para outros insetos⁹⁸⁻¹⁰¹.

A análise do efeito dos inibidores sobre a clivagem da azocaseína pelos PE/S de segundo estágio permitiu concluir que a incubação com Pepstatin-A (inibidor de aspártico proteases), TPCK (inibidor irreversível de quimotripsina e algumas cisteíno proteases) e AEBSF (inibidor irreversível de serina proteases) causaram maior redução da atividade proteolítica, sendo que esta inibição foi igual estatisticamente para os três inibidores. Para os PE/S de larvas de terceiro estágio esses três inibidores também foram os que causaram maior taxa de inibição. Por outro lado não houve inibição da atividade enzimática com Pepstatin-A no zimograma tanto para larvas de segundo estágio quanto para larvas de terceiro estágio. A presença de aspartil proteases em secreções larvais também foi verificada para *L. sericata*, em que foram detectadas quatro enzimas proteolíticas, compreendendo duas serina proteases, uma aspartil proteinase e uma metalo proteinase, com pesos moleculares que variavam de 20 a 40 kDa e atividade ao longo de uma larga faixa de pH²⁰. Para a espécie *D. hominis* foram detectadas metalo proteases em PE/S de larvas de primeiro estágio e serina proteases em larvas de segundo e terceiro estádios indicando que também houve diferença de proteases de estádios imaturos para os subsequentes nessa espécie em questão⁷¹.

Essas diferenças de proteinases encontradas entre os estádios larvares de *C. hominivorax* também corroboram com YOUNG et al.,¹⁰² que identificaram que há uma modificação no padrão de proteínas durante o desenvolvimento larval de *L. cuprina*, passando de uma predominância de proteínas com alta massa molecular para um com proteínas de massas inferiores à medida que ocorre o desenvolvimento larval. Esses autores também

inferiram que o padrão de proteínas secretadas por larvas desta espécie muda dramaticamente e o aparecimento e desaparecimento de certas moléculas refletem a função que estas desempenham em diferentes estádios de desenvolvimento.

A hidrólise de gelatina pelos PE/S de larvas de *C. hominivorax*, caracterizada por maiores bandas de hidrólise, especialmente referente à larvas de terceiro estágio, indicam uma atividade proteolítica mais ampla que a observada em larvas de primeiro estágio. A cinética da atividade proteolítica da azocazeína na qual quantidade de cromóforo liberado foi substancialmente inferior em larvas de primeiro estágio, reforçam essa constatação. Essa maior atividade proteolítica constatada nas larvas de segundo e terceiro estádios também foi observada nos PE/S de larvas de *D. hominis*⁷¹ e de larvas de terceiro estágio de *O. ovis*⁵⁸. Esta maior atividade foi interpretada pelos últimos autores como relacionada ao grande crescimento da larva de terceiro estágio que já no início do seu desenvolvimento adquire cerca de 45% do seu peso final. Levando em conta que as proteases são produzidas em função de requerimentos fisiológicos do parasita, pode-se inferir que as larvas de segundo e terceiro estádios de *C. hominivorax* apresentem um repertório de enzimas maior em decorrência da maior necessidade de ingestão de nutrientes advindos da digestão do tecido de seus hospedeiros.

Considerando a proximidade filogenética¹⁰²⁻¹⁰⁵ de *C. hominivorax* com *O. ovis* e *D. hominis*, pode-se sugerir que a maior atividade proteolítica dos PE/S das larvas de segundo e terceiro estádios de *C. hominivorax* deve-se à alta taxa de crescimento em decorrência da maior ingestão de nutrientes.

No ensaio utilizando substrato sintético específico para a detecção de atividade tríptica (BAPNA), avaliando a cinética da atividade dos PE/S medida ao longo de quatro horas de incubação mostrou que este substrato revelou que a atividade tríptica está presente em todos os estádios larvais, sendo que em larvas de primeiro estágio a atividade tríptica é baixa, porém aumenta com o decorrer do tempo. A atividade em larvas de segundo estágio é intermediária e tende a estabilizar-se com o tempo. A atividade tríptica é maior para larvas de terceiro estágio, e tende a decair com o tempo. Estes resultados são similares ao encontrados para a espécie *D. hominis* no qual a incubação com o substrato BAPNA revelou uma atividade tríptica mais pronunciada em larvas de terceiro estágio, em comparação com os estádios anteriores⁷¹. Os resultados em questão refletem a maior atividade trófica das larvas de terceiro estágio para as duas espécies, o que é compatível com o expressivo desenvolvimento que ocorre nesse estágio.

