

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO

***Dermatobia hominis* (Linnaeus Jr., 1781): SUSCEPTIBILIDADE
DE CAMUNDONGO E ANTIGENICIDADE DOS PRODUTOS DE
SECREÇÃO E EXCREÇÃO DE LARVAS**

LUCIANA RIBEIRO SERAFIM

BELO HORIZONTE, 2009

LUCIANA RIBEIRO SERAFIM

***Dermatobia hominis* (Linnaeus Jr., 1781) :
SUSCEPTIBILIDADE DE CAMUNDONGO E ANTIGENICIDADE DOS
PRODUTOS DE SECREÇÃO E EXCREÇÃO DE LARVAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Parasitologia.

**Área de Concentração: Entomologia
Orientador: Dr. Antônio Cesar Rios Leite
Colaboração: Dra. Cristiane R. Côrrea**

**Belo Horizonte
Instituto de Ciências Biológicas da UFMG
2009**

Agradecimentos

Ao Professor Antônio César, meu orientador, não apenas em assuntos científicos, mas um exemplo de profissional ético. Obrigada pela oportunidade e ensinamentos que me tornaram uma pessoa melhor.

Ao Professor Alfredo Góes profissional exemplar que sempre incentiva a todos em volta a dar o seu melhor. Ao vibrar com cada resultado que obtive, incentivou-me a prosseguir. Obrigada pela inestimável ajuda.

À Cristiane Côrrea, minha colaboradora, que dividiu alegrias e frustrações durante o meu mestrado. Obrigada por todos os puxões de orelha que me fizeram crescer.

À minha amiga de longa data e colega de laboratório Maria Fernanda que me ajudou antes e durante o meu Mestrado. Muito obrigada por tudo.

Aos colegas do Laboratório de Imunologia Molecular e Celular que sempre foram solícitos. Obrigada a todos que fizeram esta jornada ser menos difícil.

Ao Agenor Valadares por toda a ajuda que me concedeu.

Aos meus colegas de Mestrado que dividiram suas alegrias e tristezas comigo, em especial Ariadna e Helen que puderam acompanhar mais de perto toda a minha trajetória.

Aos colegas que fiz no Departamento de Parasitologia: os que ainda permanecem e aqueles que já seguiram outros caminhos na vida.

Aos meus familiares que me incentivaram durante toda a minha formação acadêmica.

Ao Matheus, meu namorado, que me acompanhou em vários finais de semana ao ICB e que me suportou durante a fase mais difícil do mestrado: quando nada dava certo.

Aos responsáveis pelo frigorífico Santa Vitória que gentilmente permitiriam a nossa entrada em suas instalações para a coleta das larvas usadas nos experimentos e manutenção do ciclo em laboratório.

Ao colegiado e ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação pela oportunidade de realizar este trabalho.

À Sumara por toda ajuda e intervenção a meu favor, muito obrigada.

A CAPES pela concessão da bolsa.

E, sobretudo, a Deus que atendeu as minhas orações e enviou pessoas tão especiais nos momentos de provação e que hoje tenho oportunidade de agradecer.

***“ O rio somente alcança seu objetivo porque aprendeu a superar os
obstáculos; seja como ele.”***

Lenira Poli

Resumo

Larvas de *Dermatobia hominis* são parasitos obrigatórios de tecidos cutâneos de vários mamíferos, domésticos e silvestres, inclusive humanos, de ocorrência na região Neotropical. Nos hospedeiros, as larvas determinam a dermatobiose, miíase furuncular conhecida como berne. Embora afete humanos, a miíase acarreta grandes prejuízos econômicos à exploração pecuária, sobretudo no Brasil, em decorrência da diminuição de ganho de peso, produção de leite e depreciação do couro de animais, principalmente bovinos. A partir de infestação experimental de camundongos *Swiss*, com larvas recém-emergidas de *D. hominis*, foram obtidas, após biópsia, larvas aos 4, 10, 20 e 25 dias pós-infestação (dpi) e delas colhidas secreção e excreção (SE) para eletroforese e testes de Western blot. As SE expressaram moléculas entre 10-200 kDa, sendo as mais abundantes e antigênicas as de 25,4 e 30,8 kDa. Sob análise de espectrometria de massa, a molécula de 25,4 kDa não mostrou analogia com qualquer peptídeo já depositados em bancos de dados, enquanto que a de 30,8 kDa teve similaridade com peptídeo de albumina bovina. A discussão evoca a importância do uso de camundongos como modelo experimental da miíase por larva de *D. hominis*, associada a resposta humoral desses hospedeiros durante a infestação, além de focalizar o estudo preliminar sobre proteoma.

Palavras-chave: Oestridae, *Dermatobia hominis*, miíase, *Western Blot*, secreção e excreção.

Abstract

Dermatobia hominis larvae are obligatory parasites of the cutaneous tissues of domestic and wild mammals, including human being, from a Neotropical region. In the hosts, the larvae cause dermatobiosis, a furuncular myiasis popularly called torsalo. Although it affects humans, the disease determines great economic losses to livestock, mainly in Brazil, in consequence of losing of weight, milk production and depreciation of animals' hide particularly in cattle production. After experimental infestation of mice with *D. hominis*, larvae were collected from these hosts at 4, 10, 15, 20 and 25 days post-infestation and their secretory-excretory products (SEP) were processed by electrophoreses and Western blot essays. The results revealed that the molecules expressed by SEP were of 10-200 kDa, being the 24.4 and 30.8 kDa molecules more abundant and reactive. After analysis by mass spectrometry, the 30.8 kDa peptides were compared with date-bank NASI and showed similar homology with bovine albumin. The discussion bears the importance of the observation using mice as experimental model of *D. hominis* myiasis. The host's humoral immune response during the infestation and the preliminary proteomic assay were both reported as well.

Key words: Oestridae, *Dermatobia hominis*, myiasis, *Western Blot*, secretion and excretion.

Lista de ilustrações

FIGURA 1 – Esquema do ciclo biológico de *Dermatobia hominis* (Marcelo Campos).....14

FIGURA 2. Sistema digestivo da larva de terceiro estágio de *Dermatobia hominis* com 20 dias pós-infestação (Evangelista e Leite, 2003).....20

FIGURA 3. Camundongo *Swiss* sob infestação com larva de *Dermatobia hominis* em diferentes fases de desenvolvimento. (A) anestesiado durante a infestação, (B) detalhe no momento de penetração da larva de primeiro estágio na pele, (C) com larva de terceiro estágio (L₃) aos 20 dpi, (D) L₃ emergindo do hospedeiro, (E) detalhe da L₃ emergindo, (F) L₃ emergida..... 36

FIGURA 4: Perfil eletroforético das amostras de secreção e excreção de larvas de *Dermatobia hominis*, colhidas de camundongos *Swiss* colhidas aos 4 dias pós-infestação (dpi), 10, 15, 20 e 25 dpi, em SDS-PAGE a 10% corado por prata (A). Imagem invertida do mesmo gel (B). PM= padrão molecular. Concentração da amostra:2µg/canaleta..... 38

FIGURA 5 - Western blot utilizando como antígeno secreção e excreção de L₁ com 4 dias pós-infestação proveniente de camundongo *Swiss* versus *pool* de soros de camundongos *Swiss* colhido no 4º dia de infestação (di), 10º di, 15º di, 20º di, 25º di e de animais controle. Foram aplicados 20 µg de proteína em cada canaleta. Padrão molecular em kDa..... 39

FIGURA 6 - Western blot utilizando como antígeno secreção e excreção de L₂ com 10 dias pós-infestação proveniente de camundongo *Swiss* versus *pool* de soros de camundongos *Swiss* colhido no 4º dia de infestação (di), 10º, 15º, 20º e 25º di e de animais controle. Foram aplicados 20 µg de proteína em cada canaleta. Padrão molecular em kDa..... 40

FIGURA 7 - Western blot utilizando como antígeno secreção e excreção de L₂/L₃ com 15 dias pós-infestação proveniente de camundongo *Swiss* versus *pool* de soros de camundongos *Swiss* colhido no 4º dia de infestação (di), 10º, 15º, 20º e 25º di e animais controle. Foram aplicados 20 µg de proteína em cada canaleta. Padrão molecular em kDa..... 41

FIGURA 8 - Western blot utilizando como antígeno secreção e excreção de L₃ com 20 dias pós-infestação proveniente de camundongo *Swiss* versus *pool* de soros de camundongos *Swiss* colhido no 4º dia de infestação (di), 10º, 15º, 20º e 25º di e de animais controle. Foram aplicados 20 µg de proteína em cada canaleta. Padrão molecular em kDa..... 42

FIGURA 9 - Western blot utilizando como antígeno secreção e excreção de L₃ com 25 dias pós-infestação proveniente de camundongo *Swiss* versus *pool* de soros de camundongos *Swiss* colhido no 4º dia de infestação (di), 10º, 15º, 20º e 25º di e de animais controle. Foram aplicados 20 µg de proteína em cada canaleta. Padrão molecular em kDa..... 43

FIGURA 10- Western blot utilizando como antígeno secreção e excreção (SE) de larvas colhidas em rato com 5 dias pós-infestação (dpi), 10, 15 e 20 dpi versus *pool* de soro no 25º dia de infestação (di) proveniente de camundongos *Swiss*. O soro controle foi incubado com SE de larva com 25 dpi. Foram aplicados 20 µg de proteína em cada canaleta. Padrão molecular em kDa..... 44

FIGURA 11 - Western blot utilizando como antígeno secreção e excreção de L₃ proveniente bovinos versus *pool* de soros de camundongos *Swiss* colhido no 4º dia de infestação (di), 10º, 15º, 20º e 25º di e de animais controle. Foram aplicados 20 µg de proteína em cada canaleta. Padrão molecular em kDa..... 45

FIGURA 12 - (A) Gel SDS-PAGE 10% com perfil eletroforético de secreção (SE) e excreção de L₁ com 4 dias pós-infestação nas concentrações 5; 7,5; 10 e 15 µg , corado por Coomassie Coloidal. (B) Western Blot utilizando como antígeno SE com 4 dpi nas concentrações 5; 7, 5; 10 e 15 µg versus *pool* de soros colhidos no 25º dia de infestação. Padrão molecular em kDa..... 47

FIGURA 13. Análise de homologia em banco de dados. Sequência analisada pelo algoritmo “*protein-protein-Blast*” da PubMed (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)..... 48

FIGURA 14 - Sequência de aminoácidos da albumina bovina depositada em banco de dados PubMed (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST). Em vermelho sequência de peptídeos da proteína de 30, 8 kDa, em sobreposição..... 48

Lista de tabelas

QUADRO 1: Identificação das proteínas de secreção e excreção de L ₁ de <i>Dermatobia hominis</i> colhida aos 4 dpi de camundongos	
Swiss.....	49

Lista de abreviaturas

ACN: acetonitrila

BLAST : *basic local alignment search*

BSA: *bovine serum albumin*

Cl: controle

di: dias de infecção

dpi : dias pós-infecção

dpsl: dias pós-saída da larva

HCl: ácido clorídrico

IgG: imunoglobulina G

kDa: quilodaltons

L₁: larva de primeiro estágio

L₂: larva de segundo estágio

L₃: larva de terceiro estágio

MALDI-TOF: *matrix-assisted laser desorption/ionization- time of fly*

Ms: massa

Ms/Ms: massa/massa

MSDB: *mass spectrometry protein sequence database*

NBCI: *National Center for Biotechnology Information*

NBT/BCIP : *5-Bromo-4-Cloro-3-Indolyl Phosphate/Nitro Blue Tetrazolium*

PBS: *phosphatate buffered saline*

PM: Padrão molecular

SE: secreção e excreção

SDS: *Sodium dodecyl sulfate*

SDS-PAGE: *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*

TEMED: *N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamine*

TFA: ácido trifluoroacético

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. Glândulas salivares	18
1.2. Tubo digestivo.....	21
1.3. Proteoma	23
2. JUSTIFICATIVA	24
3. OBJETIVOS	25
3.1. Objetivo Geral	25
3.2. Objetivos específicos	25
4. METODOLOGIA	26
4.1. Manutenção de insetos	26
4.2. Animais infestação	27
4.2.1. Infestação experimental de camundongos <i>Swiss</i>	27
4.2.2. Infestação experimental de camundongos <i>Balb/c</i>	28
4.2.3. Infestação experimental de <i>Rattus norvegicus</i>	28
4.3. Secreção e excreção de larvas	29
4.4. Dosagem de proteínas	30
4.5. SDS-PAGE	30
4.6. Coloração de gel	31
4.6.1. Prata	31
4.6.2. Coomassie colloidal.....	31
4.7. <i>Western blot</i>	32
4.8. Preparação da amostra para sequenciamento em espectrômetro de massa ..	32
4.8.1. Espectrometria de massa	33
4.8.3. Busca em bancos de dados e análise .das amostras	34
5. RESULTADOS	35
5.1 Infestação experimental	35

5.2. Eletroforese de secreção e excreção de larvas colhidas de camundongo <i>Swiss</i>	37
5.3. <i>Western blot</i>	39
5.3. 1. Secreção e excreção de L ₁ (4 dpi) colhidas de camundongo <i>Swiss</i> versus soro de camundongos <i>Swiss</i>	39
5.3. 2. Secreção e excreção de L ₂ (10 dpi) colhidas de camundongo <i>Swiss</i> versus soro de camundongos <i>Swiss</i>	40
5.3. 3. Secreção e excreção de L ₂ / L ₃ (15 dpi) colhidas de camundongo <i>Swiss</i> versus soro de camundongos <i>Swiss</i>	41
5.3. 4. Secreção e excreção de L ₃ (20 dpi) colhidas de camundongo <i>Swiss</i> versus soro de camundongos <i>Swiss</i>	42
5.3. 5. Secreção e excreção de L ₃ (25 dpi) colhidas de camundongo <i>Swiss</i> versus soro de camundongos <i>Swiss</i>	43
5.3. 6. Secreção e excreção de larvas colhidas em rato (5, 10, 15, 20 e 25 dpi) versus soro de camundongos <i>Swiss</i>	44
5.3. 7. Secreção e excreção de L ₃ colhidas de bovino versus soro de camundongos <i>Swiss</i>	45
5.3.8. MALDI-TOF	46
6. DISCUSSÃO	50
7. CONCLUSÃO	54
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

1. INTRODUÇÃO

A *Dermatobia hominis* (Linnaeus Jr., 1781), única espécie do gênero dentre as 151 da família Oestridae¹ (WOOD, 1987), Diptera, exclusivamente neotropical, isto é, ocorre desde o sul do México (24-26°N) até o norte da Argentina (30-32°S), com exceção do Chile (GUIMARÃES e PAPAVERO, 1999).

A forma larvar desta mosca é parasito obrigatório de tecidos subcutâneos de vários mamíferos, domésticos e silvestres, inclusive humanos. Nestes hospedeiros, as larvas do inseto determinam um tipo de miíase nodular conhecida como berne ou dermatobiose (HALL e WALL, 1995).

Em condições naturais e experimentais, adultos de *D. hominis* possuem atividade diurna e após a fertilização das fêmeas, estas capturam e depositam ovos sobre dípteros que possam servir de foréticos (NEIVA, 1910; NEIVA e GOMES, 1917). Diversos insetos de distintas famílias de dípteros foram reportados como foréticos: Muscidae, Anthomyiidae, Tabanidae, Sarcophagidae, Culicidae, Simuliidae e Cuterebridae. As espécies *Sarcopromusca pruna* (Shannon e Del Ponte, 1926), *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus, 1758), *Musca domestica* (Linnaeus, 1758), *Fannia pusio* (Wiedemann, 1830) foram consideradas as mais importantes (GUIMARÃES e PAPAVERO, 1999).

Nos foréticos, os ovos são geralmente depositados na região latero-ventral do abdômen, com o opérculo voltado para baixo. As fêmeas de *D. hominis* depositam até 800 ovos, os quais são incubados por 4-6 dias, sob temperatura de 26-28 °C e umidade de 70-95% (KOONE e BANEGAS, 1959; CHAIA *et al.*, 1975).

