UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

NELSON LUIS MELLO FERNANDES

CARACTERIZAÇÃO E PRODUÇÃO DE PROTEÍNA IMUNOGÊNICA CONTRA LARVAS DE *Dermatobia hominis* E IMUNIZAÇÃO DE BOVINOS COM A PROTEÍNA Dh50 kDa.

CURITIBA

2008

NELSON LUIS MELLO FERNANDES

CARACTERIZAÇÃO E PRODUÇÃO DE PROTEÍNA IMUNOGÊNICA CONTRA LARVAS DE *Dermatobia hominis* E IMUNIZAÇÃO DE BOVINOS COM A PROTEÍNA Dh50 kDa

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Processos Biotecnológicos, Área de Concentração: Saúde Humana e Animal.

Orientadora: Prof[a]. Dr[a]. Vanete Thomaz Soccol

Co-orientador: Prof. Dr. Silvio Marques Zanata

CURITIBA

2008

TERMO DE APROVAÇÃO

Dedico este Trabalho

... Às minhas queridas" meninas", Jô, Ana Júlia e Ana Paula, que compartilharam as agruras da empreitada, a certeza que, havendo conquista, esta também lhes pertence.

...Ao meu pequeno"guri", Matheus,que chegou na reta final desta caminhada, reafirmando a união e afeto que une nossa família

AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Vanete Thomaz Soccol, por sua valiosa orientação, pelo aconselhamento oportuno e a crítica construtiva que permitiu o meu enriquecimento profissional e pessoal.

Ao Professor Dr. Silvio Marques Zanata, pela criteriosa co-orientação e contribuições imprescindíveis no desenvolvimento desse trabalho.

Aos coordenadores do curso de Pós-Graduação, Professor Dr. Carlos Ricardo Soccol e Professora Dra. Luciana de Souza Vandenberghe pela dedicação e empenho dispensados ao curso.

Ao Corpo docente do Curso de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, pelo estímulo constante da busca e aperfeiçoamento.

A Professora Dra. Adriana Frohlich Mercadante pelo rigor e competência na orientação nas análises de extração de RNA e pela fundamental contribuição no desenvolvimento deste trabalho.

À Universidade Federal do Paraná – UFPR, pela oportunidade concedida para a realização deste trabalho.

Ao Professor Dr. José César Rosa, do Departamento de Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP, pelo seqüenciamento por CID-MS/MS.

As Professoras de Parasitologia, Dra. Edilene A. de Castro e Dra. Rosângela C. Paulino, pelo convívio nesses anos.

Às técnicas do Laboratório de Parasitologia Molecular do Departamento de Patologia Básica, Juliana Tracz e Luciane Hennig, pelas gentilezas concedidas e competência dedicada durante todo o período da Pós-Graduação.

Ao técnico do Laboratório de Histologia Animal da UFPR – *Campus* Palotina, Milton Rönnau pela colaboração no preparo do material histológico.

Aos colegas do Laboratório de Parasitologia Molecular, Juliana Tracz Pereira, Silvia Osaki, Samira Chahad Ehlers, Viviane Milczewsk, Cristina Sotomaior, Fernanda Rosalinski, Silvana Alban, Elen Marquez, Soraia Gilber, Sandro Lunedo, Yanê Carvalho, Jessé Trupel, pela amizade, companheirismo e cumplicidade de todos estes anos, que sempre serão lembradas.

Aos colegas do curso de Pós Graduação Michele, Cristina, Cristine, Tânia Penha, Wilerson, Jessiel, Clarisse, Gisele, Katherine, Caesar e Daniel, pela agradável convivência e pelas oportunidades de aprendizagem compartilhadas no decorrer do curso.

Aos doutorandos do Laboratório de Neurociências, Joselito Getz e Micheli Dietrich Moura Costa, pela eficiência e seriedade dedicadas no auxílio do preparo do material experimental.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa concedida.

Ao Daniel Bussolaro, doutorando do curso de Biologia Celular, pelo tempo compartilhado e companheirismo. À Dona Diva minha gratidão pelo apoio, amizade e acolhida em sua casa.

À todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para este trabalho.

"As pessoas que vencem neste mundo são as que procuram as circunstâncias de que precisam e, quando não as encontram, as criam."

Bernard Shaw

RESUMO

O presente experimento teve como objetivo a obtenção e caracterização antigênica de proteínas obtidas a partir de extratos de *Dermatobia hominis*. A partir de cada estádio larval foram produzidos os extratos para imunização de coelhos e conseqüente produção de anticorpos policlonais. Os diferentes extratos imunogênicos foram submetidos ao SDS-PAGE, onde apresentaram um perfil eletroforético com 16 bandas protéicas, sem diferença significativa no perfil entre os extratos. O comportamento da cinética de produção de anticorpos policlonais, em coelhos imunizados com esses extratos, mostrou que o extrato solúvel obtido a partir de larvas L_3 é o que produz melhor resposta, com produção do maior título de anticorpos. Os extratos obtidos de cada estadio larval foram testados contra anticorpos policlonais produzidos em coelhos e em bovinos. O extrato de larvas L_1 não apresentou reação de imunodetecção para os soros de coelho e bovino. A imunodetecção de anticorpos de coelho e bovinos no extrato de larvas L_2 e L_3 revelou algumas frações antigênicas, com intensidade proeminente na banda de 50 kDa, para ambos os soros. A proteína foi submetida à espectrometria de massa e as seqüências obtidas foram submetidas aos bancos de dados para confronto com as seqüências depositadas, não sendo observada nenhuma proteína similar à seqüenciada neste trabalho. A reação de imunohistoquímica evidenciou que a reação antígeno/anticorpo pode ser observada em toda a extensão das larvas L_3 de *D. hominis*, mostrando que os anticorpos produzidos por animais vacinados têm total acesso aos epítopos no tecido larval. A imunização bovinos com a proteína Dh50, induziu a produção de anticorpos e a comparação de nódulos cutâneos encontrados em animais imunizados contra os animais controle, permitiu concluir que a proteína de 50 kDa, extraída do extrato bruto de larvas de *D. hominis,* mostrou ser um antígeno candidato promissor à produção de vacina, conferindo uma eficiência de 90,67% em relação ao grupo controle.

Palavras-chave: Extrato. Imunização. Anticorpos. Policlonais. Imunodetecção. *Dermatobia hominis*.

ABSTRACT

This experiment was aimed at obtaining and characterisation of antigenic proteins derived from extracts the botfly of *Dermatobia hominis*. From each larval stage were produced extracts for the immunization of rabbits and consequent production of polyclonal antibodies. The different immunogenic extracts were subjected to SDS-PAGE, which showed a eletrophoresis with 16 bands protein, without significant difference in the profile between the extracts. The behaviour of kinetic production of polyclonal antibodies in rabbits immunized with these extracts, showed that the soluble extract obtained from larvae L_3 is what produces better response, with an increased production of antibodies. The extracts obtained from each larval stage were tested against polyclonal antibodies produced in rabbits and cattle. Extract of L_1 The larvae of imunodetecção presented no reaction to the sera of rabbit and veal. The imunodetecção of antibodies from rabbits and cattle in the extract of larvae L_2 and L_3 showed some antigenic fractions, with prominent intensity in banda of 50 kDa, for both sera. The protein was subjected to mass spectrometry and the sequences obtained were submitted to the databases for confrontation with the sequences deposited and is not observed any protein similar to seqüenciada this work. The reaction of immunohistochemistry showed that the reaction antigen / antibody can be seen throughout the extent of L_3 larvae of D. hominis, showing that the antibodies produced by vaccinated animals have full access to epítopos in larval tissue. The cattle immunization with the protein Dh50, induced the production of antibodies and comparison of skin nodules found in animals immune to the control animals has shown that the 50 kDa protein, extracted from the crude extract of larvae of D. hominis, proved to be a promising candidate antigen for the production of vaccine, with an efficiency of 90.67% in the control group.

Key words: Extract. Imunization. Polyclonal antibodies, Immune-detection. *Dermatobia hominis*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO I

FIGURA 01- (A) SUBSTRATOS PARA O DESENVOLVIMENTO DAS LARVAS L_3 DE *D. hominis*; (B) DETALHE DO PUPÁRIO, COM ABERTURA DO OPÉRCULO (SETA), APÓS A SAÍDA DO IMAGO..... 32

FIGURA 02- (A) ESPÉCIME DE *Musca domestica* COM OS OVOS DE *D. hominis* DEPOSITADOS SOBRE O ABDÔMEN. (B) ECLOSÃO DAS LARVAS DE PRIMEIRO ESTÁDIO DE *D. hominis*..... 34

FIGURA 03- PERFIL ELETROFORÉTICO, EM GEL REDUTOR, DE POLIACRILAMIDA 12%, DAS PROTEÍNAS PRESENTES NOS EXTRATOS DE LARVAS L_1, L_2, L_3 E L_2 E L_3 COMPARADAS AO PADRÃO DE MASSA MOLECULAR SDS-7, CORADAS PELO COOMASSIE..... 49

FIGURA 04- COMPARAÇÃO DAS ABSORBÂNCIAS OBTIDAS NA REAÇÃO ANTÍGENO-ANTICORPO, ATRAVÉS DO TESTE ELISA, DISTRIBUÍDAS AO LONGO DAS COLHEITAS DE SANGUE, REALIZADAS A CADA 15 DIAS, ENTRE OS GRUPOS DE ANIMAIS IMUNIZADOS COM OS DIFERENTES EXTRATOS DE LARVAS DE *D. hominis*..... 51

CAPÍTULO II

FIGURA 01- CORRIDA ELETROFORÉTICA DO EXTRATO DE LARVAS L_1 DE *D. hominis* EM GEL DE POLIACRILAMIDA 12%, CORADO PELO COOMASSIE E SUA IMUNOELETROTRANSFERÊNCIA PARA MEMBRANA DE NITRO CELULOSE, FRENTE A ANTICORPOS POLICLONAIS CONTRA LARVAS L_1 PRODUZIDOS EM COELHO E DE BOVINO, IDENTIFICADAS POR REAÇÃO DE IMUNOPEROXIDASE, COM O CROMÓGENO DIAMINOETILCARBAZOLE..... 79

FIGURA 02- CORRIDA ELETROFORÉTICA DO EXTRATO DE LARVAS L_2 DE *D. hominis* EM GEL DE POLIACRILAMIDA 12%, CORADO PELO COOMASSIE E SUA IMUNOELETROTRANSFERÊNCIA PARA MEMBRANA DE NITRO CELULOSE, FRENTE A ANTICORPOS POLICLONAIS CONTRA LARVAS L_2 PRODUZIDOS EM COELHO E DE BOVINO, IDENTIFICADAS POR REAÇÃO DE IMUNOPEROXIDASE, COM O CROMÓGENO DIAMINOETILCARBAZOLE..... 80