As limitações de métodos tradicionais de controle de parasitos como resistência a inseticidas, custos elevados, grande impacto ecológico devido aos resíduos tóxicos e agressão a outras espécies indicam a necessidade de elaboração de novas técnicas mais eficientes. A caracterização bioquímica dos PE/S de todos os estádios larvais de *C. hominivorax* melhora o conhecimento da fisiologia desse parasita e sua interação com o hospedeiro.

7.0 CONCLUSÕES

Os PE/S de larvas de primeiro e segundo estágio de *C. hominivorax* apresentam maior atividade proteolítica em pH 7,5. Com a diminuição do pH a atividade proteolítica decresce substancialmente. Para larvas de terceiro estágio a atividade proteolítica se mostrou estatisticamente igual em pH 7,5 e 6,0 e diminui proporcionalmente com diminuição do pH.

A atividade enzimática específica para tripsina é pequena para larvas de primeiro estágio, porém cresce com o decorrer do tempo. A atividade enzimática em larvas de segundo estágio é intermediária e se mantém praticamente constante com o tempo. Para larvas de terceiro estágio a atividade específica para tripsina é maior do que os demais estádios, ficando constante após as duas primeiras horas.

Os perfis proteicos dos PE/S dos três estádios larvais mostra a presença de bandas de proteína com pesos moleculares aparentes variando de 20 a 116 kDa.

O zimograma evidencia maiores bandas de hidrólise para PE/S de larvas de terceiro estágio.

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

8.0 REFERÊNCIAS

1. Lopes AM, de Carvalho RA, de Azeredo-Espin AM. Glutamate-gated chloride channel subunit cDNA sequencing of *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae): cDNA variants and polymorphisms. *Invert Neurosci*. 2014 Sep;14(2):137-146.
2. World Organization for Animal Health. New World screwworm (*Cochliomyia hominivorax*) and Old World screwworm (*Chrysomya bezziana*). OIE Terrestrial Manual 2008. 2008:265-275. Disponível em: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.10_SCREWW.pdf.
3. Oliveira PR de. Biologia e controle de *Amblyomma cajennense*. XIII Congr Bras Parasitol Veterinária I Simpósio Latino-Americano Rickettsioses. 2004;(1993):118-22.
4. Freitas RR, Marin JLS, Gdikian J, Marques MCC, Liberman SE. Miíase da cavidade bucal: relato de um caso. *Rev Assoc Paul Cir Dent* 1989;43(6):291-4.
5. Madeira AA, Domingues AM, Costa Neto CV, Lopes GV. Miíase da cavidade bucal. *Rev Catarinense Odontol* 1978;5(1):12-8.
6. Gomez RS, Perdigão PF, Pimenta FJGS, Rios Leite AC, Tanos De Lacerda JC, Custódio Neto AL. Oral myiasis by screwworm *Cochliomyia hominivorax*. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2003;41(2):115-6.
7. Martinez CAR, Romani G, Priolli DG, Campos AA, Carneiro VPP, Dalbem CAG. Miíase vulvar: relato de caso. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2003;25(4):291-5.
8. Borja GEM. Erradicação ou manejo integrado das miíases neotropicais das Américas? *Pesqui Vet Bras*. 2003;23(3):131-8.
9. Guimarães JH, Papavero N., Prado, AP. As miíases na região Neotropical: identificação, biologia e bibliografia. *Rev Bras Zool*. 1983;1(4):239-416.
10. Thomas DB, Mangan RL. Oviposition and wound-visiting behavior of the screwworm fly, *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae). *Ann Entomol Soc Am* [Internet]. 1989;82(4):526-34. Available from: z:\6172.pdf.
11. Hall, MJ. Trapping the flies that cause myiasis: their responses to host stimuli. *Ann Trop Med Parasitol*. 1995;89(4):333-57.
12. Muharsini S; Sukarsih GR, Partoutomo S, Hamilton S, Willadsen P, Wijffels G. Identification and characterization of the excreted/secreted serine proteases of larvae of the Old World Screwworm Fly, *Chrysomya bezziana*. *Int J Parasitol*. 2000;30(6):705-14.
13. Willadsen P. The feasibility of vaccinating against the screw-worm fly *Chrysomya bezziana*. In: Screw-worm fly emergency preparedness conference; 2001; Canberra,

Australia. Canberra: Office of the Chief Veterinary Officer, Agriculture, Fisheries and Forestry; 2002.