A infestação² dos mamíferos tem início quando os foréticos pousam ou se alimentam sobre os hospedeiros, com tempo suficiente para que as larvas contidas nos ovos de *D. hominis* sofram a ação da termia e dos gases provindos da pele, quando então, as mesmas recém-emergidas penetram ativamente na pele (FIG.1). A penetração da larva na pele do hospedeiro é completada em 5-10 minutos (NEIVA e GOMES, 1917).

1. De acordo com a classificação de Pape (2001).

2. Será adotado o termo infestação em vez de infecção

A larva não migra pelo hospedeiro como fazem muitos Oestridae (COLWELL, HALL, SCHOLL, 2006), pois no fundo da derme ocorrem duas metamorfoses larvais [mudança de primeiro estágio³ (L₁) para o segundo (L₂), e deste para o terceiro (L₃)] dentro de uma cavidade contornada por um processo inflamatório do tipo tumor furunculose (GUIMARÃES e PAPAVERO, 1999). A média do período de parasitismo, em dias, dos três estágios larvais é de 40-60 em bovinos e caprinos, 35-50 em cobaias, 25-35 em camundongos, 30-40 em ratos (JOBSEN e MOURIER, 1972) e 46-54 em humanos (DUNN, 1930).

Cessado o parasitismo, a larva L₃ de *D. hominis*, que mede cerca de 20 mm de comprimento, sai do hospedeiro, cai no solo e imerge na terra. Onde dois a três dias após, tem início a fase de pupa. Em temperatura de 27 °C e umidade relativa de 70-80%, o período de pupa varia de 23-29 dias (CATTS, 1982). No ato da saída da imago, o opérculo do pupário é aberto, e o adulto emerge usualmente durante as horas mais quentes do dia (NEIVA e GOMES, 1917).

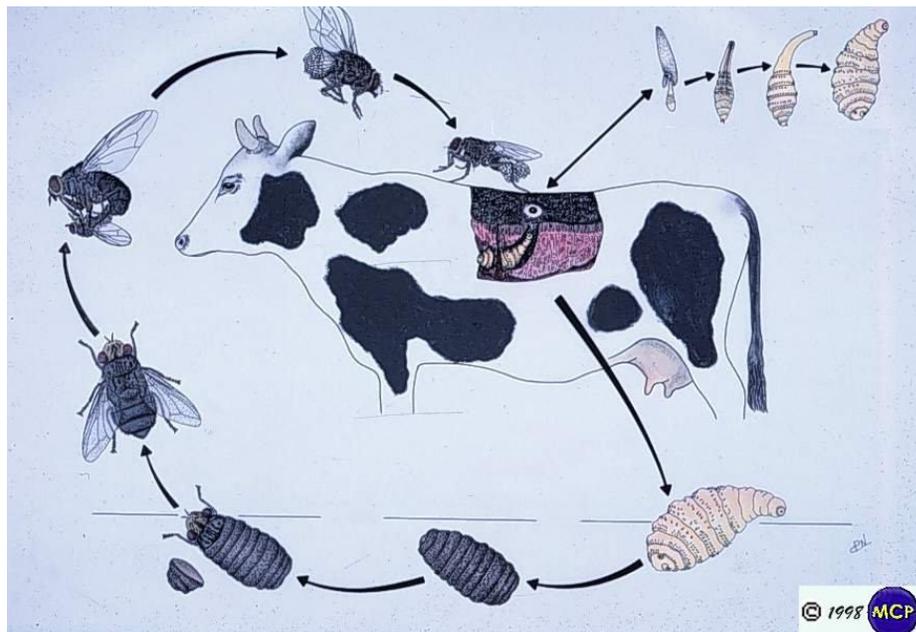


FIGURA 1 – Esquema do ciclo biológico de *Dermatobia hominis* (Campos).

3. Será adotado o termo estágio.

Experimentalmente, vários hospedeiros foram submetidos à infestação por larvas de *D. hominis*: cães (NEIVA e GOMES, 1917), humanos (DUNN, 1930), cobaias (NEEL *et al.*, 1955), coelhos (LELLO, MOTA, PERAÇOLI, 1980; LELLO e BOULARD, 1990; LELLO e PERAÇOLI, 1993), bovinos (OLIVEIRA-SEQUEIRA *et al.*, 1996; SANCHO, CABALLERO, RUÍZ-MARTINEZ, 1996), ratos (JOBSEN e MOURIER, 1972; DE FILIPPIS e LEITE, 1997; EVANGELISTA e LEITE, 2005, GONÇALVES *et al.*, 2007) e camundongos (LELLO e ROSIS, 2003).

Quanto à resposta imunológica, os primeiros estudos foram realizados em coelhos (MOTA, PERAÇOLI, LELLO, 1980; PERAÇOLI, LELLO, MOTA, 1980), cuja imunização com macerado total de larvas (L₁ + L₃) de *D. hominis* induziram a produção de anticorpos circulantes (não identificadas). Outros estudos também utilizando coelhos imunizados (LELLO e BOULARD, 1990), através de macerado total de L₁, L₂ e L₃, foram observados níveis elevados de anticorpos (não identificada a imunoglobulina) contra os antígenos das larvas. Estes animais, subsequentemente infestados, permaneceram com altas titulações de anticorpos que decresceram logo após a saída da larva.

A presença de imunoglobulinas M (IgM) e imunoglobulinas G (IgG) foram detectadas em tecidos cutâneos de bovinos, que já haviam sido parasitados naturalmente por *D. hominis* (OLIVEIRA-SEQUEIRA *et al.*, 1996) e os animais, quando experimentalmente infestados, tanto IgM como IgG estavam presentes nos tecidos da reação inflamatória, sendo encontrada IgG aos 1, 2, 7 dias pós-infestação (dpi) um fato associado a miíase primária (natural) dos bovinos.

Sob o enfoque imune-celular, coelhos previamente imunizados com extratos (macerado total de L₁, L₂ e L₃) de *D. hominis* e subsequentemente infestados, evidenciavam, no local da miíase, uma infiltração de eosinófilos (LELLO *et al.*, 1980). Grogan *et al.* (1987) estudando um caso de miíase por *D. hominis*, em indivíduo humano, revelou nos tecidos lesados: infiltrado de linfoblastos, eosinófilos, fibroblastos ativados, histiócitos maduros, mastócitos e células plasmáticas, que indicou haver uma resposta imunológica complexa do hospedeiro. Também usando coelhos imunizados com macerado total (L₂ ou L₃) e posteriormente infestados por *D. hominis* (LELLO e PERAÇOLI, 1993), foi demonstrado que os animais imunizados desenvolveram uma resposta imunológica mais rápida, em função do grande infiltrado celular da pele, do que em coelhos apenas infestados. Oliveira-

-Sequeira *et al.* (1996) infestando experimentalmente bovinos, os quais já haviam tido miíase natural, observaram na pele grande número de eosinófilos e sugeriram que tais células eram as mais importantes na lesão causada pela larva; além de identificarem também basófilos e mastócitos degranulados.

Em ratos de laboratório infestados com larvas de *D. hominis* (PEREIRA, LEITE, LEITE, 2001), os achados histopatológicos na pele revelaram: aos dois dpi, que a larva estava rodeada por uma área inflamada com predominância de neutrófilos; aos 4 dpi, havia uma fina camada de necrose próxima a larva, além de um grande número de neutrófilos, linfócitos, macrófagos, e raros eosinófilos e mastócitos. Sucessivamente, o processo inflamatório continuou crescente com proliferação de fibroblastos e células endoteliais, e o aparecimento de focos hemorrágicos. Entre os 18-20 dpi foi observada uma espessa camada de necrose e produção de fibras colágenas, tendo o infiltrado inflamatório grande concentração de neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e mastócitos, e poucas células plasmáticas. Aos 25-30 dpi, havia redução da camada necrosada e do número de neutrófilos e linfócitos, embora ocorresse grande quantidade de eosinófilos, células plasmáticas e fibras colágenas. Quando as larvas deixaram o hospedeiro, aos 30 dias de infestação, ocorria uma diminuição da cavidade, onde estava presente a larva e crescente infiltração de mastócitos e muitas fibras colágenas. E, aos 10 dias pós-emergência, a pele lesada apresentava cicatrização.

A expressão de eosinófilos e mastócitos na pele de ratos com miíase por *D. hominis* (PEREIRA e LEITE, 2002) foi significativa em número de eosinófilos até os 10 dpi, e em seguida decrescente até os 28 dpi, data próxima da emergência da larva do hospedeiro. Os mastócitos foram significativos no início da infestação (4 dpi) e aos 20 dpi. Tais resultados, primeiro a usar uma avaliação estatística, sugeriram que a expressão de ambas as células, particularmente eosinófilos, têm uma importante participação na resposta do hospedeiro ao parasito.

Em infestação e reinfestação experimental de camundongos (LELLO e ROSIS, 2003), a lesão da pele tinha grande número de neutrófilos e raros eosinófilos. Durante o curso da infestação havia uma área de necrose rodeando a larva, células inflamatórias e fibroblastos. Na reinfestação, ocorrida após 30 dias da retirada da larva (com 5 dpi) da primoinfestação, a inflamação na pele foi intensa um dia após, com presença de grande número de eosinófilos, além de fibroblastos circundando a área necrosada. Os autores alegaram que um contato prévio com o

antígeno facilitava a chegada de eosinófilos, provavelmente através de fatores quimiotáticos liberados pelos mastócitos. Também em camundongos infestados e reinfestados, subpopulações de linfócitos: CD4 e CD8 (linfócitos T), CD45 (linfócitos B) foram analisadas (LELLO, 2006). Tanto em animais infestados quanto reinfestados, o número de células CD4⁺ foi significativamente maior que CD8⁺, mas o número absoluto dessas células foi maior em animais reinfestados. Sobre linfócitos B ocorreu aumento gradual em ambos os grupos, sendo mais elevado na reinfestação.

Com ênfase a estudos sobre as alterações hematológicas (BARBOSA, SANAVRIA, BARBOSA, 2003) foram descritos semelhantes parâmetros (não significativos) de hemácias, das médias da leucometria, e das contagens absolutas e relativas de linfócitos, em bovinos infestados experimentalmente com larvas de *D. hominis*.

A expressão de leucócitos sanguíneos circulantes foi investigada em ratos experimentalmente infestados com *D. hominis* antes, durante [aos 6 (L₁), 10 e 15 (L₂), 20 e 28 (L₃) dpi] e aos 7, 15, 30, 60 dias pós-saída da larva (dpsl) dos hospedeiros (GONÇALVES *et al.*, 2007). Sob avaliação estatística durante a infestação, o número total de leucócitos não apresentou diferença marcante quando comparado todos os grupos de animais. Todavia, diferenças significantes foram assinaladas quando comparado os grupos entre si, sendo maiores no grupo controle, 15, 20 ou 28, do que aos 6 dpi. Em relação aos neutrófilos, os ratos com L₃ apresentaram número significativamente maior. Semelhança em números ocorreu para eosinófilos ou linfócitos totais, exceto a favor de 20 dpi comparando com os grupos de 6 ou 10 dpi. Nenhuma diferença significativa foi registrada entre o número total de leucócitos e linfócitos; ocorrendo o contrário para neutrófilos aos 7 ou 15 em comparação com 30 dpsl e eosinófilos aos 15 versus 60 dpsl.

Na América Latina e, sobretudo no Brasil, a dermatobiose acarreta grandes prejuízos sócio-econômicos. Neste contexto, o maior impacto da miíase é sobre a exploração pecuária, em decorrência de perdas por diminuição de ganho de peso, produção de leite e depreciação do couro de animais, principalmente bovinos⁴. O prejuízo na América Latina, estimado em décadas passadas, foi avaliado em 260 milhões de dólares anuais (GRISI *et al.*, 2002).

4. *Dermatobia hominis* é o único Oestridae cuja larva é parasita de bovino na América Latina.

No Brasil, *D. hominis* está presente em vários estados, principalmente no sul e sudeste. Sua ocorrência é maior nos meses de temperatura e umidade relativa do ar elevada. A espécie está ausente nos estados com clima adverso, por exemplo: norte e nordeste brasileiro (BRITO e MOYA-BORJA, 2001).

Valores estimados indicaram ser de 36 milhões de dólares/ano, as perdas econômicas causadas pelo berne a pecuária brasileira (TORTUGA, 1979). Embora não ocorram dados mais recentes é bem provável que centenas de milhões de dólares sejam gastos no combate ao berne.

Mesmo considerando os vários esforços para o controle de *D. hominis*, inclusive por distintos métodos, usando um vasto arsenal larvicida (GUIMARÃES e PAPAVERO, 1999), a dermatobiose permanece enzoótica na América Latina. Métodos alternativos para o controle de *D. hominis*, como biológicos e físicos tem resultados ineficientes (MOYA-BORJA, 2003).

Nos últimos 20 anos, estudos de moléculas em processos metabólicos, associados ao sistema digestivo e anexo (glândula salivar) de larvas biontófagas, têm sido conduzidos para o controle de miíases, com ênfase maior para uma futura produção de vacinas. Tais ensaios envolvem extrato total de secreção e excreção de glândula salivar ou intestino médio (FRUGÈRE *et al.*, 2000). Em adição, moléculas isoladas da matriz peritrófica - tecido extracelular que reveste o intestino médio de larvas (TELLAM *et al.*, 2001) - tem apresentado resultados animadores como vacina (ANGULO-VALADEZ *et al.*, 2007).

É bem provável que em breve o uso de vacina antimíases alcance resultados promissores como os que vêm sendo praticados com a vacina contra carrapatos (WILLADSEN *et al.*, 1989; GORDON e ALLEN, 1987; WILLADSEN *et al.*, 1996).

1.1. Glândulas salivares

Como anexos do sistema digestivo (FIG.2), as glândulas salivares são órgãos exócrinos de fundamental importância durante a vida das larvas, insetos adultos e de muitos outros artrópodes. Elas sintetizam e secretam moléculas que podem provocar catálise, paralisia de presas, vaso dilatação, anticoagulação,

balanço hídrico e reabsorção de íons (RIBEIRO, 1995; RIBEIRO e FRANCISCHETTI, 2003).

Particularmente em larvas de *D. hominis* há um par de glândulas salivares, na porção antero-lateral da cavidade corporal. O seu formato é tubular e de aparência translúcida. Cada glândula tem um ducto eferente que se fundem formando um ducto comum (deferente), o qual se insere ao esqueleto cefalofaríngeo. Externamente, as glândulas são revestidas por tecido conjuntivo extracelular impregnado por células adiposas e ramificações de traqueíolas. O desenvolvimento das glândulas acompanha o crescimento da larva, ocorrendo ausência delas na pupa e adultos de *D. hominis* (VIEIRA e LELLO, 1996).

A glândula é formada por monocamada de células com microvilosidades para a luz. O formato das células é oval com núcleo central e nucléolo com cromatina dispersa. As células glandulares repousam sobre uma membrana basal limítrofe com o tecido conjuntivo. Em geral, as glândulas apresentam no lúmen substância secretora. A morfologia, histologia e ultra-estrutura das glândulas salivares de L₁ (EVANGELISTA e LEITE, 2005) L₂ e L₃ (EVANGELISTA e LEITE, 2007) de *D. hominis* foram objetos de estudos sob microscopia óptica e eletrônica de transmissão.

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 imune (TABOURET *et al.*, 2001).

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 miíases (TELLAM e BOWLES, 1997).

Sobre Oestridae, apenas da espécie *Oestrus ovis* - cujas larvas causam miíase nasofaringe em ovinos - foram estudadas moléculas provindas de secreção e excreção de glândulas salivares e tubo digestivo (INNOCENTI *et al.*, 1995; TABOURET *et al.*, 2001). Tais moléculas (proteínas) quando oriundas de glândulas apresentaram maior antigenicidade em comparação com moléculas de extrato bruto e conteúdo do tubo digestivo.