FIGURA 03- CORRIDA ELETROFORÉTICA DO EXTRATO DE LARVAS L_3 DE *D. hominis* EM GEL DE POLIACRILAMIDA 12%, CORADO PELO COOMASSIE E SUA IMUNOELETROTRANSFERÊNCIA PARA MEMBRANA DE NITRO CELULOSE, FRENTE A ANTICORPOS POLICLONAIS CONTRA LARVAS L_3 PRODUZIDOS EM COELHO E DE BOVINO, IDENTIFICADAS POR REAÇÃO DE IMUNOPEROXIDASE, COM O CROMÓGENO DIAMINOETILCARBAZOLE..... 81

FIGURA 04- CORRIDA ELETROFORÉTICA DO EXTRATO DE LARVAS L_2 E L_3 DE *D. hominis* EM GEL DE POLIACRILAMIDA 12%, CORADO PELO COOMASSIE E SUA IMUNOELETROTRANSFERÊNCIA PARA MEMBRANA DE NITRO CELULOSE, COM ANTICORPOS POLICLONAIS CONTRA LARVAS L_2 E L_3, PRODUZIDOS EM COELHO E DE BOVINO, IDENTIFICADAS POR REAÇÃO DE IMUNOPEROXIDASE, COM O CROMÓGENO DIAMINOETILCARBAZOLE..... 82

FIGURA 05- SDS-PAGE DA IMUNOPRECIPITAÇÃO DO EXTRATO DE LARVAS L_3 DE *D. HOMINIS*, CORADO PELO COOMASSIE, ONDE SÃO OBSERVADAS AS "*LINES*": (A)- SORO HIPERIMUNE E PROT A; (B)- ANTÍGENO E PROT A; (C)- ANTÍGENO, PROT A E SORO IMUNE; (D)- *PELLET* DO CLAREAMENTO; (E)- SOBRENADANTE APÓS CLAREAMENTO..... 83

FIGURA 06- ELETROTRANSFERÊNCIA DO EXTRATO DE LARVAS L_3 DE *D. hominis*, CORADA PELA DIAMINAETILCARBAZOLE, ONDE FORAM USADOS COMO ANTICORPO PRIMÁRIO, O SORO DE COELHO, O ANTICORPO SECUNDÁRIO, SORO DE BOVINO E O IMUNOPRECIPITADO COM SORO DE COELHO. AS "*LINES*" SÃO AS MESMAS DA FIGURA 05..... 84

FIGURA 07- MAPEAMENTO DOS PEPTIDEOS TRIPSINICOS DE PROTEÍNA ANTIGÊNICA DH50, OBTIDA DE EXTRATO DE LARVAS DE *DERMATOBIA HOMINIS*, ATRAVÉS DE ESPECTROMETRIA DE MASSA..... 85

CAPÍTULO III

FIGURA 01- FOTOMICROGRAFIA DE CORTES CORADOS PELO H.E. DE LARVAS DE *D. hominis.* (A) CÉLULAS DA CUTÍCULA DAS LARVAS, CONTROLE NEGATIVO. (B) SETAS INDICANDO A REAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA, CONTRA ANTICORPOS POLICLONAIS DE BOVINOS CONTRA LARVAS L_3, NA PAREDE DAS LARVAS. AUMENTO MICROSCÓPICO DE 100X..... 111

FIGURA 02- FOTOMICROGRAFIA DE CORTES CORADOS PELO H.E. DE LARVAS DE *D. hominis.* (A) CÉLULAS DA CUTÍCULA DAS LARVAS, CONTROLE NEGATIVO. (B) SETAS INDICANDO A REAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA, CONTRA ANTICORPOS POLICLONAIS DE COELHOS, CONTRA LARVAS L_3,NA PAREDE DAS LARVAS. AUMENTO MICROSCÓPICO DE 100X..... 111

FIGURA 03- FOTOMICROGRAFIA DE CORTES CORADOS PELO H.E. DE LARVAS DE *D. hominis.* (A) CONTROLE NEGATIVO. (B) SETAS INDICANDO A REAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA, POR ANTICORPOS POLICLONAIS PRODUZIDOS EM BOVINOS, CONTRA A PROTEÍNA DH50 - AUMENTO MICROSCÓPICO DE 100X. (C) SETAS INDICANDO A REAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA, POR ANTICORPOS PRODUZIDOS EM BOVINOS CONTRA A PROTEÍNA DH50 – AUMENTO DE 400X..... 112

CAPÍTULO IV

FIGURA 01- BOVINOS MESTIÇOS SELECIONADOS PARA A IMUNIZAÇÃO COM PROTEÍNA E EXTRATO ANTIGÊNICO DE LARVAS DE *D. hominis*, NO MUNICÍPIO DE MAIRINQUE-SP..... 130

FIGURA 02- COMPARAÇÃO DAS ABSORBÂNCIAS DA REAÇÃO ANTÍGENO-ANTICORPO, ATRAVÉS DO TESTE ELISA, DISTRIBUÍDAS AO LONGO DAS COLHEITAS QUINZENAIS DE SANGUE DE BOVINOS IMUNIZADOS E GRUPO CONTROLE..... 138

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

TABELA 01- DESENVOLVIMENTO DE PUPAS E ADULTOS DE *D. hominis* (EM %) DE ACORDO COM O MEIO UTILIZADO PARA O SEU DESENVOLVIMENTO..... 45

TABELA 02- PERÍODO DE EMERGÊNCIA DO PUPÁRIO, EM DIAS, DOS MACHOS DE *D. hominis*, QUE ECLODIRAM, NOS DIFERENTES MEIOS PARA O SEU DESENVOLVIMENTO..... 46

TABELA 03- NÚMERO DE ADULTOS FÊMEAS DE *D. hominis* EMERGIDAS DO PUPÁRIO, NOS DIFERENTES MEIOS PARA O SEU DESENVOLVIMENTO..... 46

TABELA 04- PERÍODO DE VIDA MÉDIO, EM DIAS, DOS MACHOS DE *D. hominis*, DE ACORDO COM OS DIFERENTES MEIOS PARA O SEU DESENVOLVIMENTO..... 47

TABELA 05- PERÍODO DE VIDA MÉDIO, EM DIAS, DE FÊMEAS DE *D. hominis*, DE ACORDO COM OS DIFERENTES MEIOS PARA O SEU DESENVOLVIMENTO..... 47

TABELA 06- COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO DE PEARSON PARA AS BANDAS PROTÉICAS REVELADAS PELA ELETROFORESE DOS DIFERENTES EXTRATOS DE LARVAS DE *D. hominis*..... 50

CAPÍTULO II

TABELA 01- SEQÜÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS OBTIDOS PELA FRAGMENTAÇÃO DOS ÍONS PEPTÍDEOS DO EXTRATO DE LARVAS DE TERCEIRO ESTÁDIO DE *D. hominis*, GERADOS POR CID-MS/MS..... 86

CAPÍTULO III

TABELA 01- CARACTERÍSTICAS DOS FIXADORES UTILIZADOS PARA O PREPARO DAS LÂMINAS DO CORTE HISTOLÓGICO DAS LARVAS DE *D. hominis*..... 110

CAPÍTULO IV

TABELA 01- ABSORBÂNCIA DOS SOROS BOVINOS FRENTE AO ANTÍGENO DE *Dermatobia hominis* NO TESTE ELISA, OBTIDAS PARA A SELEÇÃO DOS BOVINOS A SEREM IMUNIZADOS..... 133

TABELA 02- ABSORBÂNCIA DO TESTE ELISA, APRESENTADA PELOS ANIMAIS SELECIONADOS PARA O GRUPO A, EM COLETAS SEMANAIS, NO PERÍODO DE 25 DE JUNHO A 15 DE JULHO DE 2007..... 134

TABELA 03- ABSORBÂNCIA DOS SOROS DO TESTE ELISA, APRESENTADA PELOS ANIMAIS SELECIONADOS PARA O GRUPO B, EM COLETAS SEMANAIS, NO PERÍODO DE 25 DE JUNHO A 15 DE JULHO DE 2007..... 134

TABELA 04- ABSORBÂNCIA DO TESTE ELISA, APRESENTADA PELOS ANIMAIS SELECIONADOS PARA O GRUPO C, EM COLETAS SEMANAIS, NO PERÍODO DE 25 DE JUNHO A 15 DE JULHO DE 2007..... 134

TABELA 05- ABSORBÂNCIA OBTIDA PELA TÉCNICA DE ENZIMOIMUNOENSAIO – ELISA E NÚMERO DE NÓDULOS DE LARVAS DE *Dermatobia hominis* OBSERVADOS EM BOVINOS, EM COLHEITAS, QUINZENAIS, NO PERÍODO DE 15 DE SETEMBRO A 16 DE DEZEMBRO DE 2007..... 136

TABELA 06- NÚMERO DE NÓDULOS CUTÂNEOS DE *D. hominis* ENCONTRADOS NOS ANIMAIS DE CADA GRUPO EXPERIMENTAL, DE ACORDO O DIA DE COLETA..... 138

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO..... 20

REFERÊNCIAS..... 24

CAPÍTULO I- PRODUÇÃO DE ANTÍGENOS COM OS DIFERENTES ÍNSTARES DE *Dermatobia hominis* (Linnaeus Jr., 1781) CRIADOS EM LABORATÓRIO E OBTENÇÃO DE ANTICORPO POLICLONAL EM COELHOS E BOVINOS..... 26