14. Oliveira MCDS. Estudo das proteínas produzidas por larvas de dípteros. In: II Simpósio Biol Mol Apl à Produção Anim.; 2009; São Carlos, Brasil. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste; 2009. p. 63-71.
15. Zumpt F. Myiasis in man and animals in the Old World. Londres: Butterworths; 1965.
16. Guimarães JH, Tucci EC, Barros-Battesti DM. Ectoparasitos de importância veterinária. 1 ed. São Paulo: Plêiade/FAPESP; 2001.
17. Linhares AX, Thyssen PJ. Miíases de importância médica – Moscas e Entomologia Forense. In: De Carli, G. A. (ed). Parasitologia clínica – Seleção de métodos e técnicas de laboratório para o diagnóstico das parasitoses humanas. 2 ed. São Paulo: Atheneu; 2007. p. 709-30.
18. Francesconi F, Lupi O. Myiasis. Clin Microbiol Rev. 2012;25(1):79-105.
19. Visciarelli E, Costamagna S, Lucchi L, Basabe N. Human myiasis in Bahía Blanca, Argentina: periodo 2000/2005. Neotrop Entomol. 2007;36(4):605-611.
20. Chambers L, Woodrow S, Brown AP, Harris PD, Phillips D, Hall M, Church JC, and Pritchard D I. Degradation of extracellular matrix components by defined proteinases from the greenbottle larva *Lucilia sericata* used for the clinical debridement of non-healing wounds. Br. J. Dermatol. 2003;148:14-23.
21. Zarchi K, Jemec GB. The efficacy of maggot debridement therapy – a review of comparative clinical trials. Int. Wound J. 2012;9(5):469-77.
22. James MT. The flies that cause myiasis in man. Miscellaneous Publications. 1947; 631:175.
23. Marcondes CB. Entomologia Médica e Veterinária. São Paulo: Atheneu Ed.; 2001.
24. Otranto D, Colwell DD. Biodiversity and extinction versus control of oestrid causing myiasis in Mediterranean area. Parasite. 2008;15(3):257-260.
25. Frugère S, Leon AC, Prévot F, Palacios RC, Tabouret G, Bergeaud JP, et al. Immunization of lambs with excretory secretory products of *Oestrus ovis* third instar larvae and subsequent experimental challenge. Vet Res. 2000;31(5):527-535.
26. Rodrigues Felix S, Silva CE, Schmidt E, et al. Presence of *Gasterophilus* (Leach, 1817) (Díptera: Oestridae) in horses in Rio Grande do Sul State, Brazil. Parasitol latinoam. 2007;62(3-4):122-126.

27. Amat E. Contribución al conocimiento de las Chrysomyinae y Toxotarsinae (Diptera: Calliphoridae) de Colombia. Rev Mex Biodiv. 2009 Dic;80(3):693-708.
28. Pinilla T, Segura N, Bello F. Synanthropy of Calliphoridae and Sarcophagidae (Diptera) in Bogotá Colombia. Neotrop Entomol. 2012;41(3):237-242.
29. Brito LG, Oliveira MCS, Giglioti R, Barbieri FS, Silva Netto FG, Chagas ACS. Manual de identificação, importância e manutenção de colônias estoque de dípteros de interesse veterinário em laboratório. Porto Velho: Embrapa; 2008.
30. Mastrangelo TA. Metodologia de produção de moscas estéreis de *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel, 1858) (Diptera: Calliphoridae) no Brasil. Piracicaba. Tese [Doutorado em Ciências] – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo; 2011.
31. Muniz RA, Coronado A, Anziani OS, Sanavria A, Moreno J, Eerrecalde J, et al. Efficacy of injectable doramectin in the protection of castrated cattle against field infestations of *Cochliomyia hominivorax*. Vet Parasitol. 1995;58(4):327-33.
32. Moya-Borja GE, Salani EC. Eficácia do Fipronil “Pour-On” (TOPLINE1) na prevenção da infestação da bicheira (*Cochliomyia hominivorax*) em bovinos castrados. J Vet Parasitol. 1997;6(2):66.
33. Anziani OS, Guglielmone AA, Schmid H. Efficacy of dicyclanil in the prevention of screwworm infestation (*Cochliomyia hominivorax*) in cattle castration wounds. Vet Parasitol. 1998 Apr 15;76(3):229-32.
34. Moraes CM, Sanavria A, Barbosa CG, Silva HMK. Alterações clínicas em bovinos infestados experimentalmente com larvas de *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel, 1858) (Diptera: Calliphoridae). Rev Bras Parasitol Vet. 2003;12(4):154-58.
35. Oliveira CMB. Biologia, flutuação populacional e patologia da *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel, 1858) (Díptera: Calliphoridae). Rio de Janeiro. Tese [Doutorado Parasitologia Veterinária] – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; 1980.
36. Sanavria A. Alterações Clínicas hematológicas e seroproteicas provocadas por larvas de *Cochliomyia hominivorax* em bovinos. In: VIII Seminário Brasileiro de Parasitologia Veterinária; Londrina, Brasil. Londrina, 1993.
37. Grisi L, Leite RC, Martins JRDS, Barros ATM De, Andreotti R, Cançado PHD, et al. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. Rev Bras Parasitol Vet [Internet]. 2014; 23(2):150-6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25054492>.