De outros Diptera que determinam miíases biontófoga cutânea em vertebrados, há também um artigo sobre moléculas de glândulas salivares de larvas da espécie de Sarcophagidae *Wohlfahrtia magnifica* (Schiner, 1862). Foi provado que, por teste ELISA, antígenos das glândulas induziram resposta humoral mais específica em ovinos em comparação com antígenos de macerado: total da larva, intestino ou cutícula. Por espécies de Caliphoridae, *Lucilia cuprina* (Wiedemann, 1830) e *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel, 1858), moléculas de glândulas foram também fortemente antigênicas para ovinos (FARKAS, HORNOK, GYURKOUSZKY, 1998).

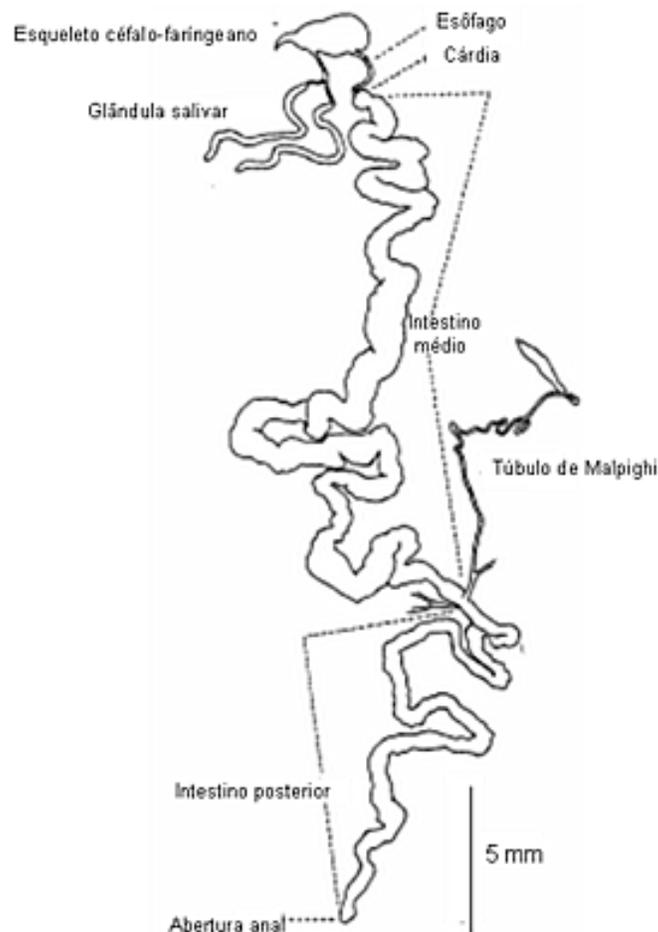


FIGURA 2. Sistema digestivo da larva de terceiro estágio de *Dermatobia hominis* com 20 dias pós-infestação (EVANGELISTA e LEITE, 2003).

1. 2. Intestino Médio

Em larva de *D. hominis*, o sistema digestivo (FIG. 2) tem início na cavidade bucal, seguido pelo intestino anterior (ou esôfago) se limita com a cárdia (proventriculo). Este de forma globosa, se conecta ao intestino médio, o qual se encerra próximo da implantação dos túbulos de Malphigi, onde tem início o intestino posterior que se finda no ânus (VIEIRA e LELLO, 1996). O sistema digestivo é externamente banhado pela hemolinfa, revestido de tecido conjuntivo, com presença de células adiposas e ramificações de traqueíolas.

Particularmente o intestino médio - o mais funcional dos intestinos - é pavimentado por uma monocamada de células epiteliais, com microvilosidades para o lúmen e posteriormente alcançam à membrana basal, seguido por tecido conjuntivo que contem músculo, traqueíolas e uma camada espessa de matriz extracelular.

A morfologia, histologia e ultra-estrutura do intestino médio de L₁ de *D. hominis* foram estudadas sob microscopia óptica e eletrônica de transmissão (EVANGELISTA e LEITE, 2005) e L₃ (EVANGELISTA e LEITE, 2003)

Produtos de secreção e excreção de intestino de larvas têm sido mais estudados em *Hypoderma lineatum* (De Villers, 1789) – espécie causadora de miíase cutânea em bovinos. Desta espécie foram isoladas quatro enzimas proteolíticas, somente em L₁ denominadas hipodermina A, B, C e D (BOULARD, 1970; BOULARD e GARRONE, 1978; LECROISEY, BOULARD, KEIL, 1979).

Do ponto de vista funcional, a hipodermina A - serino protease, com 27 kDa - induz a depleção da atividade do complemento citolítico em bovinos (TONG, IMHOFF, LECROISEY, 1981; BOULARD e BENCHARIF, 1984; BOULARD, 1989). Quanto à hipodermina B (23 kDa), referida como uma protease semelhante à tripsina (BOULARD, 1970; BOULARD e GARRONE, 1978; LECROISEY *et al.*, 1979), induz a redução da blastogêneses de leucócitos e linfócitos, assim como a produção de interleucina-2 e prostaglandina (NICOLAS-GUALARD, MOIRE, BOULARD, 1995).

Como a primeira colagenase descrita em metazoário, a hipodermina C é uma serina protease (25,2 kDa) com atividade de clivar a triplice hélice do colágeno em uma única região (BOULARD e GARRONE, 1978; LECROISEY *et al.*, 1979).

Em *H. lineatum* e *H. bovis* (Linnaeus, 1758), a hipodermina C (TEMEYER e PRUETT, 1990) compartilha epitopos antigênicos, os quais podem ser detectados, através de teste ELISA, tanto no soro como no leite de animais. Os antígenos de hipodermina C têm sido usados em inquéritos epidemiológicos para determinar a prevalência de hipodermatose.

Schwinghammer *et al.* (1988) descreveram hipodermina D, enzima que apresenta propriedades bioquímicas e antigênicas semelhantes à hipodermina B.

Com relação a *D. hominis*, há apenas um estudo preliminar recente usando macerado total de L₂ e L₃, que revelou a presença de serina proteases (PIRES *et al.*, 2007). Os autores sugerem existir em L₂ e L₃ enzimas similares com pesos moleculares: 13 e 22 kDa, além de distintas moléculas com 30 kDa (L₃) e 50 kDa (L₂).

Sobre outros dípteros não Oestridae, causadores de miíases biontófagas, ex: Calliphoridae, em especial *L. cuprina*, parasitos dos tecidos cutâneos de ovinos e caprinos e *Chrysomya bezziana* (Villeneuve, 1914) - que causa miíase cutânea em vários mamíferos do velho mundo - moléculas de secreção e excreção de glândula salivar e intestino têm sido estudadas (MUHARSINI *et al.*, 2000).

Kerlin e East (1992) demonstraram que 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 foi usada para a seleção de ovelhas resistentes a infestação por *L. cuprina* (TELLAM e BOWLES, 1997).

Nos produtos de secreção e excreção de larvas de *L. cuprina* foram também isoladas moléculas da matriz peritrófica (TELLAM *et al.*, 2000), particularmente uma glicoproteína denominada peritrofina 95 (antígeno oculto), capaz de inibir o desenvolvimento das larvas. Desde então e atualmente a peritrofina-95 é considerada um antígeno candidata à vacina (CASU *et al.*, 1997).

1.3. Proteoma

O termo proteoma foi cunhado em 1994 por Wilkins, usando partes das palavras 'proteína' e 'genoma'. Proteoma é o conjunto de todas as proteínas de uma célula. A definição foi ampliada, incluindo as proteínas sintetizadas por uma célula, tecido ou estágio de desenvolvimento (WASINGER *et al.*; 1995, WILKINS, *et al.*, 1996). A caracterização de proteomas tem sido possível pelos avanços ocorridos em espectrometria e gel bidimensional.

A espectrometria de massa é o método de escolha para a rápida identificação de proteínas, por ser capaz de identificar peptídeos em misturas complexas (ASHTON, CURWEN e WILSON, 2001). A identificação é feita utilizando as informações obtidas pela fragmentação dos peptídeos e comparação com as informações depositadas em bancos de dados disponíveis, fazendo uso de software específicos. No programa MASCOT (www.matrixscience.com), os resultados obtidos são ordenados de acordo com o escore apresentado. Quanto maior o escore obtido mais confiável é o resultado (PERKINS *et al.*, 1999).

O ideal é comparar a proteína a ser identificada e dados do genoma da mesma espécie. Caso ainda não existam informações do genoma da espécie de interesse depositado, a comparação ocorrerá utilizando sequências de proteínas de outras espécies que apresentam homologia (ASHTON, CURWEN e WILSON, 2001; HABERMANN *et al.*, 2004). Para *D. hominis* as informações depositadas no Genbank são referentes ao DNA mitocondrial. São estudos baseados em variabilidade genética e evolução (De AZEREDO-ESPIN e LESSINGER 2006, NOËL, ANGERS, LAPOITE, 2005). Até o presente momento, não há informações sobre o genoma de outros Oestridae.

2. JUSTIFICATIVA

A dermatobiose ocorre em diversos estados brasileiros e acarreta grandes prejuízos sócio-econômicos, ocasionados pela perda de peso e depreciação do couro dos animais parasitados, principalmente na pecuária.

A presença de hospedeiros alternativos tanto silvestres quanto selvagens e o elevado número de espécies de insetos, vetores dos ovos de *D. hominis*, tornam o seu controle mais complexo, necessitando do uso freqüente de inseticidas.

A relevância do tema e a necessidade de informações básicas referentes à reposta imune-humoral do hospedeiro frente à infestação por *D. hominis*, motivou o presente estudo. O qual apresenta resultados que poderão fornecer subsídios úteis para um melhor entendimento da relação do parasito-mamífero e, conseqüentemente, servir de base para futuras pesquisas em prol de medidas alternativas ao controle químico da dermatobiose.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Verificar a susceptibilidade de camundongos como hospedeiros de *Dermatobia hominis* e a antigenicidade de suas larvas.

3.2. Objetivos específicos

3.2.1. Determinar a cronologia do desenvolvimento de cada estágio larvar, usando camundongos como hospedeiros.

3.2.2. Determinar a cronologia do desenvolvimento de cada estágio larvar, usando ratos como hospedeiros.

3.2.3. Descrever o perfil eletroforético de produtos de secreção e excreção de larvas de *D. hominis* em diferentes fases de seu desenvolvimento.

3.2.4. Identificar proteínas antigênicas através de *Western blot*.

3.2.5.. Sequenciamento e análise de homologia dos antígenos identificados.

4. METODOLOGIA

A manutenção do ciclo e infestação experimental de roedores com larvas de *D. hominis* foram realizados no Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária, Departamento de Parasitologia. Os ensaios de eletroforese e *Western blot* foram feitos em colaboração no Laboratório de Imunologia Celular e Molecular, Departamento de Bioquímica e Imunologia.

4.1. Manutenção de insetos

Larvas de *D. hominis* foram colhidas de bovinos naturalmente infestados e abatidos no frigorífico Santa Vitória - localizado no município de Contagem - Minas Gerais, e usadas para iniciar a criação do inseto em laboratório. Logo após a coleta, as larvas foram transferidas para frascos, contendo maravalha umedecida com água destilada, até o transporte para o laboratório do Departamento de Parasitologia do ICB-UFMG.

Em laboratório, as larvas foram condicionadas em Becker de 150 ml, contendo maravalha umedecida diariamente. Os Beckers foram tampados com tela de nylon, presa com elástico, e mantidos em estufa incubadora B.O.D., sob temperatura de 26°C e umidade relativa de 80-90%. Após 48 horas, as pupas formadas foram removidas do fundo do Becker e parcialmente enterradas na serragem, de maneira que os espiráculos ficassem voltados para cima. Após a emergência dos adultos, foram separados por sexo e transferidos, em casais, para tubos de plástico, medindo 2,5 cm de diâmetro 5,0 cm de comprimento, a fim de ocorrer à cópula. Tão logo efetivada a cópula, as fêmeas foram colocadas em gaiolas de nylon contendo insetos foréticos (*Musca domestica* Linnaeus, 1758) – uma fêmea de *D. hominis* para cada 10 foréticos - capturados no campo, nos quais ocorreu a postura dos ovos de *D. hominis*. Os foréticos que continham ovos foram mantidos em estufa incubadora B.O.D., sob temperatura de 26°C e umidade relativa de 80-90%, durante o período de sete dias de incubação dos ovos.

Foi necessário estimular por CO₂, expirado por um indivíduo humano, a eclosão das larvas. Estas recém-eclodidas foram coletadas com o auxílio de um pincel e, posteriormente, utilizadas para infestação experimental na região dorso-lombar (previamente raspada) de camundongos (*Mus musculus*) e ratos (*Rattus norvegicus*) obtidos no biotério do ICB-UFMG.

4.2. Animais infestados

Os procedimentos experimentais com roedores foram conduzidos em concordância com o do Comitê de Ética em Experimentação (CETEA) da UFMG, protocolo número 26/2008.

4.2.1. Infestação experimental de camundongos Swiss

Foram utilizados 113 camundongos *Swiss* adultos, machos, com peso médio de 22 g incluídos em quatro grupos. Os animais, inclusive os controles negativos, foram mantidos no biotério, em gaiolas de plástico forradas com maravalha, e receberam ração balanceada (Labina, Purina) e água *ad libitum*.

O grupo A, contendo oito camundongos, depois de infestados com uma L₁/animal, ficou mantido em biotério e após 25 dias foram transferidos para uma gaiola com fundo adaptado (telado) para a emergência e recuperação das larvas vivas.

Os 66 camundongos do grupo B foram infestados com uma L₁/animal, e subdivido em: B1, B2, B3, constituídos por seis roedores por subgrupo; B4 e B5 composto por 24 animais/subgrupo. Houve coleta de larvas (biopsia da pele) e de sangue (punção cardíaca) aos quatro (grupo B1), 10 (grupo B2), 15 (grupo B3), 20 (grupo B4) e 25 (grupo B5) dias pós-infestação (dpi). O sangue colhido (aproximadamente 1 ml/animal) foi transferido para tubos de 1,5 ml e centrifugado para obtenção de alíquotas de soro, aos quais passaram a ser acondicionados em freezer a -20 °C ou N₂ líquido.

O grupo C, com 36 camundongos foi subdivido em: C1, com 22 camundongos infestados com 10 L₁/animal; C2, composto por seis camundongos infestados com quatro L₁/animal e C3, composto de oito camundongos infestados com duas L₁/animal. As larvas foram coletadas após biopsia da pele aos quatro (C1), dez (C2) e 15 dpi (C3), respectivamente.

O grupo D, com três animais, foi usado como controle.

Para infestação, coleta de sangue e larvas, os roedores foram anestesiados, via intraperitoneal, com 1,25 ml/kg (solução de cloridrato de xilazina 23 mg/ml e cloridrato de ketamina 50 mg/ml).

As larvas foram visualizadas em estereomicroscópio para a identificação do estágio, de acordo com características morfológicas descritas por JOBSEN e MOURIER (1972).

4.2.2. Infestação experimental de camundongos *Balb/c*

Um grupo E, com nove camundongos *Balb/c* adultos, machos, com peso médio de 22 g foram infestados com L₁ recém-emergida, depositada na região dorso-lombar (previamente raspada). Cada roedor do grupo foi anestesiado pela via intraperitoneal com a dosagem de 1,25 ml/kg de solução de xilazina e ketamina (solução de cloridrato de xilazina 23 mg/ml e cloridrato de ketamina 50 mg/ml). Cada animal infestado recebeu identificação, ficou condicionado e alimentado *ad libitum*. Os animais infestados foram identificados, condicionados em gaiolas plásticas e alimentados *ad libitum*. Após 20 dias, os camundongos *Balb/c* foram transferidos para uma gaiola com fundo adaptado (telado) para a recuperação das larvas.