Resumo..... 27

Abstract..... 28

1. INTRODUÇÃO..... 29

2. MATERIAL E MÉTODOS..... 32

2.1. MANUTENÇÃO DO CICLO DE *Dermatobia hominis* EM LABORATÓRIO..... 32

2.1.1. Evolução de Larva a Adulto..... 32

2.1.2. Obtenção e Avaliação dos Adultos no Ciclo de *D. hominis* em Laboratório..... 33

2.2. PREPARAÇÃO DO EXTRATO ANTIGÊNICO DE LARVAS DE *Dermatobia hominis.*..... 35

2.2.1. Componentes Biológicos para Produção dos Diferentes Antígenos..... 35

2.2.1.1. Obtenção das larvas L_1, L_2 e L_3 de *D. hominis* em bovinos..... 35

2.2.1.2. Preparo do extrato solúvel com as larvas de *D. hominis.*..... 35

2.3. CARACTERIZAÇÃO PROTÉICA DO EXTRATO ANTIGÊNICO..... 36

2.3.1. Determinação do Teor Protéico no Extrato de Larvas..... 36

2.3.2. Perfil Eletroforético do Extrato de Larvas de *D. hominis* por SDS-PAGE..... 37

2.3.2.1 Preparação do conjunto de placas para moldar o gel..... 37

2.3.2.2. Confecção dos géis de poliacrilamida..... 37

2.3.2.3. Preparo e aplicação do gel de separação (ou de corrida)..... 38

2.3.2.4. Preparação e aplicação do gel de empilhamento..... 38

2.3.2.5. Preparação das amostras dos diferentes extratos de larvas..... 38

2.3.2.6. Preparo do padrão de peso moleular..... 38

2.3.2.7. Aplicação das amostras e do padrão no gel SDS-PAGE..... 39

2.3.2.8.	Eletroforese.....	39
2.3.2.9.	Revelação do gel.....	39
2.3.2.10	Cálculo da massa molecular das bandas protéicas separadas em SDS-PAGE.....	39
2.4.	MANEJO E SELEÇÃO DOS ANIMAIS PARA IMUNIZAÇÃO.....	40
2.5.	IMUNIZAÇÃO DOS ANIMAIS.....	40
2.6.	CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE ANTICORPOS EM COELHOS IMUNIZADOS COM OS DIFERENTES EXTRATOS DE LARVAS *Dermatobia hominis.*.....	41
2.6.1.	Adsorção da Placa com Antígeno.....	41
2.6.2.	Primeira Lavagem.....	42
2.6.3.	Bloqueio da Placa.....	42
2.6.4.	Segunda Lavagem.....	42
2.6.5.	Diluições dos Soros.....	42
2.6.6.	Terceira Lavagem.....	43
2.6.7.	Diluição do Conjugado.....	43
2.6.8.	Quarta Lavagem.....	43
2.6.9.	Substrato.....	43
2.6.10.	Parada da Reação.....	44
2.6.11.	Leitura das Absorbâncias do Teste ELISA.....	44
2.7.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	44
3.	**RESULTADOS**.....	45
3.1.	OBTENÇÃO DOS DIFERENTES INSTARES LARVAIS DE *Dermatobia hominis* EM CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO.....	45
3.2.	PRODUÇÃO DO EXTRATO ANTIGÊNICO DE LARVAS DE *Dermatobia hominis*.....	48
3.2.1.	Concentração Protéica do Extrato de Larvas de *Dermatobia hominis*.....	48
3.2.2.	Perfil Eletroforético dos Peptídeos a Partir dos Extratos de Larvas.....	48
3.3.	AVALIAÇÃO DOS ANTÍGENOS PRODUZIDOS USANDO O MÉTODO ENZIMOIMUNOENSAIO.....	50
3.4.	CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE ANTICORPOS EM COELHOS IMUNIZADOS COM OS DIFERENTES EXTRATOS PRODUZIDOS COM LARVAS DE *Dermatobia hominis*.....	51
4.	**DISCUSSÃO**.....	53

5. CONCLUSÕES..... 58

6. REFERÊNCIAS..... 59

CAPÍTULO II- CARACTERIZAÇÃO DE PROTEÍNA ANTIGÊNICA DE EXTRATO DE LARVAS DE *Dermatobia hominis* (Linnaeus Jr., 1781)..... 64

Resumo..... 65

Abstract..... 66

1. INTRODUÇÃO..... 67

2. MATERIAL E MÉTODOS..... 71

2.1. OBTENÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS EM COELHOS E BOVINOS..... 71

2.2. ELETROTRANSFERÊNCIA (*Western blotting*) E IMUNODETECÇÃO DAS FRAÇÕES PROTÉICAS OBTIDAS..... 71

2.2.1. Montagem da Cuba para a Transferência (*blotting*)..... 72

2.2.2. Transferência (*blotting*)..... 72

2.2.3. Coloração do Gel de Poliacrilamida..... 72

2.2.4. Preparação da Membrana de Nitrocelulose..... 73

2.2.5. Lavagem..... 73

2.2.6. Bloqueio..... 73

2.2.7. Segunda Lavagem..... 73

2.2.8. Incubação com Soros Hiperimunes..... 73

2.2.9. Terceira Lavagem..... 74

2.2.10. Incubação do Conjugado..... 74

2.2.11. Quarta Lavagem..... 75

2.2.12. Substrato e Cromógeno..... 75

2.3. SEPARAÇÃO DA FRAÇÃO PROTÉICA OBTIDA NA IMUNODETECÇÃO..... 75

2.3.1. Imunoprecipitação..... 75

2.3.1.1. Preparação das amostras..... 75

2.3.1.2. Clareamento..... 76

2.3.1.3. Imunoprecipitação..... 76

2.3.1.4. Eluição..... 76

2.4. SEQUENCIAMENTO DE AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA..... 77

2.4.1. Digestão Tripsínica *in situ* de Proteínas Separadas por SDS-PAGE..... 77

2.4.2. Espectrometria de Massa..... 78

3. RESULTADOS..... 79

3.1. IMUNOELETROTRANSFERÊNCIA DAS PROTEÍNAS ANTIGÊNICAS IDENTIFICADAS NOS DIFERENTES EXTRATOS DE LARVAS..... 79

3.2. PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA ANTIGÊNICA POR IMUNOPRECIPITAÇÃO..... 82

3.3. ESPECTROMETRIA DE MASSA DA PROTEÍNA Dh50..... 84

4. DISCUSSÃO..... 87

5. CONCLUSÕES..... 92

6. REFERÊNCIAS..... 93

CAPÍTULO III- IMUNOHISTOQUÍMICA EM LARVAS DE TERCEIRO ESTADIO DE *Dermatobia hominis* (Linnaeus Jr., 1781).. 98

Resumo..... 99

Abstract..... 100

1. INTRODUÇÃO..... 101

2. MATERIAL E MÉTODOS..... 105

2.1 FIXAÇÃO DAS LARVAS DE *D. hominis* PARA OBTENÇÃO DOS CORTES HISTOLÓGICOS..... 105

2.2. PREPARO DO MATERIAL PARA INCLUSÃO EM PARAFINA..... 105

2.2.1. Desidratação da Amostra..... 105

2.2.2. Diafanização..... 106

2.3. PREPARO DAS LÂMINAS COM OS CORTES HITOLÓGICOS.... 106

2.3.1. Silanização de Lâminas..... 106

2.4. IMUNOHISTOQUÍMICA..... 106

2.4.1 Preparo de Lâminas..... 106

2.4.2. Bloqueio da Peroxidase Endógena..... 107

2.4.3. Bloqueio de Ligações Inespecíficas..... 107

2.4.4. Diluição dos Anticorpos Policlonais Produzidos em Coelhos e Bovinos..... 107

2.4.5. Aplicação do *Kit* Avidina-Biotina-Peroxidase..... 108

2.4.6. Revelação da Reação Imunohistoquímica..... 108
3. RESULTADOS..... 110
4. DISCUSSÃO..... 113
5. CONCLUSÕES..... 115
6. REFERÊNCIAS..... 116
CAPÍTULO IV- IMUNIZAÇÃO DE BOVINOS COM PROTEÍNA ANTIGÊNICA PURIFICADA DE *Dermatobia hominis* – Dh50 kDa..... 120
Resumo..... 121
Abstract..... 122
1. INTRODUÇÃO..... 123
2. MATERIAL E MÉTODOS..... 127
2.1. OBTENÇÃO DA PROTEÍNA ANTIGÊNICA..... 127
2.1.1. Separação da Fração Antigênica do Extrato Bruto de Larvas..... 127
2.1.2. Preparação do Antígeno para Imunização..... 128
2.2. SELEÇÃO E MANEJO DOS ANIMAIS..... 128
2.2.1. Imunização dos Animais..... 129
2.3. TESTE ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)... 130
2.4. NUMERO DE NODULOS CUTÂNEOS..... 131
2.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA..... 131
3. RESULTADOS..... 133
4. DISCUSSÃO..... 139
5. CONCLUSÕES..... 147
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS..... 148
7. REFERÊNCIAS..... 151
ANEXOS..... 158

1. INTRODUÇÃO

Atualmente o Brasil possui o segundo maior rebanho bovino mundial, com 205,9 milhões de cabeças, das quais são abatidas anualmente 45 milhões, produzindo 9,2 milhões de toneladas de carne. Destas, 2,4 milhões são exportadas, representando faturamento de US$ 3,9 bilhões mantendo a condição de maior exportador mundial de carne bovina (IBEGE, 2007).

O aumento das exportações demonstra notável melhora nos índices de produtividade, ao redor de 28%, no que se refere à qualidade de carne, uma vez que a quantidade de animais abatidos em 2006 foi menor que a dos últimos anos. Todavia, a mesma evolução não pode ser constatada quanto ao melhoramento na produtividade e beneficiamento do couro. Apesar do desenvolvimento e melhoria na qualidade, o País ainda apresenta produtividade considerada muito aquém de suas potencialidades. Contribuem para este quadro, questões de ordem técnica, política, econômica e social, além dos aspectos sanitários do rebanho, dentre os quais merecem destaque as ectoparasitoses.

O impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil é estimado em 2,65 bilhões de dólares. Somente o carrapato *Boophilus microplus* causa prejuízos estimados em dois bilhões sendo que as larvas de *Dermatobia hominis*, e as miíases devido a *Cochliomya hominivorax*, a mosca dos chifres, (*Haematobia irritans*) e mosca dos estábulos, *Stomoxys calcitrans*, somam 650 milhões de dólares (GRISI *et al*., 2002). Como conseqüências das infestações por estes parasitos pode-se observar ainda um aumento no coeficiente de mortalidade, principalmente em bezerros, bem como os efeitos negativos na produção animal, como o decréscimo na produção de leite, carne e do ganho de peso. Ocorre ainda um aumento considerável dos custos de produção, pela necessidade de aplicação de inseticidas e acaricidas, e diminuição das taxas de conversão alimentar e dos índices de fertilidade. As possíveis perdas com a diminuição da produção de leite e de carne provocadas pela dermatobiose, associadas ao custo de medicamentos bernicidas, podem alcançar US$ 250 milhões por ano, uma vez que parte considerável da população bovina está em áreas sujeitas à infestação (BAYARDO *et al.*, 2003).

Os principais problemas econômicos decorrentes destas ectoparasitoses estão ligados diretamente à ação espoliativa sobre o hospedeiro, ou indiretamente,

pela transmissão de outros patógenos, tais como: vírus, rickettsias, bactérias e protozoários (GRISI *et al*., 2002).

As larvas da *Dermatobia hominis* (Linnaeus Jr., 1781) provocam lesões ulcerativas, danificando o tecido subcutâneo e conseqüentemente a pele do hospedeiro. O couro é o subproduto que sofre maior depreciação, o que muitas vezes, impossibilita seu aproveitamento, resultando na desvalorização comercial e inadequação à industrialização. Couros que apresentem 10 a 20 perfurações, na região crânio/dorsal, do corpo do animal perdem 30 a 40% de seu valor comercial (BAYARDO *et al.*, 2003).

Dados já da década de 80 vêm apontando as perdas no Brasil devido a baixa qualidade, pois somente 15% dos 12 milhões de couros produzidos anualmente podem ser classificados como de primeira categoria, e dos 85% restantes, 40% são de segunda, 30% de terceira e 15% são refugos (MATHEUS, 1979; HORN e ARTECHE, 1985). O país deixa de ganhar anualmente cerca de US$ 2.000.000,00 de dólares por não investir na qualidade do couro. Apenas 8,6% do couro produzido, no Brasil, é considerado de alta qualidade, contra 85% da produção dos EUA com qualificação semelhante. Só no Mato Grosso do Sul são abatidos cerca de 30 mil animais por dia, mas apenas oito mil peles são aproveitadas para industrialização (BAYARDO *et al.*, 2003).