38. Beyon RJ, Bond JS. Proteolytic Enzymes. A practical approach. PAS The Practical Approach Series., 1990.
39. Díaz-Mendoza M, Ortego F, García de Lacoba M, Magaña C, Poza M, Farinós G, et al. Diversity of trypsins in the Mediterranean corn borer *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae), revealed by nucleic acid sequences and enzyme purification. *Insect Biochem Mol Biol*. 2005;35(9):1005-1020.
40. Delcroix M, Sajid M, Caffrey C, Lim KC, Dvorak J, Hsieh I, et al. A multienzyme network functions in intestinal protein digestion by a platyhelminth parasite. *J Biol Chem*. 2006 Dec 22;281(51):39316-29.
41. Portela Fortes K. Purificação e caracterização parcial de uma serino-protease tipo tripsina isolada do intestino de larvas de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera; Psychodidae). Belo Horizonte. Dissertação [Mestrado em Parasitologia] – Programa de Pós-graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais; 2013.
42. Sajid M, Mckerrow JH. Cysteine proteases of parasitic organisms. *Mol Biochem Parasitol*. 2002;120:1-21.
43. Vermelho AB. Proteases. Disponível em: <http://www.protease.ufrj.br/ProteaseApres.html>.
44. Tabouret G, Bret-Bennis L, Dorchies P, Jacquiet P. Serine protease activity in excretory-secretory products of *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae) larvae. *Vet Parasitol*. 2003;114(4):305-314.
45. Tellam RL, Eisemann CH, Vuocoloto T, Casu R, Jarmey J, Bowles V, et al. Role of oligosaccharides in the immune response of sheep vaccinated with *Lucilia cuprina* larval glycoprotein, peritrophin – 95. *Int J Parasitol*. 2001;31:798-809.
46. Belinskaya VZ. Permeability of integuments of the first stage larvae of *Hypoderma bovis* (De Geer) for amino acid tagged with radioactive isotopes. *Parazitologiya*. 1973;7:116-22.
47. Casais R, Martí'n-Alonso JM, Boga JA, Parra F. *Hypoderma lineatum*: expression of enzymatically active hypodermin C in *Escherichia coli* and its use for the immunodiagnosis of hypodermosis. *Exp Parasitol*. 1998 Sep;90(1):14-19.
48. Baron RW, Colwell DD. Enhanced resistance to cattle grub infestation (*Hypoderma lineatum*, de Vill.) in calves immunized with purified hypodermin A, B and C plus monophosphoril lipid A (MPL). *Vet Parasitol*. 1991;38:185-97.