4.2.3. Infestação experimental de *Rattus norvegicus*

Foram infestados 13 ratos, linhagem Wistar, machos, com peso médio de 90 g, divididos em dois grupos. Os ratos ficaram mantidos no biotério, em gaiolas de plástico forradas com maravalha, e receberam ração balanceada (Labina, Purina) e água *ad libitum*.

O grupo A era formado por seis ratos infestados com uma L₁ e mantidos em biotério até a emergência natural das larvas.

A infestação de cada rato do grupo B obedeceu ao seguinte critério: dois animais com 20 L₁, sendo as larvas coletadas aos cinco dpi; dois animais com dez L₁, tendo sido as larvas colhidas aos 10 dpi, e três com cinco L₁. Estas larvas foram coletadas, de cada roedor, aos 15, 20 e 25 dpi, respectivamente.

Durante a infestação, cada rato foi anestesiado, pela via intraperitoneal, com 1,25 ml/kg (solução de cloridrato de xilazina 23 mg/ml e cloridrato de ketamina 50 mg/ml). Para a coleta de larvas nos animais, realizou-se a eutanásia com sobredose de anestésico.

As larvas foram visualizadas no estereomicroscópio para a identificação do estágio, tendo como base, a morfologia externa de acordo com JOBSEN e MOURIER (1972).

4.3. Secreção e excreção de larvas

As secreções e excreções (SE) foram obtidas de larvas colhidas pós-biopsia de pele de camundongos *Swiss* artificialmente infestados: 220 L₁ (4 dpi), 30 L₂(10 dpi), 22 L₂/ L₃ (15 dpi), 24 L₃ (20) e 24 L₃ 25 dpi). Dos ratos artificialmente infestados coletou-se: 40 L₁ (5 dpi), 20 L₂(10 dpi), 5 L₂ (15 dpi), 5 L₃ (20 dpi) e 5 L₃ (25dpi). Também obtidas SE de 12 L₃, colhidas de bovinos naturalmente infestados.

As larvas, previamente lavadas em água destilada, foram transferidas para um tubo de polietileno com o meio de cultura RPMI 1640 (Sigma) preparado de acordo com orientações do fabricante, contendo penicilina, estreptomicina e gentamicina, sem soro fetal bovino. E larvas, separadas de acordo com hospedeiro e fase de desenvolvimento, foram incubadas em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ e temperatura de 37°C, durante 24 horas.

Transcorrido o tempo de incubação, as larvas foram retiradas, o volume de 4 ml/tubo centrifugado a 14.000 rpm por 3 minutos, e o sobrenadante transferido para tubos de 1,5 ml, liofilizado *overnight* e ressuspenso em água deionizada. As alíquotas foram acondicionadas e mantidas em freezer -20 °C para subsequente uso.

4. 4. Dosagem de proteínas

As concentrações de proteínas presentes nas amostras de SE colhidas aos 4, 10, 15, 20 e 25 dpi (larvas de camundongos) e 5, 10, 15, 20 (larvas de ratos) foram estimadas conforme método descrito por Bradford (1976). A cada poço de uma placa de microtitulação (Nunc) ocorreu a adição de 20 µl da amostra a ser dosada e 180 µl de reagente de Bradford [Coomassie brilliant blue R-250 0,1% (m/v) em solução aquosa com etanol 5% (v/v) e ácido fosfórico 10% (v/v), filtrado em papel filtro número 1)] (BioAgency). Sobre os poços foi acrescentado solução padrão contendo 0,5-2 µg de albumina sérica bovina - fração VI (Sigma) em 20 µl de água Mili-Q. A leitura aconteceu

em um leitor de ELISA (Elx 800, Bio-tek Instruments Inc.) com o comprimento de onda de 595 nm, e a equação da curva padrão, calculada pelo programa estatístico Microcal Origin V. 5.0 (Microcal Software®).

4. 5. Eletroforese em gel de poliacrilamida

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada em condições redutoras e desnaturantes (LAEMMLI,1970).

O gel de separação foi preparado a 10% a partir de 1,7 ml de solução estoque 29:1 acrilamida/bisacrilamida (BioAgency), 1,3 ml de tris HCl 1 M, pH 8,8 e 0,05 ml de SDS 10%, mais 2 ml de H₂O deionizada. O gel a 3% de empacotamento foi preparado a partir de 500 µl de solução de acrilamida, 380 µl de tris HCl 1M pH 6,8 e 30 µl de SDS 10%, além de 2,1 ml de H₂O deionizada. A reação de polimerização, de ambos os tipos de géis, ocorreu pela adição de persulfato de amônio e TEMED (N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamine, Sigma) nas concentrações finais de 0,1% (p/v) e 0,1% (v/v), respectivamente. As SE foram diluídas em tampão (de amostra) contendo SDS 2% e 2-mercaptoetanol a 5%, homogeneizadas e fervidas durante 5 minutos para completar a desnaturação e redução. Estas foram aplicadas no gel de poliacrilamida, imerso em tampão de corrida (tris/glicina 0,125 M contendo SDS 0,1%) e submetidos a corrente contínua de 80 v durante aproximadamente 80 minutos.

4.6. Coloração de gel

4.6.1. Prata

Após a eletroforese, o gel foi retirado do suporte e descartado o gel de empacotamento. O gel de separação foi incubado em solução fixadora (solução de metanol 50% e ácido acético 12%) pelo tempo mínimo de 30 minutos e posteriormente,

lavado três vezes em solução de etanol 50%, sendo 20 minutos cada lavagem. Em seguida, o gel foi incubado por 60 segundos em solução de tiosulfato de sódio (0.2 g/l) e após lavado com H₂O destilada.

O gel foi incubado com a solução de nitrato de prata (2 g/l) e formaldeído (0,75 ml/l) por 20 minutos, sob agitação constante. Foram feitas 3 lavagens com água destilada para a retirada do excesso de nitrato de prata. Para revelar a reação, utilizou-se a solução de carbonato de sódio anidro (60 g/l) e formaldeído (0,5 ml/l). A reação foi interrompida assim que alcançado a intensidade e o contraste desejados, descartando a solução e lavando o gel em água destilada.

O gel foi incubado em solução fixadora por 10 minutos, sob agitação e em seguida, transferido para solução de metanol a 50% e condicionado em geladeira a 4°C.

4.6.2. Coomassie coloidal

Após a eletroforese, o gel foi retirado do suporte e descartado o gel de empacotamento. O gel de separação foi incubado na solução fixadora 1 [ácido fosfórico 2% (v/v), etanol 30% (v/v)] sob agitação constante por 90 minutos, e com troca da solução a cada 30 minutos. Posteriormente, o gel foi incubado com a solução de fixadora 2 [ácido fosfórico 2% (v/v)] por 30 minutos, e a solução substituída a cada 10 minutos. O gel permaneceu na solução fixadora 3 [ácido fosfórico 2% (v/v), etanol 18% (v/v) sulfato de amônio 12% (p/v)], durante 30 minutos. Findo o tempo, 5ml/l de Coomassie brilliant blue G-250 2% (m/v) em solução aquosa foi acrescentada à solução fixadora 3. Todo processo ocorreu sob agitação constante, até alcançar a intensidade de coloração desejada.

4.7. Western blot

O protocolo de Towbin *et al.* (1979) foi seguido para os ensaios: após a corrida eletroforética das amostras, o gel SDS-PAGE a 10% (não corado) foi colocado sobre membrana de nitrocelulose (Sigma) e submetido à corrente constante de 100 v, durante 1 hora, à 4°C. A membrana foi corada com Ponceau, cortada (com lâmina de bisturil estéril) e individualizada nas canaletas. Em seguida realizado o bloqueio com BSA 2% em PBS 0,05 M contendo Tween 20 a 0,05% à temperatura ambiente, sob agitação constante por 1 hora.

Foram realizadas três lavagens em PBS 0,15 M contendo Tween 20 a 0,05%. As amostras de soro foram diluídas 1:50 em BSA 0,25% com solução de PBS 0,05 M contendo Tween 20 a 0,05%. Cada parte da membrana foi incubada *overnight* a 4°C, sob agitação, com soro controle negativo e soros teste (soro de camundongo *Swiss* infestados com uma larva *D. hominis*, em distintas datas, isto é, dias de infestação).

Após a incubação a membrana foi lavada (três vezes) em PBS 0,15 M contendo Tween 20 a 0,05%. Posteriormente, as mesmas foram incubadas por 1 hora em anticorpo anti-IgG total de camundongo conjugado à fosfatase alcalina (Sigma). A membrana então incubada foi novamente lavada, como descrito acima, e revelada com solução de NBT/BCIP, de acordo com especificações do fabricante. Para interromper a coloração, as membranas foram lavadas com água destilada.

4.8. Preparação da amostra para sequenciamento em Espectrômetro de Massa

A amostra, de SE 4 dpi foi aplicada nas concentrações de 5; 7,5; 10 e 15 µg; em gel SDS-PAGE 10% para eletroforese conduzida sob voltagem constante de 100 v. Em seguida, o gel foi dividido ao meio, sendo uma parte corada por Coomassie coloidal

e a outra metade usada no testes de *Western blot*. Após a transferência, houve bloqueio e lavagens em PBS 0,15 M contendo Tween 20 a 0,05%. A membrana foi incubada com soro de 25 di. Depois de revelada, ela foi sobreposta ao gel corado e as bandas, correspondentes à região da reação, foram excisadas assim como uma banda do padrão de 50 kDa (Fermentas) usada como controle positivo. Com a utilização de uma lâmina de bisturi estéril, as bandas foram recortadas. Após o corte, o gel foi transferido para um tubo de 1,5 ml e dividido em pedaços menores (1mm³).

Para descolaração, a banda do gel excisada foi imersa em solução de acetonitrila (ACN) a 50% contendo bicarbonato de amônia a 25 mM, pH 8,0. Em seguida lavado três vezes em 400 µl da solução, durante 15 minutos. O tubo contendo a mistura foi agitado no vórtex até que os fragmentos do gel aparecessem translúcidos e acrescentado 200 µl de ACN, por 5 minutos.

O sobrenadante presente nos tubos de 600 µl foi secado no *SpeedVac* de modo a permanecer apenas o gel. Para digestão das proteínas foram adicionados 10 µl da solução de tripsina diluída em cada tubo, e incubado por 10 minutos em banho de gelo. Em seguida, adicionou-se 20 µl de bicarbonato de amônio 50 mM e os tubos foram transferidos para banho-maria a 37 °C onde permaneceram *overnight*.

Para a extração de peptídeos foi acrescentado ao sobrenadante obtido, 30 µl da solução de ácido fórmico a 5 % e ACN a 50 %, por 30 minutos, sob agitação constante (vórtex) ao tubo que continha os fragmentos de gel. Novamente retirou-se o sobrenadante e transferiu-o para tubos novos. A extração foi repetida 4 vezes, combinando todos os extratos da mesma amostra em um único tubo. Estas foram concentradas em *speed vac* até o volume de 10 µl.

4. 8. 1. Espectrometria de massa

As amostras foram concentradas e desalinizadas utilizando micro colunas C₁₈ Zip Tip (Millipore) de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. As colunas foram lavadas em 10 µl de solução de acetonitrila a 50% (ACN), por três vezes, desprezando o líquido ao final e 10 µl de ácido trifluoroacético 0,1% (TFA 0,1%) também por três vezes, desprezando o líquido. Depois de equilibrada a coluna, a pipeta foi introduzida na amostra, aspirando e desprezando o líquido dentro do mesmo tubo de 600 µl, por dez vezes. Para romper com as ligações de baixa afinidade, foi feita a lavagem da pipeta com 10 µl de TFA 0,1%, por três vezes, com descarte do líquido ao final do procedimento. A eluição da amostra foi feita em tubo de 600 µl contendo ACN a 50% e TFA a 0,1%, por dez vezes.

As amostras foram aplicadas em uma placa (Anchorchip® 600), juntamente com a matriz alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA), na concentração de 10 mg/ml em solução de ACN A 50% e TFA A 0,3%. A placa foi analisada no Espectrômetro de Massa Autoflex III Smartbeam (Bruker Daltonics), localizado no Núcleo de Estrutura e Função de Biomoléculas, Departamento de Bioquímica e Imunologia, do ICB-UFMG.

As amostras foram analisadas em modo refletido e os peptídeos observados foram fragmentados e analisados nos programas: Flex analisys 3.0 (Bruker Daltonics) e Bio tools 3.0 (Bruker Daltonics).

4.8.3. Busca em bancos de dados e análise das amostras

As sequências de peptídeos derivadas das amostras estudadas sob análises de massa (Ms) e massa/massa (Ms/Ms) foram confrontadas com os registros de bancos de dados MSDB, SWISS PROT e NCB I pelo programa MASCOT (www.matrixscience.com). As sequências obtidas foram também analisadas pelo algoritmo blastp (protein-protein-BLAST) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

5. Resultados

5.1. Infestação experimental

5.1.1. Camundongos *Swiss*

Dos animais do grupo A (sem ocorrência de mortes), 70% foram susceptíveis a infestação. Nestes, a lesão cutânea começou a ser observada macroscopicamente a partir do 5º dia pós-penetração da L₁. As L₃ emergiram do hospedeiro entre 25-32 dias e estas deram origem a pupas e adultos férteis, cujos ovos depositados pelas fêmeas originaram larvas infestantes para outros hospedeiros (FIG. 2). Após a saída das larvas, os camundongos, foram mantidos no biotério por mais de seis meses sem aparentes sinais ou sintomas clínicos, à semelhança dos roedores controles.

Dos grupos infestados (B e C), sem ocorrência de morte dos hospedeiros, as larvas de *D. hominis* coletadas durante a biospsia de pele, foram identificadas como: L₁ (4 dpi), L₂ (10 dpi), 50% L₂ e 50% L₃ (15 dpi), L₃ (20 dpi) e L₃ (25 dpi). As larvas com 15 dpi preservavam externamente a cutícula de L₂ e, abaixo desta, por transparência, era evidente a cutícula da L₃.

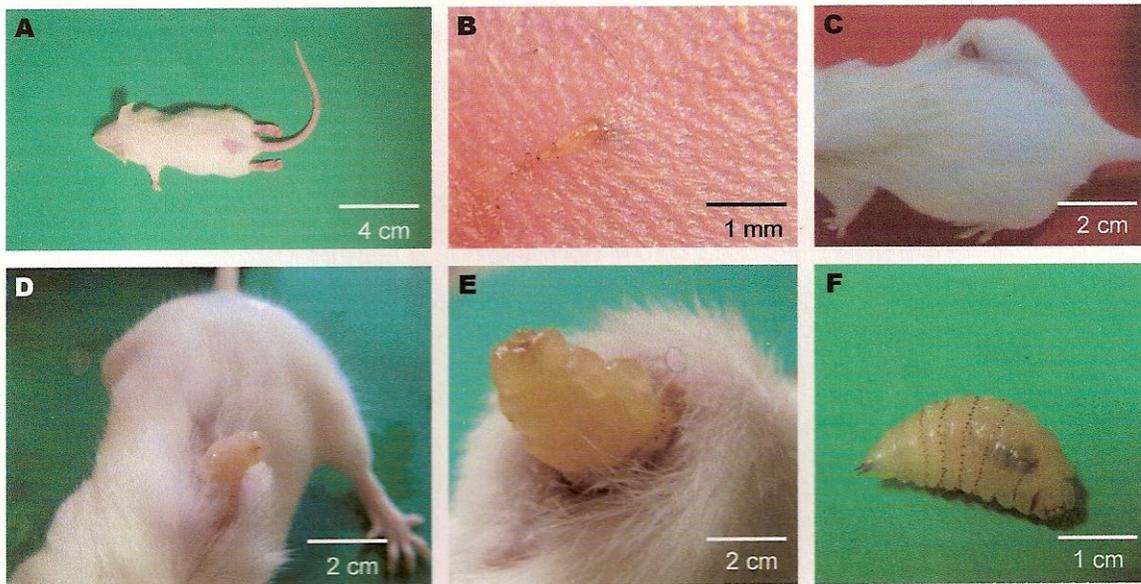


FIGURA 3. Camundongo Swiss sob infestação com larva de *Dermatitis hominis* em diferentes fases de desenvolvimento. (A) anestesiado durante a infestação, (B) em detalhe no momento de penetração da larva de primeiro estágio na pele, (C): com larva de terceiro estágio (L₃) aos 20 dpi, (D) L₃ emergindo do hospedeiro, (E) detalhe da L₃ emergindo, (F) L₃ emergida.