Sessenta por cento dos defeitos no couro ocorrem na propriedade rural. Destes, 10% devido à marcação errada do gado, e o restante pôr manejo inadequado, principalmente pela falta de controle das ectoparasitoses. O local mais adequado para a marcação do gado é logo abaixo da articulação fêmuro tíbio patelar, mas também, podem ser marcados na articulação úmero radio ulnar, ou na fronte. Muitos produtores marcam o gado em áreas nobres, prejudicando o aproveitamento das peles. Os outros 40% de defeitos no couro acontecem no transporte do animal (com pregos e parafusos expostos) e por salga e esfola mal feitas. Setenta por certo dos couros acabados são direcionados para a produção de calçados, roupas e artigos "de luxo" (GOMES *et al.,* 2002).

A proteína do couro ainda poderia ser melhor utilizada na alimentação (gelatina, sorvete, bolos, embutidos entre outros) e na indústria farmacêutica (cápsula de remédios, filmes de raios-X). A gelatina tem se tornado um subproduto de bastante interesse com uma produção mundial de aproximadamente 300 mil toneladas/ano. O Brasil produziu, em 2005, o total de 35 mil toneladas, destacando-

se como líder mundial em produtividade, gerando um rendimento de aproximadamente U$ 3 bilhões (CNA, 2005). Este mercado segue a tendência de todos os modernos processos industriais, requerendo sistemas de gestão de qualidade como ISO 9000 (International Organization for Standardization), HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Point) e GMP (Good Manufacturing Practice), ou seja, será necessária a produção da matéria prima sem os resíduos químicos deixados pelos tratamentos a que os animais são constantemente submetidos.

O controle eficiente do berne resulta na redução do número de aplicações de drogas bernicidas sobre os animais, diminuindo o risco no consumo de carne ou leite contaminados por resíduos de drogas. As vantagens no controle da dermatobiose seriam imediatas no avanço da pecuária.

Os ectoparasitos exercem várias ações sobre seus hospedeiros, como ações mecânicas, espoliadoras e tóxicas. Estas, muitas vezes se associam, tornando muito complexa a patogenia destas parasitoses. Uma ação irritativa e inflamatória é encontrada na quase totalidade das parasitoses (PESSOA, 1988). Diante desta característica, a resposta imune estimulada por ectoparasitos e outros artrópodes tem recebido atenção crescente. Diversos trabalhos (LELLO *et al*., 1990; MOTA *et al*., 1980; PERAÇOLI *et al*., 1980; BARBOSA *et al*. 2000; PINTO *et al.*, 2003 e FERNANDES *et al*., 2007) relataram a intensa reação inflamatória e a resposta imune celular e humoral do hospedeiro frente ao parasitismo por larvas de *D. hominis.*

O estudo da formação de anticorpos circulantes em animais imunizados com extratos, obtidos a partir de larvas de *D. hominis*, mostrou que a presença de larvas é capaz de provocar reação anamnésica (PINTO *et al*., 2003; FERNANDES *et al*., 2007). A comprovação desta resposta imunológica abre caminhos para a pesquisa de nova metodologia no controle da dermatobiose. O que contribuiria ainda mais para a pecuária, diminuindo seus custos de produção e minimizando as agressões ao meio ambiente e aos produtos de origem animal.

Com o objetivo de desenvolver novas estratégias de controle da infestação por *D. hominis*, foram desenvolvidos experimentos visando: produzir antígenos com os diferentes instares da *D. hominis*; isolar e caracterizar proteínas antigênicas obtidas a partir de extrato de larvas de *D. hominis;* fazer imunohistoquímica com larvas de *D. hominis* para verificar onde estão situadas a proteínas antigênicas e

enfim imunizar bovinos com proteína antigênica obtida a partir do extrato de larvas de *D. hominis* e verificar a eficiência da resposta imunológica.

O presente trabalho foi desenvolvido conforme os propósitos estabelecidos e está sendo apresentado na forma de capítulos:

- CAPÍTULO I: Produção de antígenos com os diferentes instares da *Dermatobia hominis* criados em laboratório e obtenção de anticorpo policlonal em coelhos e bovinos.

- CAPÍTULO II: Caracterização de proteína antigênica de extrato de larvas de *Dermatobia hominis*.

- CAPÍTULO III: Estudo Imunohistoquímico em larvas L_3 de *Dermatobia hominis*.

- CAPÍTULO IV: Imunização de bovinos com proteína imunogênica purificada, obtida de larvas de *Dermatobia hominis*.

2. REFERÊNCIAS

BAYARDO, F.M.H; SPROESSER, R. Couro Bovino. **Boletim Técnico UFMS**. Campo Grande, n. 3, 190 p, 2003.

BARBOSA, C.G.; SANAVRIA, A; FREIRE, R. B. Humoral immune response in cattle experimentally infested with larvae of *Dermatobia hominis.* **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 3, p. 449-453, 2000.

CNA – Confederação Nacional de Agricultura. **Gelatina é mercado promissor para o couro**. Disponível em: http://www.beefpoint.com.br/ Acesso em 24 janeiro 2008.

FERNANDES, N. L. M.; THOMAZ-SOCCOL, V.; PINTO, S. B.; MINOZZO, J. C.; OLIVEIRA, C. A. L. Resposta imune-humoral e celular em bovinos da raça Nelore imunizados com extrato de larvas (L2 e L3) de *Dermatobia hominis* (Linnaeus Jr., 1781). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 3, p. 789-795, 2007.

GOMES, P. R.; KOLLER, W. W.; GOMES, A.; CARVALHO, C. J. B.; ZORZATTO, J.R. Dípteros fanídeos vetores de ovos de *D. hominis* em Campo Grande-MS. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 3, p. 114-118, 2002.

GRISI, L.; MASSARD, C. L.; BORJA, M.G.E.; PEREIRA, J.B. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre, n. 125, p. 8-10, 2002.

HORN, S. C.; ARTECHE, C.C.P. Situação parasitária da pecuária no Brasil. **A Hora Veterinária.** Porto Alegre, v. 4, n. 23, p. 12-32, 1985.

IBEGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Comunicação. **Produção da pecuária municipal**. Comunicação Social, 11 dezembro de 2007.

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

MATHEUS, V.G. Dermatobiose. In: SEMINÁRIO NACIONAL SOBRE PARASITOLOGIA DOS BOVINOS, Campo Grande, 1979, **Anais...**,Campo Grande: EMBRAPA-CNGC, 1979. p. 315-329, 331-333.

MOTA, N.G.S.; PERAÇOLI, M.T.S.; LELLO, E. Anticorpos circulantes em coelhos imunizados com antígenos obtidos de larvas de *Dermatobia hominis* Lin. (Díptera: Cuterebridae). **Ciência e Cultura**. São Paulo**,** v. 32, n. 4, p. 453-457, 1980.

PESSOA, S.B. **Parasitologia Médica.** 12ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988. 872 p.

PERAÇOLI, M.T.S.; LELLO, E.; MOTA, N.G.S. Comportamento da resposta imune-humoral em coelhos imunizados com antígenos de D*ermatobia hominis* Linnaeus, frente às larvas desse parasita (Díptera: Cuterebridae). **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 32, n. 11, p. 1537-1542, 1980.

PINTO, S. B.; THOMAZ-SOCCOL; V.; MINOZZO, J. C.; ZABOTT, M. V.; VENDRUSCOLO, E. G.; ROCHADELLI, R.; FREITAG, A.; GUETNER, C. Resposta imune humoral de coelhos frente a extratos de larvas de *Dermatobia hominis*. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v. 8, n. 2, p. 19 - 25, 2003.

CAPÍTULO I

PRODUÇÃO DE ANTÍGENOS COM OS DIFERENTES INSTARES DE *Dermatobia hominis* CRIADOS EM LABORATÓRIO E OBTENÇÃO DE ANTICORPO POLICLONAL EM COELHOS E BOVINOS

PRODUÇÃO DE ANTÍGENOS COM OS DIFERENTES INSTARES DE *Dermatobia hominis* CRIADOS EM LABORATÓRIO E OBTENÇÃO DE ANTICORPO POLICLONAL EM COELHOS E BOVINOS

Resumo: Visando o desenvolvimento e a manutenção do ciclo de vida da *Dermatobia hominis* em laboratório, este experimento foi realizado com os objetivos de avaliar o tempo de produção dos diferentes instares, a produção de extratos antigênicos a partir de cada instar larval, para imunizações de animais de laboratório (coelhos) e bovinos e conseqüente obtenção de anticorpos policlonais de *D. hominis*. Para obter os diferentes instares foram avaliados diferentes meios de cultura. O meio composto por serragem e areia, foi o mais adequado, por ter apresentado desenvolvimento de 54% das larvas L_3 em pupas e 62% destas em adultos. A vida média dos adultos variou de acordo com o sexo, sendo 5 dias para os machos e 9 dias para as fêmeas. Os machos emergiram após período de incubação médio de 24 dias enquanto que para as fêmeas o período foi de 29 dias. Durante todo o experimento foram produzidos 1530 ovos por apenas 8 fêmeas, com a postura variando de 18 a 327 ovos por fêmea. Os extratos protéicos produzidos com cada instar larval apresentaram concentração distinta, sendo de 5,38; 6,31 e 8,02 mg/mL para as larvas de primeiro, segundo e terceiro instar respectivamente. A avaliação do perfil eletroforético das proteínas obtidas dos extratos solúveis, apresentaram um padrão com 16 bandas e não mostrou diferença significativa de perfil entre os extratos. O comportamento da cinética de produção de anticorpos policlonais, em coelhos imunizados com esses extratos, mostrou que o extrato solúvel obtido a partir de larvas L_3 é o que produz melhor resposta, com produção do maior título de anticorpos. O comportamento da resposta imune observado em bovinos imunizados com extratos de larvas (L_1, L_2 e L_3), foi similar ao observado em coelhos, permitindo assim que os estudos realizados com esses animais possam ser extrapolados a espécie bovina.

Palavras-chave: Criação artificial de *Dermatobia hominis*, extrato, imunização, eletroforese, *Dermatobia hominis*.