49. Leid RW, Suquet CM, Tanigoshi L. Parasite defense mechanism for evasion of host attack: a review. *Vet Parasitol.* 1987;25(2):147-62.
50. Pruett JH. Proteolytic cleavage of bovine IgG by hypoermin A, a serine protease of *Hypodrema lineatum* (Diptera: Oestridae). *J Parasitol.* 1993;79(6):829-33.
51. Moiré N. Hypodermin A and inhibition of lymphocyte proliferation. *Parasitol Today.* 1998 Nov;14(11):455-7.
52. Kerlin RL, East IJ. Potent immunosuppression by secretory/excretory products of larvae from the sheep blowfly *Lucilia cuprina*. *Parasite Immunol.* 1992 Nov;14(6):595-604.
53. Tellam RL, Bowles VM. Control of blowfly strike in sheep: current strategies and future prospects. *Int J Parasitol.* 1997 Mar;27(3):261-73.
54. Sandeman RM, Feehan JP, Chandler RA, Bowles VM. Tryptic and chymotryptic proteases released by larvae of the blowfly, *Lucilia cuprina*. *Int J Parasitol.* 1990 Dec;20(8):1019-23.
55. Bowles VM, Feehan JP, Sandeman RM. Sheep plasma protease inhibitors influencing protease activity and growth of *Lucilia cuprina* larvae in vitro. *Int J Parasitol.* 1990 Apr;20(2):169-74.
56. Casu RE, Pearson RD, Jarmey JM, Cadogan LC, Riding GA, Tellam RL. Excretory/secretory chymotrypsin from *Luciliacuprina*: purification, enzymatic specificity, and amino acid sequence deduced from mRNA. *Insect Mol Biol.* 1994 Nov;3(4):201-11.
57. Teh CH, Nazni WA, Lee HL, Fairuz A, Tan SB, Sofian-Azirun M. In vitro antibacterial activity and physicochemical properties of a crude methanol extract of the larvae of the blow fly *Lucilia cuprina*. *Med Vet Entomol.* 2013 Dec;27(4):414-20.
58. Tabouret G, Bret-Bennis L, Dorchies P, Jacquet P. Serine protease activity in excretory–secretory products of *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae) larvae. *Vet Parasitol.* 2003 Jun;114(4):305-14.
59. Alcaide M, Reina D, Frontera E, Navarrete I. Analysis of larval antigens of *Oestrus ovis* for the diagnosis of oestrosis by enzyme-linked immunosorbent assay. *Med Vet Entomol.* 2005 Jun;19(2):151-57.
60. Sánchez-Andrade R, Cortinas FJ, Francisco I, Sánchez JA, Mula P, Cazapal C, et al. A novel second instar *Gasterophilus* excretory/secretory antigen-based ELISA for the diagnosis of gasterophilosis in grazing horses. *Vet Parasitol.* 2010 Aug;171(3-4):314-20.

61. Horobin AJ, Shakesheff KM, Pritchard DI. Promotion of human dermal fibroblast migration, matrix remodelling and modification of fibroblast morphology within a novel 3D model by *Lucilia sericata* larval secretions. *J Invest Dermatol.* 2006 Jun;126(6):1410-8.
62. Pinilla YT, Patarroyo M a., Velandia ML, Segura N a., Bello FJ. The effects of *Sarconesiopsis magellanica* larvae (Diptera: Calliphoridae) excretions and secretions on fibroblasts. *Acta Trop* [Internet]. Elsevier B.V. 2015 Feb;142:26-33. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0001706X14003465>.
63. Bexfield A, Bond AE, Roberts EC, Dudley E, Nigam Y, Thomas S, et al. The antibacterial activity against MRSA strains and other bacteria of a < 500 Da fraction from maggot excretions/ secretions of *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). *Microbes Infect.* 2008 Apr;10(4), 325-33.
64. Jaklic D, Lapanje A, Zupancic K, Smrke D, GundeCimerman N. Selective antimicrobial activity of maggots against pathogenic bacteria. *J Med Microbiol.* 2008 May;57(Pt 5):617-25.
65. Cazander G, van Veen KE, Bernards AT, Jukema GN. Do maggots have an influence on bacterial growth? A study on the susceptibility of strains of six different bacterial species to maggots of *Lucilia sericata* and their excretions/secretions. *J Tissue Viability.* 2009 Aug;18(3):80-7.
66. Cazander G, van de Veerdonk MC, Vandenbroucke-Grauls CM, Schreurs MW, Jukema GN. Maggot excretions inhibit biofilm formation on biomaterials. *Clin Orthop Relat Res.* 2010 Oct;468(10):2789-96.
67. Barnes KM, Gennard DE, Dixon RA. An assessment of the antibacterial activity in larval excretion/secretion of four species of insects recorded in association with corpses, using *Lucilia sericata* Meigen as the marker species. *Bull Entomol Res.* 2010;100(6):635-40.
68. Bohova J, Majtan J, Majtan V, Takac P. Selective antibiofilm effects of *Lucilia sericata* Larvae secretions / Excretions against Wound Pathogens. *Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2014, Article ID 857360, 9 pages. Available from: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/857360>.
69. Díaz-Roa A, Gaona M a., Segura N a., Suárez D, Patarroyo M a., Bello FJ. *Sarconesiopsis magellanica* (Diptera: Calliphoridae) excretions and secretions have potent antibacterial activity. *Acta Trop.* 2014;136(1):37-43.
70. Ratcliffe NA, Vieira CS, Mendonça PM, Caetano RL, Queiroz MMDC, Garcia ES, et al. Detection and preliminary physico-chemical properties of antimicrobial components in the native excretions/secretions of three species of *Chrysomya* (Diptera,