5.1.2. Camundongos *Balb/c*

Dos 9 camundongos *Balb/c* (grupo E) infestados com uma L₁, 5 animais morreram: um no 18^o di, dois no 21^o di e dois pós-saída da larva (dpsl). O primeiro aos 7 dpsl e o segundo aos 60 dpsl. As larvas emergidas dos animais, entre 23 e 28 dias, deram origem a pupas e adultos. As fêmeas acasaladas depositaram ovos férteis cujas larvas emergidas foram infestantes para camundongos. Os quatro roedores infestados (sobreviventes) apresentaram sinais clínicos tais como: perda progressiva de peso, pelo

erizado e mucosas pálidas após emergência da larva, mesmo quando mantidos em biotério, por até seis meses.

5.1.3. *Rattus norvegicus*

Em ratos, o período de parasitismo foi de 30-41 dias. As larvas de *D. hominis* colhidas durante a biopsia de pele dos animais infestados foram identificadas como: L₁ (4dpi), L₂ (10 e 15 dpi) e L₃ (20 e 25 dpi).

5.2. Eletroforese de secreção e excreção de larvas colhidas de camundongo

Swiss

A migração das proteínas da SE das larvas (em diferentes idades ou estágio larvar) provindas de camundongos *Swiss*, ocorre em toda extensão do gel, apresentando pesos moleculares entre 10-200 kDa, inclusive acima desta última (FIG.3).

Na SE de L₁ (4 dpi), as proteínas tinham peso entre 10-60 kDa. Sendo as mais evidentes de 25,4 e 30,8 kDa. Abaixo de 25 kDa foram visualizadas 4 bandas, duas próximas a 15 kDa e duas próximas a 20 kDa. As demais proteínas apresentam peso: uma mais de 40 kDa, duas bandas com pesos próximos a 50 kDa e a quarta de 60 kDa.

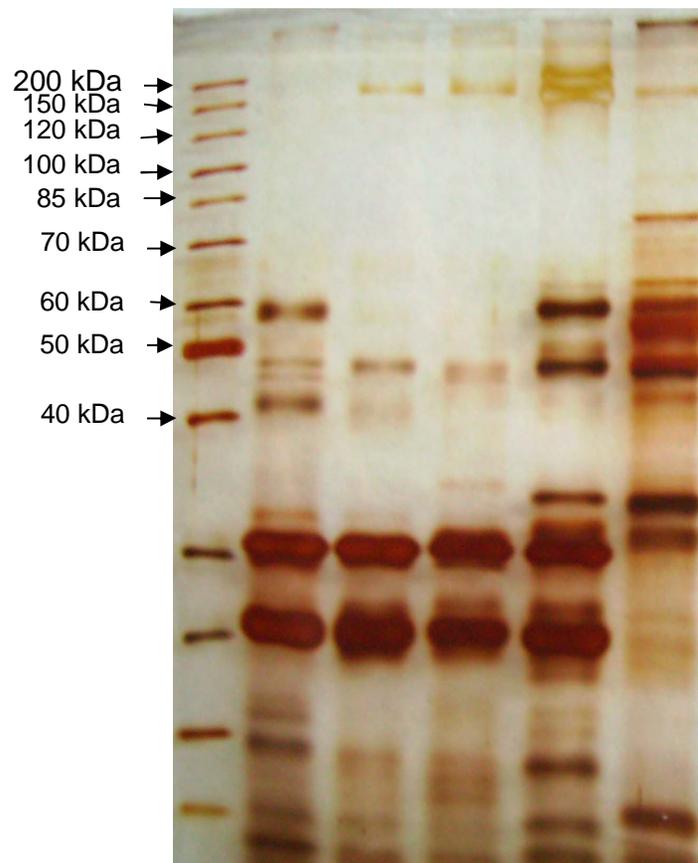
A maioria das proteínas na SE de L₂ (10 dpi) estavam dispostas entre 10-50 kDa, e uma vista próximo a 200 kDa. Abaixo de 25 kDa não foi possível distinguir com nitidez as bandas. As proteínas mais evidentes foram de 25,4 e 30,8 kDa.

Na SE de L₂ / L₃ (15 dpi) a maior expressão de proteínas foram assinaladas entre 10-50 kDa, sendo as mais expressivas de 25,4 e 30,8 kDa. Não é possível

distinguir as bandas formadas abaixo de 25 kDa. Próximo a 200 kDa é visualizada uma banda.

A distribuição das proteínas na SE de L₃ (20 dpi) foi mais frequente entre 10-60 kDa. Foram também visualizadas, um conjunto de bandas formadas entre 10-15 kDa, uma banda com peso próximo a 15 kDa e outra próxima a 20 kDa. As proteínas mais marcantes foram de 25,4 e 30,8 kDa. Acima de 30,8 kDa ocorrem duas bandas de coloração nítida. Proteínas com pesos próximos a 50 e 60 kDa são visualizadas com coloração intensa. As demais observadas, forma um conjunto de bandas com pesos próximos a 200 kDa.

O perfil das moléculas em SE de L₃ (25 dpi). A maioria das proteínas está distribuídas entre 10-85 kDa, as demais estão próximo a 200 kDa e acima deste valor. Entre 10-15 kDa é observada um conjunto de proteínas. A proteína mais intensa desta SE apresenta peso superior a 30,8 kDa. Entre 40-60 kDa ocorre um conjunto de bandas. Acima de 60 kDa as bandas estão mais espaçadas e nítidas.



30 kDa →
25 kDa →
20 kDa →
15 kDa →
10 kDa →

FIGURA 4: Perfil eletroforético das amostras de secreção e excreção de larvas de *Dermatobia hominis*, colhidas de camundongos *Swiss* colhidas aos 4 dias pós-infestação (dpi), 10, 15, 20 e 25 dpi, em SDS-PAGE a 10% corado por prata.

5.3. Western blot

5.3. 1. Secreção e excreção de L₁ (4 dpi) colhidas de camundongo *Swiss* versus soro de camundongos *Swiss*

O reconhecimento de proteínas antigênicas presentes na amostra de SE de L₁ (4 dpi) ou antígeno (Ag), ocorre no soro sanguíneo de camundongos *Swiss* a partir do 10^o di e até o 25^o di (FIG.4). Esta molécula tem peso de 25,4 kDa. A proteína com peso de 30,8 kDa foi reativa com os soros do 20^o e 25^o di. Outra proteína, próxima de 48 kDa, mostra reação positiva para soro do 15^o, 20^o e 25^o di. As reações inespecíficas observadas na membrana incubada com soro do 4^o di foram sutis. As membranas incubadas com soro negativo (controle = Ctl), com SE de L₁ e anticorpo secundário anti-IgG de camundongo marcado, isto é, Ag +2^o Ac marcado, ou com Ag sozinho não apresentaram reações evidentes.

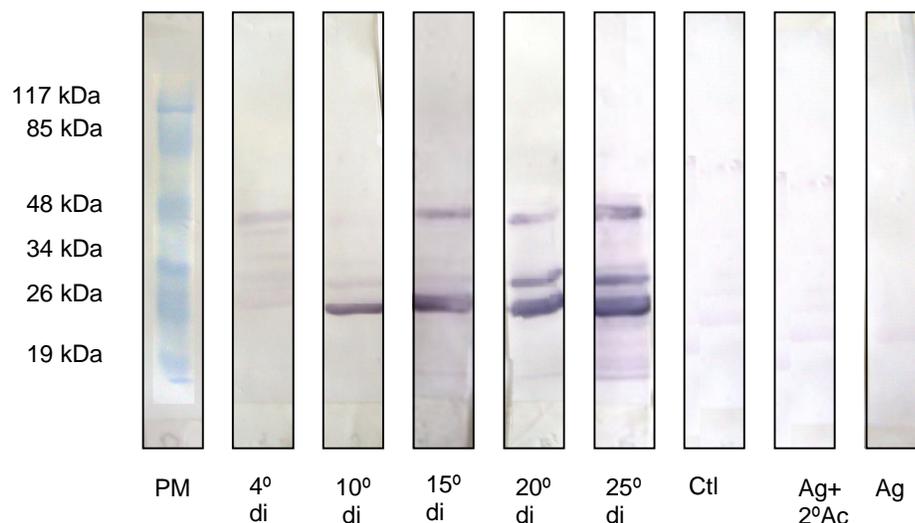


FIGURA 5 - *Western blot* utilizando como antígeno secreção e excreção de L_1 com 4 dias pós-infestação proveniente de camundongo *Swiss* versus *pool* de soros de camundongos *Swiss* colhido no 4º dia de infestação (di), 10º di, 15º di, 20º di, 25º di e de animais controle. Foram aplicados 20 μ g de proteína em cada canaleta. Padrão molecular em kDa.

5.3. 2. Secreção e excreção de L_2 (10 dpi) colhidas de camundongo *Swiss* versus soro de camundongos *Swiss*

Reações para a proteína de 25,4 e 48 kDa ocorreu em todas as membranas, com exceção da incubada apenas com o Ag (FIG.5). Duas proteínas com peso entre 34-48 kDa foram reconhecidas pelos soros do 20º e 25º di. O reconhecimento de uma proteína com aproximadamente 48 kDa foi marcante no soro aos 15º, 20º e 25º di. Também foram positivas as amostras dos 15º, 20º e 25º di com proteínas entre 48 kDa e 117 kDa, e acima de 117 kDa.

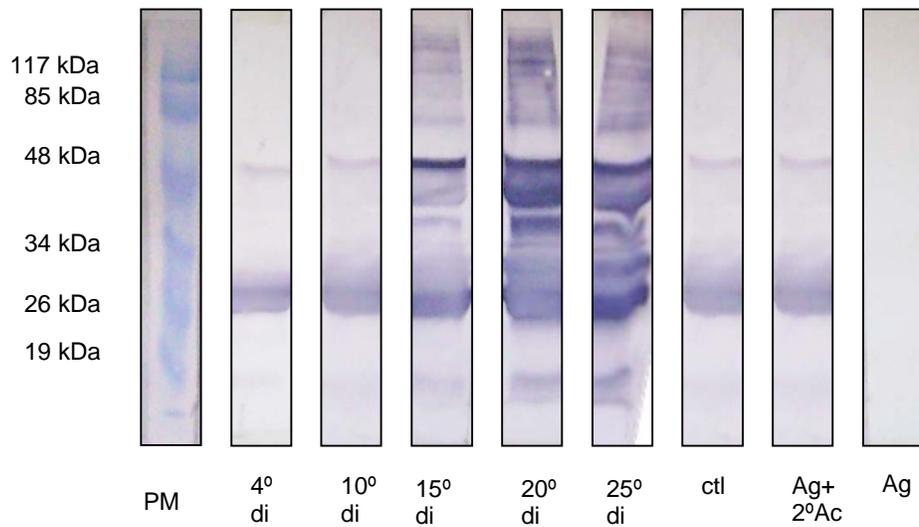


FIGURA 6 - *Western blot* utilizando como antígeno secreção e excreção de L₂ com 10 dias pós-infestação proveniente de camundongo *Swiss* versus *pool* de soros de camundongos *Swiss* colhido no 4^o dia de infestação (di), 10^o, 15^o, 20^o e 25^o di e de animais controle. Foram aplicados 20 µg de proteína em cada canaleta. Padrão molecular em kDa.

5.3. 3. Secreção e excreção de L₂/ L₃ (15 dpi) colhidas de camundongo Swiss versus soro de camundongos Swiss

A SE das larvas de 15 dpi mostraram positividade para proteína de 25,4 e 48 kDa em todas as membranas, com exceção da incubação apenas com o Ag (FIG. 6). Foram também reconhecidas proteínas com peso molecular entre 34-48 kDa, além de proteínas entre 85- 117 kDa nos soros do 15^o, 20^o e 25^o di.

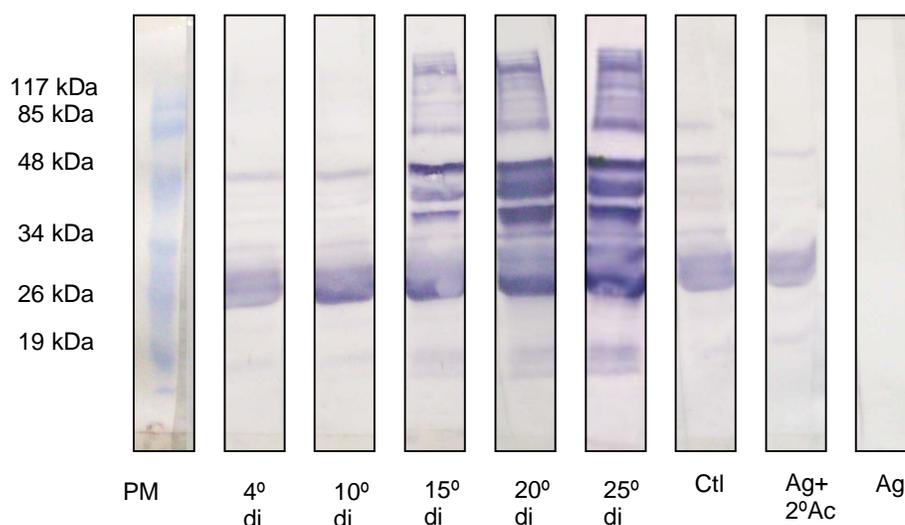


FIGURA 7 - *Western blot* utilizando como antígeno secreção e excreção de L₂/L₃ com 15 dias pós-infestação proveniente de camundongo Swiss versus *pool* de soros de camundongos Swiss colhido no 4^o dia de infestação (di), 10^o, 15^o, 20^o e 25^o di e animais controle. Foram aplicados 20 µg de proteína em cada canaleta. Padrão molecular em kDa.

5.3. 4. Secreção e excreção de L₃ (20 dpi) colhidas de camundongo *Swiss* versus soro de camundongos *Swiss*

As proteínas reativas de SE de larvas com 20 dpi ocorreram para os soros do 15^o, 20^o e 25^o di (Fig. 7): uma proteína com peso entre 34 e 48 kDa e outra acima de 48 kDa e uma proteína acima de 117 kDa. A membrana incubada apenas com Ag apresentou reação negativa.

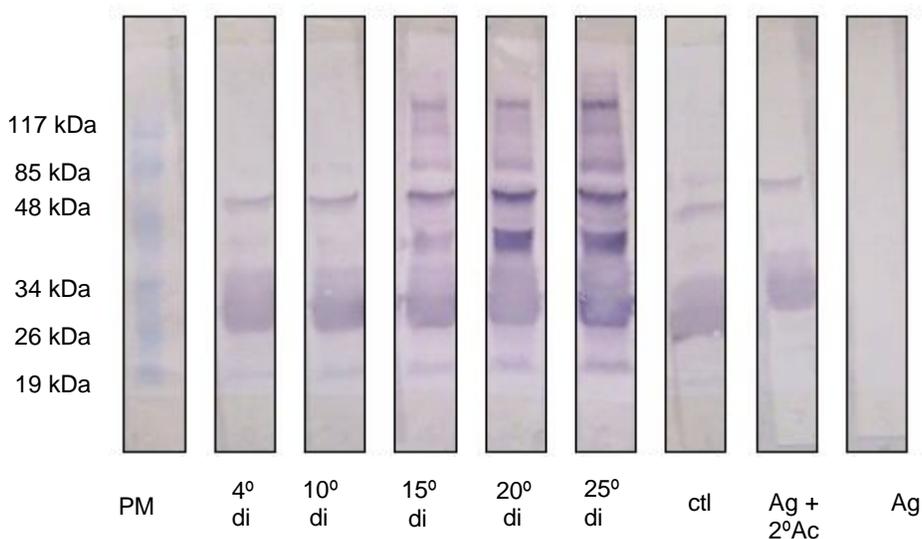


FIGURA 8 - *Western blot* utilizando como antígeno secreção e excreção de L₃ com 20 dias pós-infestação proveniente de camundongo *Swiss* versus *pool* de soros de camundongos *Swiss* colhido no 4^o dia de infestação (di), 10^o, 15^o, 20^o e 25^o di e de animais controle. Foram aplicados 20 µg de proteína em cada canaleta. Padrão molecular em kDa.