PRODUCTION OF ANTIGENS OF DIFFERENT *Dermatobia hominis* INSTARS BREEDING IN LABORATORY AND POLYCLONAL ANTIBODIES IN RABBITS AND BOVINES

Abstract: The aims of the current study were to evaluate how long the botfly *Dermatobia hominis* takes to produce its different instars in laboratory (for breeding), and to produce antigenic extracts from larval stages for immunization of laboratory animals (rabbits) and bovines in order to obtain polyclonal antibodies against *D. hominis*. Considering tested culture media, the medium composed by sawdust and sand was the most appropriate to obtain botfly instars since 54% of L_3 larvaes developed into pupas and 62% of these pupas became adults. Male and female adult flies had different lifespan of five and nine days respectively. Likewise, males emerged after twenty-four days of incubation whereas females emerged after twenty-nine days. During the whole experiment 1530 eggs were deposited by only eight females (posture of 18 – 327 eggs per female). Protein extracts from first, second and third larval stages were, respectively, 5.38, 6.31 and 8.02 mg/mL. Electrophoretic profile of proteins from soluble extracts was of sixteen protein bands without significant difference among the extracts. Kinetics of polyclonal antibodies production in immunized rabbits was indicative that soluble extract obtained from L_3 larvaes produced the best immune response with production of greater title of antibodies. Immune response in L_1, L_2 and L_3 larval extracts immunized bovines was similar to that in rabbits and so, studies performed with these animals can be extrapolated to bovine species.

Key words: *Dermatobia hominis* breeding in laboratory, extract, immunization, electrophoresis.

1. INTRODUÇÃO

Dentre os ectoparasitos de importância médico-veterinária na América Latina está *Dermatobia hominis* (Linnaeus Jr., 1781) (Diptera: Cuterebridae). A larva deste inseto é o agente da miíase furunculóide popularmente conhecida como berne, parasito de humanos, animais domésticos e selvagens, na América tropical e subtropical (RIBEIRO, 1982; FONSECA, 1989; RODRIGUES, 1998; SILVA JUNIOR *et al*., 1998; GOMES *et al*., 1998; GUIMARÃES e PAPAVERO, 1999; BARBOSA *et al*., 2000; PINTO, *et al*., 2002).

No início do século XX, o berne foi considerado como uma das mais importantes parasitoses do gado bovino no Brasil (BARBOSA *et al*., 2000). Atualmente, apesar do controle químico existente, a dermatobiose continua sendo um problema para a pecuária brasileira por seus prejuízos diretos e indiretos. Os prejuízos diretos estão ligados as perdas ocasionadas pela diminuição da produção de leite e carne, pelo baixo ganho de peso e pela dificuldade de aclimatação de raças selecionadas, podendo ocasionar ainda a morte de bezerros quando estiverem intensamente infestados. Os prejuízos indiretos causados pela dermatobiose estão relacionados com a formação de abscessos que abrem porta de entrada para outras miíases e a outros agentes patogênicos, com a conseqüente desvalorização do couro. Os gastos relacionados com a mão-de-obra e medicamentos utilizados para o combate desta ectoparasitose, também devem ser considerados.

A *D. hominis* apresenta duas fases no curso de seu ciclo biológico: uma parasita de mamíferos e outra de vida livre. Na fase de vida livre, machos e fêmeas emergem do pupário em torno do 30º dia, acasalando-se imediatamente. As fêmeas realizam as posturas sobre outros insetos, fenômeno este conhecido como foresia (RODRIGUES, 1998). Aproximadamente 50 espécies de insetos vetores têm sido catalogadas, entre elas mosquitos dos gêneros *Culex, Anopheles,* borrachudos do gênero *Simulium* e moscas dos gêneros *Stomoxys, Neivamyia, Sarcopromusca* e *Fannia* (RIBEIRO, 1982; GUIMARÃES e PAPAVERO, 1999; PINTO *et al*., 2002).

Os ovos depositados sobre outros insetos têm um período de incubação de até sete dias. As larvas podem sobreviver dentro do ovo, por aproximadamente 20 dias (BRITO *et al.*, 2001). A maioria das larvas L_1 penetram no mesmo lugar onde pousou seu vetor, podendo ocorrer em qualquer parte do corpo do animal.

O período larval é em torno de 40 a 50 dias, evoluindo por três estágios larvais (L_1, L_2 e L_3). Quando as larvas completam o desenvolvimento, abandonam seus hospedeiros, caindo no solo, onde penetram e transformam-se em pupa. Como nesta fase as larvas L_3 precisam penetrar no solo, é muito importante que as condições climáticas e o tipo de solo contribuam para tal. Em torno do 30º dia, os adultos emergem do pupário, completando o ciclo.

Dentre os fatores que mais influenciam no desenvolvimento (fases de vida livre) de *D. hominis*, estão a temperatura e a precipitação pluviométrica. Os níveis populacionais variam ao longo do tempo nas regiões subtropicais, conforme a temperatura média (BORJA, 1982; RODRIGUES, 1998; BARBOSA *et al*., 2000; FERNANDES, 2004). Segundo OLIVEIRA (1991), influenciadas pelas condições climáticas, as larvas de *D. hominis* que abandonam o hospedeiro durante a primavera e verão, apresentam um desenvolvimento mais rápido e um índice de emergência de adultos mais elevado, havendo assim uma maior incidência de moscas adultas nesse período. Nos meses mais frios, o estágio pupal é mais longo e o percentual de emergência menor.

Vários autores demonstraram que a sazonalidade e a flutuação populacional variam de acordo com as características de cada região quanto a altitude, longitude, latitude e proximidades a matas fechadas (BELLATO *et al*., 1986; SARTOR 1986; MAGALHÃES e LESSKIU, 1982; RIBEIRO *et al*., 1989, PINTO *et al.*, 2002).

Como o Brasil apresenta uma vasta extensão territorial, com uma grande variedade de latitudes, longitudes e altitudes e, por conseqüência, de vários tipos climáticos, a população de larvas de *D. hominis* nos hospedeiros pode variar de uma região para outra.

Através de um inquérito epidemiológico, abrangendo 82% dos bovinos existentes no Brasil, constatou-se que o berne está presente em 20 Unidades Federativas. Apenas em algumas regiões do Norte e Nordeste não se registrou a ocorrência de *D. hominis* (SANAVRIA *et al*., 2002).

Para minimizar estes efeitos de ambiência, é importante reproduzir o ciclo evolutivo da *D. hominis* em condições de laboratório. As condições ideais de temperatura e umidade estão diretamente relacionadas à permeabilidade e maciez do solo para que as larvas L_3 possam fazer a penetração e o período de pupa. Com o desenvolvimento de todos os estádios em laboratório, desde a postura dos ovos até a formação de um novo imago, tornar-se-á possível a avaliação das condições

para a sobrevivência de cada estádio, o que poderia contribuir no desenvolvimento de novas técnicas para o seu controle. A produção de todas as fases parasitárias *in vitro*, também permitirá a produção de extratos brutos obtidos a partir dos diferentes estádios de larvas, contribuindo para conhecer as frações antigênicas desses extratos, bem como da resposta imune-humoral desenvolvida nos hospedeiros imunizados com estes extratos.

Visando conhecer o desenvolvimento da *Dermatobia hominis* e sua manutenção em laboratório, foi realizado este experimento com os objetivos de avaliar:

a) a criação e manutenção de larvas de *D. hominis* em laboratório, possibilitando assim o estudo de seus diferentes instares;

b) a produção de extratos antigênicos a partir de cada instar larval;

c) a produção de anticorpos policlonais em coelhos;

d) a resposta imune produzida por coelhos imunizados com os diferentes extratos de larvas produzidos;

e) comparar a resposta imune dos coelhos imunizados com a resposta produzida por bovinos imunizados, em outro trabalho.

De posse destes dados será possível estabelecer qual o extrato protéico é mais antigênico, bem como, saber se coelhos podem ser usados como modelo experimental para estudos futuros no desenvolvimento de novas medidas de controle para dermatobiose.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. MANUTENÇÃO DO CICLO DE *Dermatobia hominis* EM LABORATÓRIO

2.1.1. Desenvolvimento de Larva a Adulto

Foram colhidas através de compressão manual, 340 larvas de terceiro estádio *D. hominis,* de animais naturalmente infestados na região de Curitiba. As larvas foram lavadas com solução fisiológica, acondicionadas em frascos esterilizados e então transportadas ao laboratório.

Após a seleção de acordo com o tamanho e sua mobilidade, as larvas foram acondicionadas em potes plásticos de 500 mL contendo diferentes substratos para o seu desenvolvimento (FIGURA 01). Diferentes meios substratos foram adotados a fim de comparar o melhor deles para seu desenvolvimento, sendo assim dispostos:

- grupo A: areia terra e serragem (pó de serra);
- grupo B: areia e serragem;
- grupo C: terra e serragem.

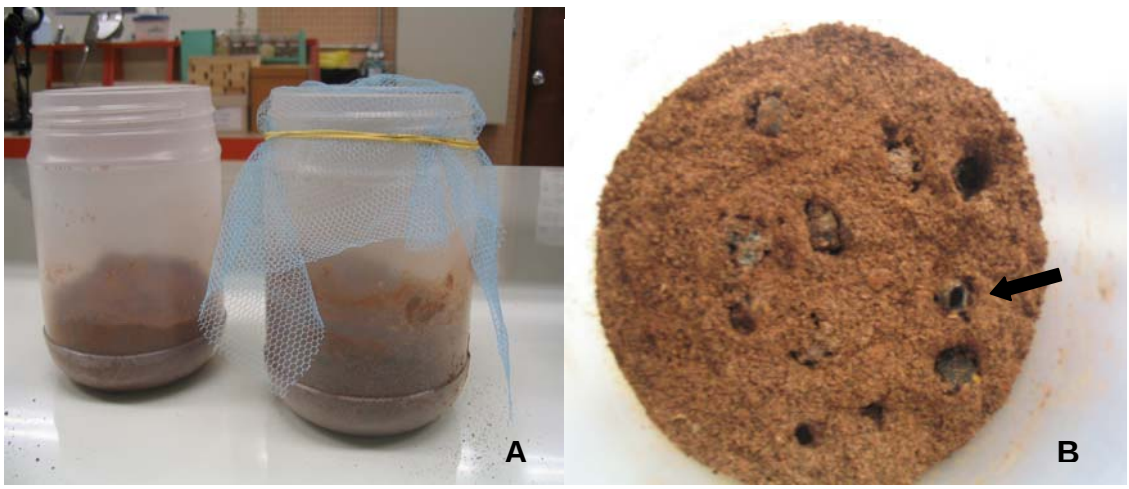


FIGURA 01- (A) Substratos para o desenvolvimento das larvas L_3 de *D. hominis*; (B) Detalhe do pupário, com abertura do opérculo (seta), após a saída do imago.

As larvas L_3 submergiram naturalmente no meio, nos primeiros 30 minutos. As que ultrapassaram este intervalo, e não conseguiram penetrar no meio substrato,

foram removidas. Os potes plásticos foram lacrados com tela para que quando emergissem os adultos ficassem presos no seu interior e então levados à estufa a 27ºC e umidade relativa média de 70%.

Os potes foram mantidos na estufa até o 40º dia, com duas a três observações diárias a partir dos 25 dias. A partir do 40º dia o conteúdo dos potes foi removido para verificar o pupário, contando as pupas que não abriram o opérculo.