Calliphoridae) in Brazil. Acta Trop [Internet]. 2015;147:6-11. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0001706X15000807>.

71. Brant MPR, Guimarães S, Souza-Neto J a., Ribolla PEM, Oliveira-Sequeira TCG. Characterization of the excretory/secretory products of *Dermatobia hominis* larvae, the human bot fly. Vet Parasitol. 2010;168(3-4):304–11
72. Oliveira MCS, Giglioti R. Avaliação “in vitro” do efeito de inibidores de proteases contra larvas de primeiro estágio de *Cochliomyia hominivorax*: estudos preliminares. In: Anais do Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária; 2008; Curitiba, Brasil. Curitiba: CBPV; 2008.
73. Silva CE, Moya-Borja GE, Azambuja P. Use of polyester pad as a new physical substrate for rearing *Cochliomyia hominivorax* coquerel (Diptera: Calliphoridae) larvae. Neotrop Entomol. 2008 June;37(3):349-351. Available from: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1519-566X2008000300019>>.
74. Mastrangelo T, Bezerra F, Fernandes T. Dietas larvais alternativas para criação massal da mosca da bicheira, *Cochliomyia hominivorax*. Ciência Rural. 2014;44(4):672–7.
75. El-Ebiarie A, Taha N. Molecular characterization of serine proteases from both first and third larval instars of *Chrysomya megacephala*. Life Sci J. 2012;9(3):2086-93.
76. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein dye binding. Anal Biochem. 1976 May 7;72:248-54.
77. La Peyre JF, Schafhauser DY, Rizkalla EH, Faisal M. Production of serine proteases by the oyster pathogen *Perkinsus marinus* (Apicomplexa) in vitro. J Euk Microbiol. 1995 Sep;42(5):544-51.
78. Caroci AS, Calvo EG, Ribolla PEM, Bianchi AG, Marinotti O. Two trypsins occur in three species of neotropical anophelines. J Med Entomol. 2003 Nov;40(6):991-5.
79. Laemmli UK. Cleavage of structural protein during the assembly of the bacteriophage T4. Nature. 1970 Aug 15;227(5259):680-5.
80. Wray W, Bouliskas T, Wray VP, Kancol JR. Silver staining of proteins in polyacrilamide gels. Anal Biochem. 1981;118:197-203.
81. Williams AG, Coombs GH. Multiple protease activities in *Giardia intestinalis* trophozoites. Int J Parasitol. 1995 Jul;25(7):771-8.
82. Terra WR, Ferreira C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. Comp Biochem Physiol. 1994 Sep;109(1):1-62.