5.3. 5. Secreção e excreção de L₃ (25 dpi) colhidas de camundongo *Swiss* versus soro de camundongos *Swiss*

Nos ensaios com SE de L₃ (25 dpi) foram assinalados resultados positivos em todas as canaletas para as proteínas de 25,4 kDa e entre 34-48kDa, exceto para a membrana incubada apenas com Ag (FIG. 8). Uma proteína com 30,8 kDa apresentou-se reativa com maior intensidade na membrana incubada com soro do 20º di. São também observadas reações para as proteínas com peso próximo de 85 kDa nas membranas incubadas com os soros do 4º, 10º, 15º, 20º e 25º di. Além destas proteínas, foram visualizadas reações para proteínas com 117 kDa e acima deste tamanho pelos soros do 20º e 25º di.

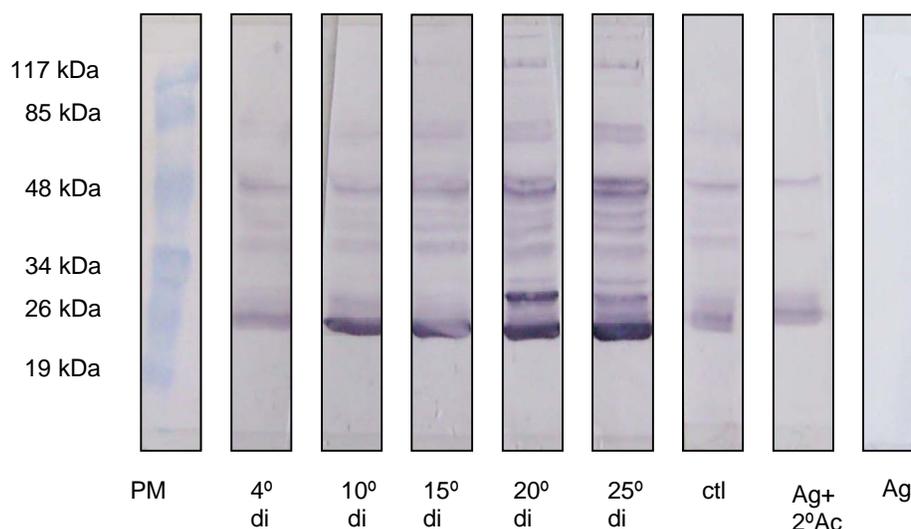


FIGURA 9 - *Western blot* utilizando como antígeno secreção e excreção de L₃ com 25 dias pós-infestação proveniente de camundongo *Swiss* versus *pool* de soros de camundongos *Swiss* colhido no 4º dia de infestação (di), 10º, 15º, 20º e 25º di e de animais controle. Foram aplicados 20 µg de proteína em cada canaleta. Padrão molecular em kDa.

5.3.6. Secreção e excreção de larvas colhidas em rato (5, 10, 15, 20 e 25 dpi) versus soro de camundongos *Swiss*

Na SE de L₁ (5 dpi), de L₂ (10 e 15 dpi) e L₃ (20 dpi) foram reconhecidas as proteínas de 25,4 kDa e 30,8 kDa (FIG. 9). A mesma reação foi visualizada na SE de L₂ (10 e 15 dpi) e L₃ (20 dpi).

Na SE de L₂ (10 dpi) foram também reconhecidas duas proteínas com peso próximo a 48 kDa e três acima de 117 kDa. A SE de L₂ (15 dpi) foi positiva para duas proteínas com peso próximo a 48 kDa. Adicionalmente, as proteínas de 25,4-30,8 kDa foram reconhecidas pela SE de L₃ (20 dpi), além de três outras entre 34-48 kDa e uma com aproximadamente 117 kDa.

Não foi observada reação positiva na membrana incubada com o soroctl.

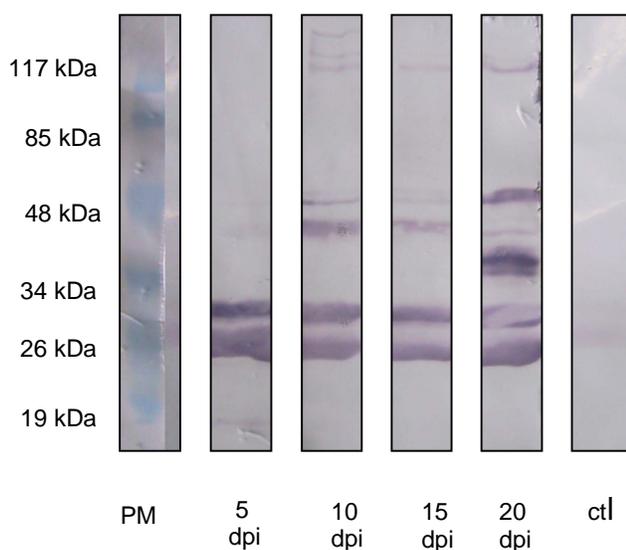


FIGURA 10 - *Western blot* utilizando como antígeno secreção e excreção (SE) de larvas colhidas em rato com 5 dias pós-infestação (dpi), 10, 15 e 20 dpi versus pool de soro no

25^o dia de infestação (di) proveniente de camundongos *Swiss* . O soro controle foi incubado com SE de larva com 25 dpi. Foram aplicados 20 µg de proteína em cada canaleta. Padrão molecular em kDa.

5.3.7. Secreção e excreção de L₃ colhidas de bovino versus soro de camundongos *Swiss*

A SE L₃ proveniente de bovinos reconheceu uma proteína com 25,4 kDa pelo *pool* de soro do 10^o, 15^o, 20^o, 25^o di (FIG. 10). A coloração mais intensa foi marcante no 25^o di. Além desta, uma proteína com 30,8 kDa é reativa para o soro do 20^o di. As reações inespecíficas observadas são sutis ou quase inexistentes.

Não foram observadas reações nas membranas incubadas com soro *ctl*, apenas Ag ou Ag + 2^o Ac marcado.

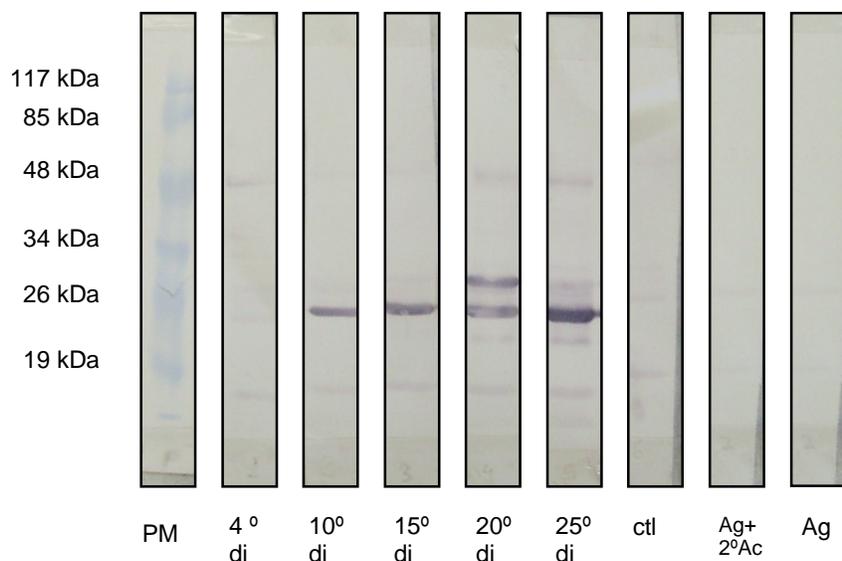


FIGURA 11 - *Western blot* utilizando como antígeno secreção e excreção de L₃ proveniente bovinos versus *pool* de soros de camundongos *Swiss* , colhido no 4^o dia de

infestação (di), 10°, 15°, 20° e 25° di e de animais controle. Foram aplicados 20 µg de proteína em cada canaleta. Padrão molecular em kDa.

5.3.8 MALDI-TOF

As duas proteínas mais evidentes de 25,4 e 30 kDa de L₁ (4 dpi) da amostra de SE, proveniente de camundongo *Swiss*, juntamente com uma proteína controle de 50 kDa (padrão molecular) estão indicadas no gel SDS-PAGE a 10% (FIG. 11).

O segmento das duas moléculas de SE de L₁ (Fig. 12 e 13), tendo como base de homologia os registros dos bancos de dados (NCBI e MSDB) permitiu identificar a proteína de 30,8 kDa como albumina bovina, enquanto que a proteína de 25,4 kDa não apresentou escore significativo.

O escore da proteína de 30,8 kDa foi de 136 (MSDB), com a probabilidade de significância de $p < 0,05$, indicando identidade ou extensa homologia com os dados dos bancos (QUADRO 1).

A homologia da proteína albumina bovina, no banco de dados do NCBI apresentou escore (bits) de 1243 e *E-value* 0.0 (FIG. 11) quando alinhada com outras sequências do banco de dados utilizando o programa Blast. A sobreposição dos peptídeos da proteína de 30,8 kDa com a sequência da proteína depositada no banco de dados foi de 6% (FIG. 12).

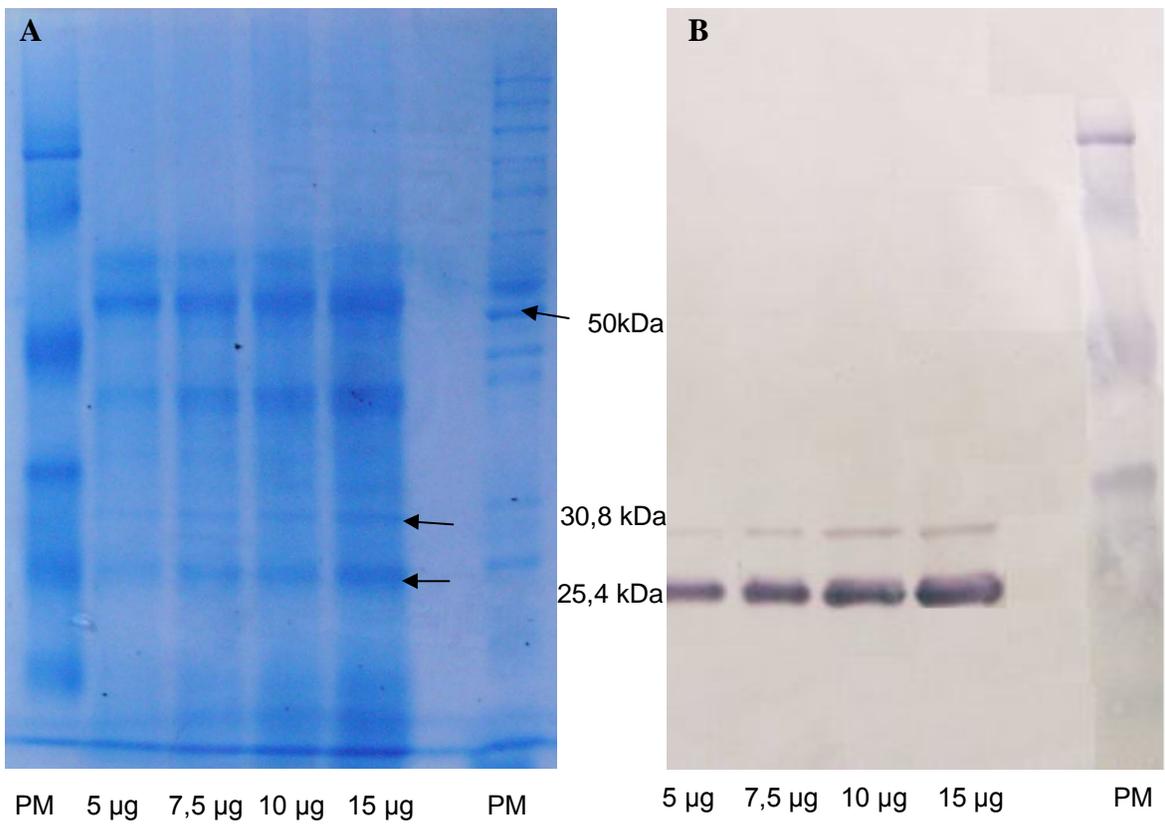


FIGURA 12 - (A) Gel SDS-PAGE a 10% com perfil eletroforético de secreção (SE) e excreção de L₁ com 4 dias pós-infestação nas concentrações 5; 7,5; 10 e 15 µg , corado por Coomassie Coloidal. (B) *Western blot* utilizando como antígeno SE com 4 dpi nas concentrações 5; 7, 5; 10 e 15 µg versus *pool* de soros colhidos no 25º dia de infestação. Padrão molecular em kDa.

```
>|gb|AAI02743.1| G ALB protein [Bos taurus]
Length=607

GENE ID: 280717 ALB | albumin [Bos taurus] (Over 10 PubMed links)

Score = 1243 bits (3216), Expect = 0.0, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 607/607 (100%), Positives = 607/607 (100%), Gaps = 0/607 (0%)
```

FIGURA 13. Análise de homologia em banco de dados. Sequência analisada pelo algoritmo “*protein-protein-Blast*” da PubMed www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).

```

1 MKWVTFISLL LLFSSAYSRG VFRRDTHKSE IAHRFKDLGE EHFKGLVLIA
51 FSQYLQQCPF DEHVKLVNEL TEFAKTCVAD ESHAGCEKSL HTLEFGDELCK
101 VASLRETYGD MADCCAKQEP ERNECFLSHK DDSPDLPKPK PDPNTLCDEF
151 KADEKKFWGK YLYEIAARRHP YFYAPELLYY ANKYNGVFQE CCQAEDKGAC
201 LLPKIETMRE KVLTSARQR LRCASIQKFG ERAKAWVA RLSQKFPKAE
251 FVEVTKLVD LTKVHKECCH GDLLECADDR ADLAKYICDN QDTISSKLKE
301 CCDKPLLEKS HCIAEVEKDA IPENLPPLTA DFAEDKDVCK NYQEAKDAFL
351 GSFLYEYSRR HPEYAVSVLL RLAKYEATL EECCAADDPH ACYSTVFDKL
401 KHLVDEPQNL IKQNCDFEK LGEYGFQNEL IVRYTRKVPQ VSTPTLVEVS
451 RSLGKVGTRC CTKPESERMP CAEDYLSLIL NRLCVLHEKT PVSEKVTKCC
501 TESLVNRRPC FSALTPDETY VPKAFDEKLF TFHADICTLP DTEKQIKKQT
551 ALVELLKHKP KATEEQKTV MENFVAFVVGK CCAADDKEAC FAVEGPKLVV
601 STQTALA
```

FIGURA 14 - Sequência de aminoácidos da albumina bovina depositada em banco de dados (PubMed www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST). Em vermelho seqüência de peptídeos da proteína de 30, 8 kDa identificada em sobreposição a seqüência da albumina bovina.