Os adultos que emergiram foram separados em casais e acondicionados em gaiolas teladas, para acasalamento. Foram acondicionados oito fêmeas e quatro machos em cada gaiola. Nestas mesmas gaiolas foram colocados os insetos vetores para a realização de posturas. Os insetos foréticos utilizados foram espécimes de *Musca domestica* (FIGURA 02) capturados no momento de sua utilização. A captura dos forontes foi realizada no campo, com auxílio de rede entomológica. Em cada gaiola contendo os casais adultos de *D. hominis* foram adicionados 50 a 60 espécimes de *M. domestica*.

Os casais foram observados diariamente para registrar o período de vida dos adultos, bem como a capacidade de postura. Após a morte dos insetos, estes eram retirados da gaiola. Os forontes foram descartados em razão da manipulação necessária para a retirada dos ovos neles depositados, já os espécimes de *D. hominis* foram montados em alfinetes entomológicos e depositados na coleção didática do laboratório de parasitologia da Universidade Federal do Paraná.

2.1.2. Obtenção e Avaliação dos Adultos no Ciclo de *D. hominis* em Laboratório

Assim que a postura nos forontes era depositada, estes espécimes foram retirados da gaiola. Os foréticos com os ovos foram mantidos em potes plásticos telados, por até sete dias, para que então os ovos da *D. hominis* fossem retirados manualmente (FIGURA 01). Quando as condições de sobrevida dos foréticos estavam comprometidas e estes não chegariam aos sete dias, os ovos da *D. hominis* eram retirados dos foréticos com o auxílio de um pincel e uma pinça de ponta fina.

FIGURA 02- (A) espécime de *Musca domestica* com os ovos de *D. hominis* depositados sobre o abdômen. (B) eclosão de larvas de primeiro estádio de *D. hominis*.

Os ovos de *D. hominis* contendo as larvas de 1º instar foram transferidos para os hospedeiros, coelhos, bovinos e ratos Winstar. Os hospedeiros selecionados foram previamente preparados com tricotomia da região cutânea escolhida para o depósito dos ovos.

Após a contenção mecânica dos animais os ovos de *D. hominis* eram transportados aos hospedeiros com auxílio de um pincel. Uma vez no tecido cutâneo do hospedeiro, fez-se um movimento de expiração sobre as larvas. A descarga de CO_2 exalada foi suficiente para provocar a abertura do opérculo do ovo, permitindo a saída da larva de primeiro estádio e a sua penetração no tecido subcutâneo do hospedeiro.

Os hospedeiros eram observados cada dois a três dias, para verificar a evolução das lesões cutâneas desenvolvidas no local de penetração das larvas. Esta observação ocorreu até o 40º dia, pois a partir deste período as larvas da *D. hominis* já terminaram o desenvolvimento do terceiro estádio e encontravam-se prontas para deixar o tecido cutâneo do hospedeiro, caindo ao solo para completar o seu ciclo de vida.

2.2. PREPARO DO EXTRATO ANTIGÊNICO DE LARVAS DE *Dermatobia hominis.*

A preparação do antígeno a partir de extratos de larvas de *D. hominis* foi realizada segundo o método descrito por MOTA *et al.* (1980), com modificações realizadas por FERNANDES (2004).

2.2.1. Componentes Biológicos para Produção dos Diferentes Antígenos

2.2.1.1. Obtenção das larvas L_1, L_2 e L_3 de *D. hominis* em bovinos

Para o preparo do extrato imunogênico as larvas L_2 e L_3 de *D. hominis* foram obtidas de bovinos naturalmente infestados. Os nódulos presentes no tecido cutâneo dos bovinos foram identificados pela inspeção e palpação, sendo as larvas eliminadas através de compressão manual dos nódulos. As larvas de primeiro instar para o preparo do extrato antigênico, foram obtidas a partir do processo de criação da *D. hominis* em laboratório.

Foram colhidas aproximadamente 200 mg de larvas L_1 e 100 g de larvas L_2 e de L_3 respectivamente. Logo depois de colhidas as larvas foram armazenadas em um frasco contendo solução fisiológica. Após o término da colheita de larvas, procedeu-se então a lavagem das mesmas em solução fisiológica esterilizada. Este procedimento foi repetido por cinco vezes. As larvas foram armazenadas e congeladas a -20ºC, em frasco esterilizado, submersas em solução fisiológica acrescida de solução de gentamicina 40 mg/mL até sua utilização.

2.2.1.2. Preparo do extrato solúvel com as larvas de *D. hominis*

Após o descongelamento a temperatura ambiente, as larvas foram lavadas com solução salina, secas em papel filtro absorvente e pesadas. Para as larvas de segundo e terceiro instar foram pesadas vinte gramas, que foram mergulhadas em frasco contendo 100 mL de solução salina tamponada (NaCl 0,15 M: fosfato de sódio

monobásico 0,01 M: pH 7,2). Para as larvas de primeiro estadio foi utilizada a mesma proporção, pesando-se 200 mg acrescidas de 1,0 mL da mesma solução salina.

Cada extrato antigênico foi então preparado, em separado, de acordo com seu instar larval. As larvas foram trituradas em homogeinizador vitris durante 20 minutos. Este processo foi repetido duas vezes e então filtrado em algodão de nylon, como descrito por FERNANDES (2004).

O filtrado foi submetido ao ultra-som (sonicador de 35 Khz, 2,60 mA – 460/H – Elma®) por um período de 30 segundos, por quatro vezes, com intervalos de 30 segundos, entre cada período de sonicação. O Becker contendo o material foi mantido sempre imerso no gelo.

Após a sonicação, o material obtido, foi distribuído em tubos de centrífuga (previamente resfriados) e submetido à centrifugação (Hermle® Z 513K) a 4°C durante 40 minutos a 6.000 rpm. Em seguida, o sobrenadante foi colocado, por inversão, em novos tubos de centrífuga e o processo de centrifugação repetido. O sedimento obtido a cada centrifugação foi desprezado. O processo foi repetido por mais cinco vezes, a 10.000 rpm e a 4°C. O produto final foi submetido a duas filtrações, sendo a primeira com um microfiltro de 0,80 µm e a segunda com 0,22 µm. Ambas realizadas em capela de fluxo laminar para evitar contaminações. O extrato obtido foi denominado antígeno solúvel e congelado em alíquotas (8,0 mL), em frascos estéreis, até o momento de sua utilização.

2.3. CARACTERIZAÇÃO PROTÉICA DO EXTRATO ANTIGÊNICO

2.3.1. Determinação do Teor Protéico no Extrato de Larvas

Uma alíquota do material obtido, de cada extrato, foi reservada para dosar a concentração de proteína, visando determinar a dose a ser administrada e a concentração de antígeno para os testes de enzimoimunoensaio. A concentração protéica dos extratos foi obtida pelo método de BRADFORD (1976) (ANEXO 01).

A solução usada como padrão para a curva de calibração do espectrofotômetro (Zuzi® 4100) foi a albumina bovina (BSA), na concentração de 1mg/mL. Após a calibração do aparelho, procedeu-se a leitura das absorbâncias das amostras.

2.3.2. Perfil Eletroforético do Extrato de Larvas de *D. hominis* por SDS-PAGE

A eletroforese é uma técnica utilizada para separar os componentes de uma mistura de várias espécies iônicas, através da sua migração num campo elétrico. A carga iônica das biomoléculas depende do pH do meio e deve ser estabilizada por tampões.

A eletroforese foi realizada pela migração de proteínas de diferentes pesos moleculares através de um gel de poliacrilamida na presença de duodecil sulfato de sódio (SDS), como descrito por TOWBIN *et al*. (1979) e adaptado por MINOZZO (2003). As soluções utilizadas, bem como o protocolo, para o desenvolvimento da técnica estão dispostas no ANEXO 02.

2.3.2.1 Preparo do conjunto de placas para moldar o gel

As placas de vidro que compõe o conjunto foram deixadas submersas em solução de álcool-éter, durante alguns minutos, a fim de remover todo o tipo de sujidades e gorduras. Após enxugadas, o conjunto de placas foi montado sobre superfície limpa, colocando entre elas os espaçadores de 1,0 mm de espessura. O conjunto foi preso com grampos e vedado com auxílio de borracha siliconada de 1,0 mm de espessura a fim de evitar possíveis vazamentos. Depois de montado o conjunto de placas foi nivelado e transferido para o local de moldagem.

2.3.2.2. Confecção dos géis de poliacrilamida

Para realizar a eletroforese foram preparados dois géis: o de separação e o de empilhamento, cujas diferenças entre ambos é a concentração maior ou menor de acrilamida e bisacrilamida e o tipo de tampão utilizado nos dois géis. O tampão do gel de separação tem pH 8,8 que confere carga às moléculas de proteína, por outro lado, o tampão do gel de empilhamento tem pH 6,8 e não confere carga às proteínas, portanto serão influenciadas pelo tamanho dos poros do gel.

2.3.2.3. Preparo e aplicação do gel de separação (ou de corrida)

O grau de filtração molecular no gel de poliacrilamida (PAGE) vai depender do tamanho dos poros que por sua vez é determinado pela concentração de acrilamida usada na polimerização do mesmo. Para obtenção do gel de separação a 12% foram utilizados os produtos descritos no ANEXO 03.

O gel de separação foi aplicado entre as placas de vidro do conjunto com o auxílio de micro pipeta. Sobre esse gel foi acrescido, logo em seguida, 600µL de álcool isoamílico, que após a polimerização do gel, foi desprezado.

2.3.2.4. Preparo e aplicação do gel de empilhamento

O resíduo de álcool isoamílico foi retirado da placa com água destilada e enxugada com papel filtro. O gel de empilhamento foi aplicado (ANEXO 04) no conjunto de placas e colocado em seguida o pente para aplicação das amostras no gel ainda líquido. Após a polimerização, o pente foi removido as placas fixadas na cuba de corrida.

2.3.2.5. Preparo das amostras dos diferentes extratos de larvas

As amostras a serem analisadas foram diluídas com cerca de 0,5 a 2 mg/mL em proteína e um volume total de 50 a 100 µL. Usou-se para a diluição a solução salina tamponada (NaCl 0,15 M, NaH_2PO_4 0,01 M: pH 7,2).

As soluções obtidas foram diluídas 1:1 em solução desnaturante e fervidas em banho-maria, durante cinco minutos.

2.3.2.6. Preparo do padrão de peso molecular

As proteínas marcadoras também foram desnaturadas e dissociadas de modo idêntico às amostras. Utilizou-se como padrão de peso molecular de proteínas o SDS-

7 Molecular Weight Marker (Sigma S3401) composto de sete frações protéicas com pesos moleculares variando de 14 a 66 kDa.

2.3.2.7. Aplicação das amostras e do padrão no gel SDS-PAGE

Após a montagem da cuba de eletroforese, esta foi preenchida com o tampão de corrida (ANEXO 2) em ambos os compartimentos. As amostras e o padrão foram aplicados cuidadosamente no fundo de cada poço do gel, obedecendo-se rigorosamente o mesmo volume.