83. Bowles VM, Carnegie PR, Sandeman RM. Characterization of proteolytic and collagenolytic enzymes from the larvae of *Lucilia cuprina*, the sheep blowfly. Aust J Biol Sci. 1988;41(2):269-78.
84. Cuervo P, Mesquita-Rodrigues C, d'Avila Levy CM, Britto C, Pires FA, Gredilha R, et al. Serine protease activities in *Oxysarcodexia thornax* (Walker) (Diptera: Sarcophagidae) first instar larva. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2008 Aug;103(5):504-6.
85. Angulo-Valadez CE, Cepeda-Palacios R, Ascencio F, et al. Proteolytic activity in salivary gland products of sheep bot fly (*Oestrus ovis*) larvae. Vet Parasitol. 2007 Oct 21;149(1-2):117-125.
86. Duranton C, Dorchies Ph. In vitro culture of *Oestrus ovis* (Linne 1761) first instar larvae: its application to parasitic drug screening. Int J Parasitol. 1997;27:125-8.
87. Guerrini VH, Murphy GM, Broadmeadow M. The role of pH in the infestation of sheep by *Lucilia cuprina* larvae. Int J Parasitol. 1988 Apr;18(3):407-9.
88. Lecroisey A, Boulard C, Keil B. Chemical and enzymatic characterization of the collagenase from the insect *Hypoderma lineatum*. Eur J Biochem. 1979 Nov;101(2):385-393.
89. Lecroisey A, Gilles AM, De Wolf A, Keil B. Complete amino acid sequence of the collagenase from the insect *Hypoderma lineatum*. J Biol. 1987 Jun 5;262(16):7546-51.
90. Lecroisey A, Keil B. Specificity of the collagenase from the insect *Hypoderma lineatum*. Eur J Biochem. 1985 Oct 1;152(1):123-30.
91. Pires FA, Moya-Borja GE, Barreira JD, Pinho RT, Alves CR. The main proteinases in *Dermatobia hominis* second and third instars larvae are serine-proteinases. Vet Parasitol. 2007;145:326-31.
92. Pinilla YT, Moreno-Pérez D a., Patarroyo M a., Bello FJ. Proteolytic activity regarding *Sarconesiopsis magellanica* (Diptera: Calliphoridae) larval excretions and secretions. Acta Trop [Internet]. Elsevier B.V.; 2013;128(3):686-91. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0001706X13002702>
93. Alborzi A, Jolodar A, Seyfi M, Shapouri A, Bagherian E. Isolation and identification of excretory-secretory and somatic antigens from the *Oestrus ovis* larvae by SDS-PAGE and immunoblotting. Vet Res Forum. 2014;5(4):307-11.
94. Broutin-L'Hermite I, Ries-Kautt M, Ducruix A. 1.7 Å X-ray structure of space-grown collagenase crystals. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2000 Mar; 56(Pt 3):376-8.

95. Boulard C. Degradation of bovine C3 by serine proteases from parasites *Hypoderma lineatum* (Diptera, Oestridae). Vet Immunol Immunopathol. 1989 Mar;20(4):387-98.
96. Khaznadji E, Boulard C, Moire N. Expression of functional hypodermin A, a serine protease from *Hypoderma lineatum* (Diptera, Oestridae), in Schneider 2 cells. Exp Parasitol. 2003;104:33-9.
97. Elvin CM, Vuocolo T, Smith WJ, Eisemann CH, Riddles PW. An estimate of the number of serine protease genes expressed in sheep blowfly larvae (*Lucilia cuprina*). Insect Mol Biol. 1994 May;3(2):105-15.
98. Pires F a., Moya-Borja GE, Barreira JD, Pinho RT, Alves CR. The main proteinases in *Dermatobia hominis* second and third instars larvae are serine-proteinases. Vet Parasitol. 2007;145(3-4):326-31.
99. Hanzon J, Smirnoff P, Applebaum SW, Mattoo AK, Birk Y. Thiol-activated serine proteinases from nymphal hemolymph of the African migratory locust, *Locusta migratoria migratorioides*. Arch Biochem Biophys. 2003 Feb 1;410(1):83-8.
100. Telang MA, Giri AP, Sainani MN, Gupta VS. Characterization of two midgut proteinases of *Helicoverpa armigera* and their interaction with proteinase inhibitors. J Insect Physiol. 2005 May;51(5):513-22.
101. Gupta S, Wang Y, Jiang H. Purification and characterization of *Manduca sexta* prophenoloxidase-activating proteinase-1, an enzyme involved in insect immune responses. Protein Expr Purif. 2005 Feb;39(2):261-8.
102. Young AR, Meeusen EN, Bowles VM. Characterization of ES products involved in wound initiation by *Lucilia cuprina* larvae. Int J Parasitol. 1996 Mar;26(3):245-52.
103. Hennig W. Phylogenetic systematics. An Rev Entomol. 1965;10:97-116.
104. Hennig W. Phylogenetic Systematics. Urbana: University Illinois Press; 1966.
105. Hennig W. 1973. Ordnung Diptera (Zweifluger). In: Helmcke J Get alii (Ed). Handbuck der Zoologie. 1973;4(2):1-337.