Quadro1

Identificação das proteínas de secreção e excreção de L₁ de *Dermatobia hominis* colhida aos 4 dpi de camundongos *Swiss*

Banda excisada	Nome	Espécie	escore	Nº de acesso no NBCI
25,4 kDa	Não identificada	-----	<53	-----
30,8 kDa	Albumina bovina	<i>Bos taurus</i>	136	AAI02743
50 kDa	Aspartato quinase	<i>Escherichia coli</i>	564	KIECD3

As proteínas listadas foram identificadas com a probabilidade de significância de $p < 0,05$

6. Discussão

O uso universal de roedores como modelo experimental de enfermidades têm contribuído para decisivos avanços científicos (SUCKOW, WEISBROTH, FRANKLIN, 2006). Este contexto foi determinante para o presente estudo experimental, o que também se configura como um modelo susceptível e de baixo custo. A característica única entre os Oestridae de exercer parasitismo em múltiplos hospedeiros (de diferentes ordens) praticado por larvas de *D. hominis*, não poupou, em natureza, até espécies de pequenos roedores. Provavelmente, este fato tivera início desde o Paleoceno, há 60 milhões de anos atrás, período que registra a presença do inseto na América como fóssil (TOWNSEND, 1942), e que corresponde ao surgimento de roedores primitivos (ZUMPT, 1957), e, também de outros mamíferos pré-históricos de bóvidos, equídeos, primatas e marsupiais (KOWALSKI, 1981).

Um dos primeiros ensaios experimentais tendo camundongo como hospedeiro de larvas de *D. hominis*, foi reportado por Jobsen e Mourier (1972). Nele, os autores apenas mencionam o período de pré-patência (25-35 dias), o qual é semelhante ao agora descrito em camundongos das linhagens *Swiss* ou *Balb/c*.

Estudos em vertebrados têm suportado a hipótese que animais *inbred* podem ser mais susceptíveis a parasitos e patogenos (KELLER e WALLER, 2002), fato verificado em nossos experimentos utilizando camundongos *Balb/c*, mesmo infestado com uma larva de *D. hominis*. A morte de 50% dos animais infestados e os marcantes sinais clínicos (perda de peso, pelo eriçado e mucosas pálidas), mesmo após emergência da larva, contrasta com a não mortalidade e oligosinais clínicos dos animais *Swiss outbred*, incluindo os subgrupos que receberam múltiplas larvas.

São recentes e escassos os estudos sobre moléculas de larvas de *D. hominis* sob eletroforese. O uso de extrato total (macerado) de L₂ e L₃ de *D. hominis* em SDS-PAGE a 15% (sem imagens ilustrativas) foram referidas oito frações protéicas (citando apenas o peso molecular da menor delas) entre 60-97 kDa (FERNANDES *et al.*, 2007). Não obstante, somente a proteína identificada, de 60 kDa, tem analogia com os resultados desta dissertação, para L₁ e L₂. Quanto as outras proteínas, não é possível induzir comparação. A partir de sobrenadante de macerado total de larvas de *D. hominis* - em SDS-PAGE a 12% corado por prata - foram reveladas proteínas entre 14-94 kDa em L₂ e 21-63 kDa em L₃ (PIRES *et al.*, 2007), as quais poderão ser similares às expressas em SE tanto em L₂ como em L₃ do presente estudo, distribuídas entre 10-20 kDa.

Sendo considerada a intensidade de coloração das bandas das moléculas, entre 10-200 kDa (nesta dissertação), como concentração de proteínas, as mais intensas, de 25,4 e 30,8 kDa, ocorrem nos SE de 4, 10, 15 e 20 dpi, embora ausentes no SE de 25 dpi. Este fato poderá estar relacionado com a fase final de parasitismo da L₃ no hospedeiro, isto é, a larva estava prestes a emergir e sofrer metamorfose para pupa. Deve-se corroborar com esta previsão o distinto perfil protéico da SE aos 25 dpi em comparado com as demais idades estudadas.

Um marcante parâmetro de similaridade das bandas de proteínas ocorreu entre as SE aos 10 e 15 dpi. Esta última idade continha larvas típicas de L₂ e de L₂ em metamorfose para L₃. Neste período de muda, que corresponde a repouso alimentar, as SE expelidas provavelmente contêm produtos ainda provindos da fase de L₂.

A comparação entre o perfil de migração de SE de larvas de *D. hominis* aos 4, 10, 15, 20 e 25 dpi, provavelmente indica haver estágio específico, sugerindo

diferenças na composição do metabolismo da larva e propriedades antigênicas como foi observado para larvas de L₂ e L₃ de *Gasterophilus intestinalis* – causadora de miíase intestinal de equídeos (ROELFSTRA *et al.*, 2009).

Nos ensaios utilizando *Western blot*, envolvendo tanto larvas como soro provindos de camundongos, a primeira proteína de L₁, de 25,4 kDa, foi reconhecida pelo soro de 10^o di; seguida pela proteína de 30,8 kDa e uma outra com aproximadamente 48 kDa. Os aparentes reativos *backgrounds* no soro ctl+Ag+2^o Ac e na banda Ag+2^o Ac foi de difícil superação, pois no início da infestação, aos 4 dias, os camundongos provavelmente não teriam ainda produzido IgG anti-SE da L₁. Intensidades de coloração mais reativa, em função da idade da larva, ocorreram progressivamente com SE de L₂ (10 dpi); L₂/L₃ (15 dpi); L₃ (20 e 25 dpi) versus soro ctl+Ag+2^o Ac ou Ag + 2^o Ac, sugerindo que, a associação das idades das larvas e das infestações, poderia induzir a presença de imunoglobulinas ou fragmentos destas nas SE, provindas no alimento ingerido pelas larvas durante o parasitismo nos camundongos. Em contraste, nos testes utilizando SE de larvas provenientes de ratos versus soro de camundongo, ocorreu resultados negativos na membrana contendo soro Ctl. Este resultado é confirmado quando SE de L₃ de bovinos foi usado, inclusive para nos testes de Ag+2^o Ac. Eisemann *et al.* (1993) demonstraram a presença de anticorpos de ovinos em diferentes partes do intestino e hemolinfa de L₂ e L₃ de *L. cuprina* que parasitavam tais hospedeiros, os que tinham sido previamente imunizados com mioglobinas de equino. Em larvas cultivadas *in vitro*, meio de cultura acrescida de soro de ovelhas, os resultados foram semelhantes. IgG de bovinos parasitados com L₁ de *H. lineatum* - cujo estágio larvar migra durante seis meses dentro do hospedeiro - foi identificada como Ac na luz do intestino médio da larva do referido Oestridae (COLWELL e LEGGETT, 2004). Em adição, é pertinente ressaltar que produtos de SE de parasitos têm sido envolvidos na relação dele com o hospedeiro, tanto a partir do momento de contato como de penetração e sobrevivência, usando de estratégias de evasão (clivagem de IgG), subversão (imunossupressão através de H₂O₂ agindo sobre linfócitos T) e defesa (lançando superóxido transmutase para detoxicar O₂ produzido por eosinófilos e neutrófilos) contra o sistema imune do hospedeiro (JEFFERIES *et al.*, 2001).

É provável que as reações observadas no controle negativo e nas amostras incubadas, apenas com anti-IgG de camundongo e SE colhidas aos 10, 15, 20 e 25 dpi de larvas que se desenvolveram em camundongos, estariam ocorrendo entre o 2º Ac e imunoglobulinas ou fragmentos destas presentes nas SE.

Como resultado, observamos reação contra uma proteína 25,4 kDa para *pool* de soro colhido no 10º, 15º, 20º e 25º di de camundongos. O soro do 20º di foi o único que reconheceu uma proteína de 30,8 kDa. Não são observadas reações na membrana incubada com soro controle ou com 2º Ac, demonstrando que estas proteínas antigênicas são provavelmente oriundas dos produtos de SE das larvas de *D. hominis*. O perfil de resposta obtido com a L₃ de bovino foi semelhante à resposta que ocorre aos 25 dpi (L₃). Neste último as reações inespecíficas relatadas para 10, 15 e 20 dpi permaneceram as mesmas.

Com relação à identidade proteômica aqui apresentada, envolvendo duas proteínas que mais expressivas em larvas de *D. hominis* (exceto em SE de L₃, 25 dpi), apenas a de 30,8 kDa apresentou escore de significância de 136 analisado no MASCOT e homologia com albumina bovina. Moléculas do parasito semelhantes à albumina do hospedeiro já foram encontradas em parasitos: adultos de *Dirofilaria immitis* (KADIPASAOGLU e BILGE, 1989); adultos e microfilárias de *Dracundulus medinensis* (BLOCH *et al.*, 1999); adultos, microfilárias e larva infectante (L₃) de *Wuchereria bancroft* (PEIXOTO *et al.*, 1999; SILVA *et al.*, 2006); adultos e esquistossomos de *Schistosoma mansoni* (SAYAD *et al.*, 2006; WILLIAMS *et al.*, 2006) e, recentemente, albumina bovina identificada em SE de L₂ e L₃ de *G. intestinalis* (ROELFSTRA, *et al.*, 2009) e no helminto *Fasciola hepatica* (MORPHEW, *et al.*, 2007). É prudente ressaltar, que os resultados pertinentes a *S. mansoni* (acima referidos) foram contestados por DeMarco *et al.*, (2007) quando provaram, experimentalmente, ser originária de hamster (não do próprio *S. mansoni*) a albumina encontrada no Trematoda, sendo os registros dos então autores provavelmente decorrentes de contaminação. No entanto, DeMarco *et al* (2007) não foram capazes de explicar a presença da albumina do hospedeiro presente dentro dos ovos de *S. mansoni*.

Quanto a proteína de 25,4 kDa não foi possível fazer sua identificação por ter apresentado baixo escore. Como alternativa, foi feito o sequenciamento *de novo* e obtido 5 aminoácidos quantia insuficiente para análise comparativa de alinhamento com sequências de peptídeos já depositados no NCBI. Também não está excluída a possibilidade de que a molécula de 25,4 kDa seja elucidada em ensaios futuros sobre proteoma de *D. hominis*.

7. Conclusão

A exposição de dados retrospectivos e inovadores revelados nos estudos preliminares desta Dissertação de Mestrado permitiu sumariamente inferir:

8.1. O camundongo *Swiss* é um modelo experimental adequado para infestações por *D. hominis*, pois suporta a infestação com uma a três larvas. Em contraste, os

camundongos *Balb/c* apresentam alta mortalidade o que desencoraja o seu uso em ensaios paralelos.

8.2. O perfil eletroforético das proteínas da SE das larvas mostrou ser estágio específico.

8.3. Os testes de *Western blot* com SE de larvas e soro, ambos coletados de camundongos *Swiss* (hospedeiro homólogo), revelaram marcante positividade, as reações inespecíficas observadas só foram efetivamente comprovadas quando os resultados negativos ocorrem nos ensaios com SE de larvas coletadas de hospedeiros heterólogos (ratos e bovinos).

8.4. De ocorrência inusitada, a identidade da proteína de 30,8 kDa com a sequência de peptídeos similar ao da albumina bovina é um registo já verificado em outros parasitos (não de bovinos).

8.5. As informações sobre o sequenciamento da proteína de 25,4 kDa não foram suficientes para a sua nomenclatura em analogia com os bancos de dados disponíveis.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ÂNGULO-VALADEZ, C. E.; CEPEDA-PALACIOS, R.; JACQUIET, P.; DORCHIES, P.; PRÉVOT, F.; ASCENCIO-VALLE, F.; RAMIREZ-ORDUÑA, J. M.; TORRES, F. Effects of immunization of Pelibuey lambs with *Oestrus ovis* digestive tract rotein extracts on

larval establishment and development. **Veterinary Parasitology**, v. 143, p. 140-146, 2007.

ASHTON, P. D.; CURWEN, R. S.; WILSON, R. A. Linking proteome and genome: how to identify parasite proteins. **Trends in Parasitology**. V. 17, n.4, p. 198-202, abril 2001.

BARBOSA, C. G.; SANAVRIA, A.; BARBOSA, M. D. P. R. C. Alterações hematológicas em bovinos infestados experimentalmente com larvas de *D. hominis* (Diptera: Cuterebridae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 12, n. 2, p. 61-67, 2003.

BLOCH, P.; LUND, M.; VENNERVALD, B. J.; SIMONSEN, P. E. Human serum albumin and immunoglobulin on *Dracunculus medinensis*. **Acta Tropica**, v. 73, p. 135-141, 1999.

BOULARD, C. Etude préliminaire d'une colagénase de la larve d'*Hypoderma lineatum* (The Villers). **Les Comptes Rendus de l'Académie des sciences**, Paris, v. 270, p. 1349-1351, 1970.

BOULARD, C. Degradation of bovine C3 by serine proteases from parasites *Hypoderma lineatum* (Diptera, Oestridae). **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 20, p. 387-398, 1989.

BOULARD, C.; BENCHARIF, F. Changes in the haemolytic activity of bovine serum complement by *Hypoderma lineatum* larval proteinases in naïve and immune cattle. **Parasite Immunology**, v. 6, p. 459-467, 1984.

BOULARD, C.; GARRONE, R. Characterization of a collagenolytic enzyme from larvae of *Huypoderma lineatum* (Insecta: Diptera: Oestriiform). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 59, p. 251-255, 1978.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRITO, L. G.; MOYA-BORJA, G. E. Flutuação sazonal de *Dermatobia hominis* em peles bovinas oriundas de matadouros. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 20, p. 151-154, 2001.

CAMPOS, M. Disponível em : <<http://www.icb.usp.br/~marcelcp/Dermatobia.htm>>. Acesso em 16 maio 2009.

CASU, R.; EISEMANN, C.; PEARSON, R.; RIDING, G.; EAST, L.; TELLAM, R. L. Antibody-mediated inhibition of the growth of larvae from an insect causing cutaneous myiasis in a mammalian host. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, p. 8939-8944, 1997.

CATTS, E. P. Biology of new world bot flies: Cuterebridae. **Annual Review of Entomology**, v.27, p. 313-338, 1982.

CHAIA, G.; MOYA-BORJA, G. E.; CHIARI, L.; SANTOS, C. N.; ABREU, R. T. L. Experimental chemotherapy of dermatobioses in laboratory animals. **Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 17, n. 5, p. 298-306, set-out 1975.

COLWELL, D. D.; HALL, M. J. R.; SCHOLL, P. J. **The Oestrid flies: Biology, host-parasite relationships, impact and management**. Oxfordshire: CABI International, 2006. 359p.

COLWELL, D. D.; LEGGETT, F. Uptake of bovine IgG by first instars of the common cattle grub, *Hypoderma lineatum*. **International Journal for Parasitology** , v. 34, p. 219-223, 2004.

DE AZEREDO-ESPIN, A. M.; LESSINGER, A.C. Genetic approaches for studying myiasis-causing flies: molecular markers and mitochondrial genomics. **Genetica**, v. 126, n. 1-2, p. 111-131, jan 2006.

DE FILIPPIS, T.; LEITE, A. C. R Scanning electron microscopy studies on the first-instar larva of *Dermatobia hominis*. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 11, n. 2, p. 165-171, 1997.

DEMARCO, R.; MATHIESON, W. DILLON, G. P.; WILSON, R. A. Schistosome albumin is of host, not parasite, origin. **International Journal for Parasitology**, v. 37, p. 1201-1208, 2007.

DUNN, L. H. Rearing the larvae of *Dermatobia hominis* Linn., in man. **Psyche.**, v. 37, n. 4, p. 327-342, 1930.

EISEMANN, C. H.; PEARSON, R. D., DONALDSON. R. A.; CADOGAN, L. C., VUOCOLO, T. Uptake and fate of specific antibody in feeding larvae of the sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. **Medical and Veterinary Entomology**, v.7, p. 177-185, 1993.

EVANGELISTA, L.G.; LEITE, A.C.R. Midgut ultrastructure of the third instar of *Dermatobia hominis* (Diptera: Cuterebridae) based on transmission Electron microscopy. **Journal of Medical Entomology**, v. 40, n. 2, p. 133-140, Mar, 2003.

EVANGELISTA, L.G.; LEITE, A.C.R. Optical and ultrastructural studies of midgut and salivary glands of first instar of *Dermatobia hominis* (Diptera: Oestridae). **Journal of Medical Entomology**, v. 42, n. 3, p. 218-223, Maio 2005.