2.3.2.8. Eletroforese

A fonte de tensão foi ligada estabelecendo corrente elétrica entre os pólos negativo e positivo da cuba. A amperagem constante foi estabelecida em 20 mA. O tempo de corrida foi aproximadamente de cinco horas, e determinado pela chegada do corante indicador (azul de bromo fenol) ao final do gel.

2.3.2.9. Revelação do gel

Após a eletroforese as posições das bandas protéicas foram reveladas pela coloração com o Coomassie Azul Brilhante (ANEXO 12).

2.3.2.10. Cálculo da massa molecular das bandas protéicas separadas em SDS-PAGE.

O peso molecular de cada polipeptídio foi determinado pela construção de reta padrão obtida em função do peso molecular e da mobilidade eletroforética das proteínas do padrão.

2.4. MANEJO E SELEÇÃO DOS ANIMAIS PARA IMUNIZAÇÃO

Foram utilizadas oito coelhas fêmeas da raça Nova Zelândia com idade aproximada de cinco meses. Os animais foram submetidos a um período de adaptação de 20 dias, nas gaiolas onde ficaram confinadas durante o período experimental, antes do início das imunizações.

No primeiro dia do experimento todos os animais foram reunidos e aleatoriamente, cada animal foi então identificado através de tatuagem numerada. Foram separados dois animais para receber a imunização com cada extrato larval, assim dispostos:

- animais 1 e 4: imunizados com o extrato de larvas L_1;
- animais 2 e 5: imunizados com o extrato de larvas L_2;
- animais 3 e 6: imunizados com o extrato de larvas L_3;
- animais 7 e 8: imunizados com o extrato de larvas L_2 e L_3.

Todos os procedimentos relacionados ao manejo dos animais e a coleta de material foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Paraná (CEEA/UFPR), processo nº. 23075.02931/2007-09, certificado 251 (ANEXO 05).

2.5. IMUNIZAÇÃO DOS ANIMAIS

Cada um dos animais recebeu a primeira dose de 0,5 mL do extrato solúvel de larvas de *D. hominis*, de acordo com o grupo a que pertencia, acrescida de partes iguais do adjuvante completo de Freund (Sigma Chemical Company).

A dose foi inoculada, na região da escápula esquerda de cada animal. Os animais foram imunizados pela via subcutânea, uma vez que a via através da qual o antígeno é administrado, afeta a magnitude e o tipo da resposta imune obtida. De acordo com JANEWAY e TRAVERS (1997), os antígenos injetados por via subcutânea em geral induzem as respostas mais fortes, enquanto que os antígenos injetados diretamente na corrente sangüínea tendem a induzir tolerância ou insensibilidade.

Após 15 dias, os animais receberam uma segunda imunização, composta do antígeno e do adjuvante incompleto de Freund (Sigma Chemical Company), por via subcutânea, na região escapular direita. A terceira imunização foi repetida 15 dias após a aplicação da segunda dose, sendo idêntica a esta última, mas aplicada na região da escápula esquerda.

2.6. CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE ANTICORPOS EM COELHOS IMUNIZADOS COM OS DIFERENTES EXTRATOS DE LARVAS *D. hominis*

O método de enzimoimunoensaio foi usado no presente trabalho para detectar, no soro de coelhos imunizados com extratos de larvas, anticorpos específicos contra antígenos de larvas de *D. hominis.* A técnica foi padronizada para o presente estudo e seguiu os princípios propostos por PINTO *et al.* (2003). O protocolo adotado para este experimento está descrito no ANEXO 06.

O princípio da técnica é uma reação de cor, que é observada quando a enzima peroxidase, integrante do conjugado, desdobra o substrato.

2.6.1. Adsorção da Placa com Antígeno

Para a adsorção da placa o volume aplicado por “pocinho”, foi baseado na concentração protéica de cada extrato produzido com os diferentes instares de extrato de larvas de *D. hominis*. De posse da concentração protéica do antígeno, foi feita a diluição do mesmo em solução tampão carbonato (0,05M, com pH 9,6). Com auxílio de multipipetador (Jencons Scientific) foi realizada a homogeneização e a distribuição da solução antigênica na placa, com 100 μl da solução de antígeno por “pocinho”, com exceção da primeira coluna (branco). A placa sensibilizada foi deixada em geladeira *over night* (16 horas).

Utilizaram-se placas de poliestireno (Nunc Brand Products), constituídas de 96 “pocinhos” (12 colunas com oito “pocinhos” em cada) com o fundo chato.

2.6.2. Primeira Lavagem

A primeira lavagem teve como finalidade remover o excesso de antígeno que não se fixou na placa. Utilizou-se a solução de lavagem (0,05% Tween-salina), com o auxílio do aparelho para lavagem de placas. A solução ainda restante nos orifícios da placa foi retirada, invertendo-se a placa sobre papel absorvente. A operação de lavagem foi repetida por três vezes.

2.6.3. Bloqueio da Placa

A solução de bloqueio foi usada para bloquear os sítios de ligação não específicos. O bloqueio da placa foi feito utilizando-se 100 μl por "pocinho" de solução de bloqueio (caseína 2%; 0,05% tween 20; diluídas em PBS). Incubou-se a mesma em estufa (J. PROLAB Mod JP 101), a 37^{o}C, por 60 minutos.

2.6.4. Segunda Lavagem

A finalidade desta lavagem foi a de remover proteínas da solução de bloqueio que não se fixaram à placa. Procedeu-se de forma semelhante à primeira lavagem.

2.6.5. Diluições dos Soros

Os soros foram diluídos em tampão de incubação (PBS; 0,25% caseína; 0,05% de tween 20). Em cada "pocinho" foram colocados 100 μl de soro diluído com a finalidade de fazer a ligação do antígeno, fixado na placa, com os anticorpos presentes no soro dos coelhos.

2.6.6. Terceira Lavagem

Esta lavagem destinou-se à remoção de anticorpos que não se ligaram aos antígenos fixados na placa. Procedeu-se de forma semelhante à primeira lavagem, entretanto, este procedimento foi repetido seis vezes.

2.6.7. Diluição do Conjugado

O segundo anticorpo a ser adicionado na placa foi a imunoglobulina anti-IgG de coelho, conjugado com a enzima peroxidase (Sigma Chemical Company). De forma semelhante ao soro, o conjugado foi diluído em tampão de incubação.

2.6.8. Quarta Lavagem

Esta lavagem teve como objetivo remover o excesso de conjugado que não se ligou às moléculas de anticorpos nos “pocinhos” da placa. Procedeu-se de forma semelhante à terceira lavagem.

2.6.9. Substrato

A atividade enzimática foi revelada usando-se como substrato a solução de ortofenilenodiamino (OPD). Os substratos cromógenos sob a ação enzimática dão origem a produtos coloridos, cuja quantificação é feita pela medida da absorbância da solução em espectrofotômetro.

Em cada “pocinho” aplicou-se 100 μl do substrato (OPD) diluído em tampão de substrato (4 mg de OPD + 10,5 mL de tampão citrato pH 5,0 + 4 μl de H_2O_2). Incubou-se a micro placa por 20 minutos, em estufa, a 24ºC.

2.6.10. Parada da Reação

Após 15 minutos de incubação a reação foi interrompida pela adição de 50 μl de H_2SO_4 a 5% em cada “pocinho”.

2.6.11. Leitura das Absorbâncias do Teste ELISA

Procedeu-se a leitura da densidade óptica (D.O.) no leitor de micro placa (BIORAD Model 550) utilizando-se um filtro com comprimento de onda de 492nm. A leitura foi realizada imediatamente após a parada da reação.

2.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise dos dados obtidos quanto ao período de eclosão e viabilidade de larvas de *D. hominis* foi usada a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância, utilizando-se o Software SAEG (Universidade Federal de Viçosa, 2002). A metodologia empregada para a análise dos demais dados foi a de modelos lineares generalizados, apropriadas para variáveis que apresentam distribuições de probabilidade da família exponencial (normal, gamma, Poisson e binomial). Para a análise da absorbância do teste ELISA em função dos tratamentos ao longo do experimento, foi adotada a distribuição gama com função de ligação logarítmica e o modelo matemático semelhante ao anterior, modificando-se apenas a variável número de nódulos pela absorbância do teste ELISA. Foram adotados como ferramentas os programas estatísticos: Sistema para Análises Estatísticas e Genéticas (SAEG, 8.0, 2002) e ASRemL (GILMOUR *et al.* 2002).

3. RESULTADOS

3.1. OBTENÇÃO DOS DIFERENTES INTARES LARVAIS DE *Dermatobia hominis* EM CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO

Os diferentes meios substratos empregados para o desenvolvimento da fase de pupa de *D. hominis* foram considerados satisfatórios e estatisticamente distintos ($p<0,05$). O tratamento B (serragem e areia) foi o meio mais adequado, por ter apresentado o desenvolvimento de 54% das larvas L_3 em pupas e 62% destas em adultos de *D. hominis* (TABELA 01). Quando este meio foi associado a terra (tratamento A) pode-se observar a diminuição da maciez da textura, devido à formação de uma camada de terra endurecida que dificultou a saída do imago do pupário. A taxa de emersão dos tratamentos A e C foram de 14 e 30%, respectivamente.

TABELA 01: EMERGÊNCIA E VIABILIDADE PUPAL DE LARVAS DE *D. hominis* (em %) DE ACORDO COM O MEIO UTILIZADO PARA O SEU DESENVOLVIMENTO.

Tipo de substrato	Pupas formadas (%)	Adultos emergidos (%)
Areia, terra e pó-de-serra (grupo A)	33,87[b]	14,29[c]
Areia e pó-de-serra (grupo B)	54,16[a]	62,24[a]
Terra e pó-de-serra (grupo C)	41,93[b]	30,77[b]

Valores seguidos de letras diferentes, na coluna, diferem significativamente ($p<0,05$) pelo teste de Tukey.

As larvas L_3 transformaram-se em pupas a partir do quarto dia após terem submergido no meio. Todas as larvas que não atingiram este estágio neste período foram removidas dos potes plásticos.

Os machos emergiram após período de incubação médio de 24 dias (TABELA 02), 76% destes machos emergiram entre o 23º e o 24º dia destes, enquanto que para as fêmeas o período foi de 29 dias (TABELA 03). e 79% das fêmeas entre o 29º e o 30º dias.

TABELA 02: PERÍODO DE EMERGÊNCIA DO PUPÁRIO, EM DIAS, DOS MACHOS DE *D. hominis*, NOS DIFERENTES MEIOS PARA O SEU DESENVOLVIMENTO.

Meios	Dias					Total
	23	24	25	26	27	
Areia, terra e pó-de-serra (grupo A)	0	2	1	0	0	3[b]
Areia e pó-de-serra (grupo B)	9	15	5	0	2	31[a]
Terra e pó-de-serra (grupo C)	3	1	1	0	0	5[b]
Total	12	18	7	0	2	39

Valores seguidos de letras diferentes, na coluna, diferem significativamente (p<0,05) pelo teste de Tukey.