EVANGELISTA, L.G.; LEITE, A.C.R. Salivary glands of second and third instars of *Dermatobia hominis* (Diptera: Oestridae). **Journal of Medical Entomology**, v. 44, n. 3, p. 398-404, Maio 2007.

FARKAS, R.; HORNOK, S.; GYURKOVSKY, M. Preliminary studies on humoral immune response of sheep to wohlfahrtiosis. **Veterinary Parasitology**, v. 75, p.279–284.1998

FERNANDES, N. L. M.; SOCOL, V. I.; PINTO, S. B.; MINOZZO, J. C.; OLIVEIRA, C. A. L. Reposta imune humoral e celular em bovinos da raça Nelore imunizados com extrato de larvas (L2 e L3) de *Dermatobia hominis* (Linnaeus Jr., 1781) **Revista Rural**, v. 37, n. 3, p.789-745, mai-jun, 2007.

FRUGÈRE, S.; LEON, A. C.; PREVOT, F.; PALACIOS, R. C.; TABOURET, G.; BERGEAUD, J. P.; DURANTON, C.; DORCHIES, P. J.; JACQUIET, P. Immunisation of lambs with excretory secretory products of *Oestrus ovis* third instar larvae and subsequent experimental challenge. **Veterinary research**, v. 31, p. 537-535, 2000.

GONÇALVES, J. M.; PEREIRA, C. T.; EVANGELISTA, L. G.; LEITE, C. R. Expression of circulating leucocytes before, during and after myiasis by *Dermatobia hominis* in experimentally infected rats. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 49, n. 5, p. 289-292, 2007.

GORDON, J. R.; ALLEN, J. R. Isolation and characterization of salivary antigens from the female tick, *Demacentor andersoni*. **Parasite Immunology**, v.9, p. 337-352, 1987.

GRISI, L.; MASSARD, C. L.; MOYA-BORJA, G. E.; PEREIRA, J. B. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. **A Hora Veterinária**. v. 21, p. 8-10. 2002

GUIMARÃES, J.H.; PAPAVERO, N. Myiasis caused by obligatory parasites VI. *Dermatobia hominis* (Linnaeus Jr.) (Cuterebridae). In: GUIMARÃES, J.H.; PAPAVERO, N. (Ed.) **Myiasis in man and animals in the neotropical region**. São Paulo: Plêiade, 1999. p. 257-302.

HABERMANN, B. OEGEMA, j.; SUNYAEV, S.; SHEVCHENKO, A. The power and the limitations of cross-species protein identification by mass spectrometry-driven sequence similarity searches. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 3, n. 3, p. 238-249, 2004.

HALL, M. J.; WALL, R. Myiases of humans and domestic animals. **Advances in Parasitology**, v. 35, p. 257-334, 1995.

INNOCENTI, L.; MASETTI, N.; MACCHIONI, G.; GIORGI, F. Larval salivary gland proteins of sheep nasal bot fly, (*Oestrus ovis* L.), are major immunogens in infested sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 60, p. 273-282, 1995.

JOBSEN, J.A., MOURIER, H. The morphology of the larval instars and pupa of *Dermatobia hominis* (Diptera: Cuterebridae). **Entomologische Berichten**, v. 32, p. 218-224, 1972.

JEFFERIES, J. R.; CAMPBELL, A. M.; VAN ROSSUM, A. J.; BARRETT, J.; BROPHY, P. M. Proteomic analysis of *Fasciola hepatica* excretory-secretory products. **Proteomics**, v. 1, n. 9, p. 1128-1132, set. 2001.

KELLER, L. F.; WALLER, D. M. Inbreeding effects in wild populations. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 17, n. 5, p. 230-241, maio 2002.

KADIPASAOGLU, A. K.; BILGE, F. H. Partial characterization of the adsorbed protein layer on *Dirofilaria immitis* (Nematoda) cuticle. **Parasitology research**, v. 75, n. 7, p. 554-558, 1989.

KERLIN, R. L.; EAST, I. J. Potent immunosuppression by secretory/excretory products of larvae from the sheep blowfly *Lucilia cuprina*. **Parasite Immunology**, v. 14, p. 595-604, 1992.

KOWALSKI, K. **Mamíferos**: manual de teriologia. Madrid: H. Blune Ediciones, 1981, 532p.

KOONE, H. D. BANEGAS, A. L. Biology and control of *Dermatobia hominis* (L. Jr.) in Honduras (Diptera: Cuterebridae). **Journal of the Kansas Entomological Society**, v. 32, p. 100-108, 1959.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 224, p. 680-685, August 1970.

LECROISEY, A.; BOULARD, C.; KEIL, B. Chemical and enzymatic characterization of the collagenase from the insect *Hypoderma lineatum*. **European Journal of Biochemistry**, v. 101, p. 385-393, 1979.

LELLO, E. Larval-host parasite relationships: Part B: Cuterebrinae host-parasite interactions. In: COLWELL, D. D.; HALL, M. J. R.; SCHOLL, P. J. **The Oestrid Flies: biology, host-parasite relationships, impact and management**. CABI Publishing, p. 179-189, 2006.

LELLO, E.; BOULARD, C. Rabbit antibody responses to experimental infestation with *Dermatobia hominis*. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 4, p. 303-309, 1990.

LELLO, E.; PERAÇOLI, M. T. S. Cell-mediated and humoral immune responses in immunized and/ or *Dermatobia hominis* infested rabbits. **Veterinary Parasitology**, v. 47, p. 129-138, 1993.

LELLO, E. ROSIS, A. M. B. Inflammatory reaction to the human botfly, *Dermatobia hominis*, in infested and reinfested mice. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 17, p. 55-60, 2003.

LELLO, E.; MOTA, N. G. S. PERAÇOLI, M. T. S. Reação inflamatória causada pelo berne em coelhos imunizados ou não com extrato antigênico de *Dermatobia hominis* (Diptera: Cuterebridae). **Ciência e Cultura**, v. 32, p. 458-462, 1980.

LESSINGER, A. C.; AZEREDO-ESPIN, A. M. L. Evolution and structural organisation of mitochondrial DNA control region of myiasis-causing flies. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 14, p. 71-80, 2000.

MORPHEW, R. M.; WRIGHT, H. A.; LACOURSE, E. J.; WOODS, D. J.; BROPHY, P. M. Comparative Proteomics of Excretory-Secretory Proteins Released by the Liver Fluke *Fasciola hepatica* in Sheep Host Bile and during in Vitro culture ex Host. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 6, n. 6, p. 963-972, jun. 2007.

MOTA, N. G. S.; PERAÇOLI, M. T. S.; LELLO, E. Anticorpos circulantes em coelhos imunizados obtidos de larvas de *Dermatobia hominis* Linnaeus (Diptera: Cuterebridae). **Ciência e Cultura**, v. 32, p. 453-457, 1980.

MOYA-BORJA, G. E. Erradicação ou manejo integrado das miíases neotropicais das américas?. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 23, p. 131-138, 2003.

MUHARSINI, S.; SUKARSIH, G. R.; SUTIJONO, P.; HAMILTON, S.; WILLADSEN, P.; WIJFFELS, G. identification and characterization of the excreted/secreted serine proteases of larvae of the Old World Screw worm Fly, *Chrysomya bezziana*. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 705-714, 2000.

NEEL, W. W.; URBINA, O.; VIALE, E.; ALBA, J. Ciclo biológico del tórsalo *Dermatobia hominis* (L. Jr.) en Turrialba **Turrialba**, v. 5, n. 3, p. 91-103, 1955.

NEIVA, A. Algumas informações sobre o berne. **Chácaras e Quintais**, v. 2, p. 2-8, 1910.

NEIVA, A.; GOMES, J. F. Biologia da mosca do berne (*Dermatobia hominis*) observada em todas as suas fases. **Anais Paulistas de Medicina e Cirurgia**, v. 8, p. 197-209, 1917.

NICOLAS-GAULARD, I.; MOIRE, N.; BOULARD, C. Effect of the parasite enzyme, hypodermin A, on bovine lymphocyte proliferation and interleukin-2 production via the prostaglandin pathway. **Immunology**, v. 85, p. 160-165, 1995.

NOEL, S.; ANGERS, B.; LAPOITE, F. J. *Peromyscus* populations and their *Cuterebra* parasites display congruent phylogeographical structure. **Parasitology**, v. 131, p. 237-245, ago. 2005.

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

PAPE, T. Phylogeny of Oestridae (insecta: Diptera). **Systematic Entomology**, v. 26, p. 133-171, 2001.

PEIXOTO, C. A.; NORÕES, J.; ROCHA, A.; DREYER, G. Immunocytochemical localization and distribution of human albumin in *Wuchereria bancrofti* adult worms. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, v. 123, p. 173-177, Feb. 1999.

PERAÇOLI, M. T. S.; LELLO, E.; MOTA, N. G. S. Comportamento da resposta imune-humoral em coelhos imunizados com antígenos de *Dermatobia hominis* Linnaeus, frente as larvas desse parasita (Diptera: Cuterebridae). **Ciência e cultura**, v. 32, p. 1537-1541, 1980.

PEREIRA, M. C. T.; LEITE, V. H. R.; LEITE, A. C. R. Experimental skin lesions from larvae of the bot fly *Dermatobia hominis*. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 15, p.1-6, 2001.

PEREIRA, M. C. T.; LEITE, A. C. R. Eosinophil and mast cell expression in host skin during larval development of the human bot fly *Dermatobia hominis*. **Parasite**, v. 9, n. 4, p. 333-339, 2002.

PERKINS, D. N.; PAPPIN, D. J. C.; CREASY, D. M.; COTTRELL, J. S. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. **Electrophoresis**, V. 20, N° 18, p. 3551-3567, 1999.

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

RIBEIRO, J. M. C. Insect saliva: function, biochemistry and physiology. In: CHAPMAN, R.F., BOER, G. (Ed.). **Regulatory mechanisms in insect feeding**. New York: Chapman e Hall, 1995. p. 74-98.

RIBEIRO, J. M. C.; FRANCISCHETTI, I. M. B. Role of arthropod saliva in blood feeding: sialome and post-sialome perspectives. **Annual Review of Entomology**, v. 48, p. 73-88, 2003.

ROELFSTRA, L.; DEEG, C. A.; HAUCK, S. M., BUSE, C.; MEMBREZ, M.; BETSCHART, B.; PFISTER, K. Protein expression profile of *Gasterophilus intestinalis* larvae causing horse gastric myiasis and characterization of horse immune reaction. **Parasites e Vectors**, v. 2, jan 2009

SANCHO, E.; CABALLERO, M.; RUÍZ-MARTINEZ, I. The associated microflora to the larvae of human bot fly *Dermatobia hominis* L. Jr. (Diptera: Cuterebridae) and its furuncular lesions in cattle. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 3, p. 293-298, 1996.

SCHWINGHAMMER, K. A.; PRUETT, J.J.; TEMEYER, K.B. Biochemical and immunochemical properties of hill peak 2, na íon exchange fraction of common cattle grub (Diptera: Oestridae). **Journal of Economic Entomology**, v. 81, p. 549-554, 1988.

SILVA, L. F.; BRAYNER, F.A.; SANTOS, A.C.; LANFREDI, R.M.; PEIXOTO, C.A. Identification and location of albumin-like antigens in third-stage larva of *W. bancrofti*, in adult forms of *Litomosoides chagasfilhoi* and in the free-living nematode *Caenorhabditis elegans*. **Micron**, v. 37, p. 666-674, 2006.

SUCKOW, M. A.; WEISBROTH, S. H.; FRANKLIN, C. L. **The laboratory rat**. 2. ed. Boston: Elsevier, 2006. 912 p.

TABOURET, G.; VOULDOUKIS, I.; DURATON, C.; PREVOT, F.; BERGEAUD, J. P.; DORCHIES, P.; MAZIER, D.; JACQUIET, P. *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae): effects of larval excretory/secretory products on nitric oxide production by murine RAW 264-7 macrophages. **Parasite immunology**, v. 23, n. 111-119, 2001.

TELLAM, R. L.; BOWLES, V. M. Control of blowfly strike in sheep: current strategies and future prospects. **International Journal for Parasitology**, v. 27, p. 261-273, 1997.

TELLAM, R. L.; EISEMANN, C.; CASU, R.; PEARSON, R. The intrinsic peritropic matrix protein peritrophin-95 from larvae of *Lucilia cuprina* is synthesized in the cardia and regurgitated or excreted as highly immunogenic protein. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 30, p. 9-17, 2000.

TELLAM, R. L.; EISEMANN, C.; VUOCOLO, T.; CASU, R.; JARMEY, J.; OWLES, V.; PEARSON, R. role of oligosaccharides in the immune response of sheep vaccinated with *Lucilia cuprina* larval glycoprotein, peritrophin-95. **International Journal for Parasitology**, v. 31, p. 798-809, 2001.

TEMEYER, K. B.; PRUETT, J. H. Preparation of biological active messenger RNA from larvae of the common cattle grub (Diptera: Oestridae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 83, p.55-58, 1990.

TONG, N. T.; IMHOFF, J. M.; LECROISEY, A. Hypodermin A, a trypsin-like neutral proteinase from the insect *Hypoderma lineatum*. **Biochemica et Biophysica Acta**, v. 658, p. 209-219, 1981.

TORTUGA, A. A. **Noticiário Tortuga**, n. 285, 1979.

TOWNSEND, C. H. T. **Manual of miology**; general consideration of the Oestromuscaria. São Paulo: Charles Townsend e Filhos, 1942. v. 12, 365p.

TOWBIN, H; STAEHELIN, T; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 76, n. 9, p. 4350-4354, 1979.

VIEIRA, A. M.; LELLO, E. Post-embrionic development of the digestive tube of *Dermatobia hominis* (Linnaeus) (Diptera: Cuterebridae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 13, p. 1063-1074, 1996.

WASINGER, V. C.; CORDWELL, S. J.; CERPA-POLJAK, A.; YAN, J. X.; GOOLEY, A. A.; WILKINS, M. R.; DUNCAN, M. W.; HARRIS, R.; WILLIAMS, K. L.; HUMPHERY-SMITH, I. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: Mycoplasma genitalium. **Electrophoresis**, v. 16, n. 7, p. 1090-1094, jul. 1995.

WILKINS, M. R.; SANCHEZ, J. C.; GOOLEY, A. A.; APPEL, R. D.; HUMPHERY-SMITH, I.; HOCHSTRASSER, D. F.; WILLIAMS, K. L. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. **Biotechnology & Genetic Engineering Reviews**, v. 13, p.19-50, 1996.

WILLADSEN, P.; RIDING, G. A.; MCKENNA, R. V.; KEMP, D. H.; TELLAN, R. L.; NIELSE, J. N.; LAHNSTEIN, J.; COBON, G. S.; GOUGH, J. M. Immunologic control of a parasitic arthropod. Identification of a protective antigen from *Boophilus microplus*. **Journal of Immunology**, v. 143, p. 1346-1351, 1989.

WILLADSEN, P.; SMITH, D.; COBON, G. S; MCKENNA, R. V. Comparative vaccination of cattle against *Boophilus microplus* with recombinant antigen Bm₈₆ alone or in combination with recombinant Bm₉₁. **Parasite Immunology**, v. 18, n. 5, p. 241-246, May 1996.

WILLIAMS, D. L.; SAYED, . A.; RAY, D.; MCARTHUR, A. G. *Schistosoma mansoni* albumin, a major defense against oxidative damage, was acquired by lateral gene transfer from a mammalian host. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 150, n. 2, p. 359-363, dez 2006.

WOOD, D. M. Oestridae. In: MCALPINE, J. F. (ed.). **Manual of Nearctic Diptera**, Reserch Branch agriculture Canada, Monograph, n. 28, Ottawa, Canada, v. 2, p. 1147-1158, 1987.

ZUMPT, F. Some remarks on the classification of the Oestridae *S. lat.* (Diptera). **Journal of the Entomological Society of South Africa**, v. 20, n. 1, p. 31-87, 1957.