TABELA 03: NÚMERO DE ADULTOS FÊMEAS DE *D. hominis* EMERGIDAS DO PUPÁRIO, NOS DIFERENTES MEIOS PARA O SEU DESENVOLVIMENTO.

Meios	Dias					Total
	28	29	30	31	32	
Areia, terra e pó-de-serra (grupo A)	0	0	0	0	0	0[b]
Areia e pó-de-serra (grupo B)	4	18	16	2	1	41[a]
Terra e pó-de-serra (grupo C)	2	1	0	0	0	3[b]
Total	6	19	16	2	1	44

Valores seguidos de letras diferentes, na coluna, diferem significativamente (p<0,05) pelo teste de Tukey.

Dos meios comparados, neste experimento, o tratamento B foi o que mostrou melhor desempenho, com a emergência de 31 machos (79,48%) e 41 fêmeas (93,18%), enquanto os demais tratamentos juntos foram responsáveis pela emergência de menos de 20% de machos e apenas 6% de fêmeas.

A vida média dos adultos também variou de acordo com o sexo, sendo que 49% dos machos apresentaram uma vida média de cinco dias, e 74% destes, se desenvolveram no tratamento B (TABELA 04). Já 70% das fêmeas apresentaram uma vida média entre 8 e 9 dias, e 93% se desenvolveram no tratamento B (TABELA 05).

TABELA 04: PERÍODO DE VIDA MÉDIO, EM DIAS, DOS MACHOS DE *D. hominis*, DE ACORDO COM OS DIFERENTES MEIOS PARA O SEU DESENVOLVIMENTO.

Meios	**Período de vida médio** (dias)					**Total**
	3	**4**	**5**	**6**	**7**	
Areia, terra e pó-de-serra (grupo A)	0	0	2	0	1	3[b]
Areia e pó-de-serra (grupo B)	2	5	14	10	0	31[a]
Terra e pó-de-serra (grupo C)	0	1	3	1	0	5[b]
Total	2	6	19	11	1	39

Valores seguidos de letras diferentes, na coluna, diferem significativamente (p<0,05) pelo teste de Tukey.

TABELA 05: PERÍODO DE VIDA MÉDIO, EM DIAS, DE FÊMEAS DE *D. hominis*, DE ACORDO COM OS DIFERENTES MEIOS PARA O SEU DESENVOLVIMENTO.

Meios	**Período de vida médio** (dias)							**Total**
	6	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**	
Areia, terra e pó-de-serra (grupo A)	0	0	0	0	0	0	0	0[b]
Areia e pó-de-serra (grupo B)	2	6	12	16	3	1	1	41[a]
Terra e pó-de-serra (grupo C)	0	0	2	1	0	0	0	3[b]
Total	2	6	14	17	3	1	1	44

Valores seguidos de letras diferentes, na coluna, diferem significativamente (p<0,05) pelo teste de Tukey.

Durante todo o experimento as fêmeas produziram 1530 ovos por apenas oito fêmeas, com a postura variando de 18 a 327 ovos por fêmea. A oviposição ocorreu do segundo ao quinto dia, onde pode ser observado que as posturas de 80% dos ovos ocorreram até o terceiro dia de vida.

3.2. PRODUÇÃO DO EXTRATO ANTIGÊNICO DE LARVAS DE *Dermatobia hominis*

3.2.1. Concentração Protéica do Extrato de Larvas de *Dermatobia hominis*

A concentração protéica do extrato antigênico preparado com larvas de primeiro, segundo e terceiro instar de *Dermatobia hominis*, foi de 5,38; 6,31 e 8,02 mg/mL respectivamente. O extrato produzido com uma mistura de larvas L_2 e L_3, em iguais proporções, apresentou uma concentração protéica de 7,42 mg/mL.

Para a imunização dos animais a dose aplicada foi de 0,5 mL acrescida do adjuvante de Freund, a mesma adotada em pesquisas realizadas por diversos autores (MOTA *et al*., 1980; PERAÇOLI *et al*., 1980; LELLO e BOULARD, 1990; LELLO e PERAÇOLI, 1993; LELLO *et al*., 1999 e PINTO *et al*., 2003). A função dos adjuvantes, completo e incompleto de Freund, é a de concentrar os antígenos nos locais onde os linfócitos possam encontrá-los para favorecer a indução de citocinas que regulam a função linfocitária (PINTO *et al*., 2002).

3.2.2. Perfil Eletroforético dos Peptídeos a Partir dos Extratos de Larvas

Graças à eletroforese dos extratos antigênicos preparados com as larvas dos distintos instares de *D. hominis* foi possível verificar um perfil de proteínas bastante semelhante, independente do estádio larval a qual pertenciam. Muito embora no extrato de larvas L_2, as frações protéicas identificadas se apresentaram em menor intensidade. As amostras dos extratos solúveis foram submetidas as mesmas condições de corrida eletroforética, com concentração de 1,5 µg/µL e um volume de 30 µL/*line* (FIGURA 03).

A análise das bandas produzidas (TABELA 06) foi feita através do “software” Gel Pro Analyzer e as massas moleculares (kDa), das frações protéicas, determinadas pela eletroforese, para cada extrato solúvel foram:

- Extrato L_1: 87; 80; 72; 70; 64; 54; 50; 47; 44; 40; 28; 26; 24; 22; 17 e 15 kDa.
- Extrato L_2: 87; 83; 80; 72; 50; 39; 35; 26; 24 e 15 kDa.
- Extrato L_3: 87; 83; 72; 70; 64; 52; 50; 49; 47; 44; 39; 26; 24; 22; 18 e 15 kDa.
- Extrato L_2 e L_3: 95; 90; 87; 72; 70; 64; 52; 50; 47; 44; 39; 26; 24; 22 e 15 kDa.

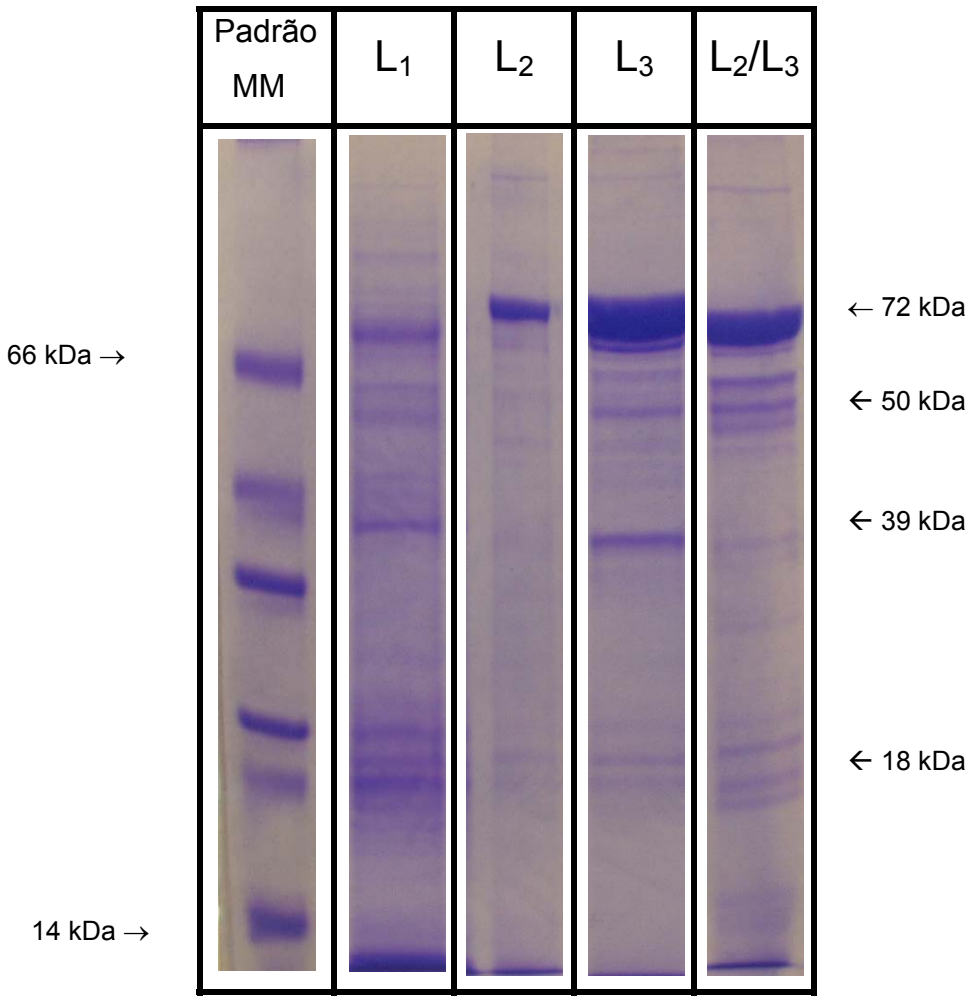


FIGURA 03: Perfil eletroforético, em gel redutor, de poliacrilamida 12%, das proteínas presentes nos extratos de larvas L_1, L_2, L_3 e L_2 e L_3 comparadas ao padrão de massa molecular SDS-7, coradas pelo Coomassie.

As proteínas dos extratos solúveis apresentaram um padrão com 16 bandas similares entre si de acordo com os coeficientes de Pearson (TABELA 06) no padrão eletroforético entre os extratos. Apesar do extrato produzido com larvas L_2, apresentar bandas coradas com menor intensidade foram identificadas apenas 10 bandas.

TABELA 06: COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO DE PEARSON PARA AS BANDAS PROTÉICAS REVELADAS PELA ELETROFORESE DOS DIFERENTES EXTRATOS DE LARVAS DE *D. hominis*

Antígenos	L_1	L_2	L_3	L_2 e L_3
L_1	1,00*	0,98*	0,99*	0,99*
L_2		1,00*	0,97*	0,97*
L_3			1,00*	0,99*
L_2 e L_3				1,00*

*P<0,01

3.3. AVALIAÇÃO DOS ANTÍGENOS PRODUZIDOS USANDO O MÉTODO ENZIMOIMUNOENSAIO.

Para a melhor diferenciação da reação entre soros positivo e negativo foi usado um *pool* de soros positivos (soros controles positivos), formado por 100 µL de cada amostra de soro colhida no 45º dia do experimento (3ª. Imunização). A escolha de usar os soros do 45° dia pós imunização foi em função de nossos resultados obtidos anteriormente (FERNANDES *et al*., 2007). Para controle negativo foi utilizado um *pool* de soros de oito animais, colhidos no 1º dia do experimento (dia zero) uma vez que estes animais nunca haviam tido contato prévio com a *Dermatobia hominis*.

Os soros foram diluídos em tampão de incubação, nas proporções de 1:600. Na primeira coluna da placa, não foi colocada amostra do soro, antígeno ou conjugado, sendo a mesma utilizada para fazer o branco do aparelho. Na última coluna da placa foram colocados controles negativos e os controles positivos. As amostras de soro foram analisadas em duplicata. A diluição usada para o conjugado foi de 1:5000.

Para determinar o ponto de corte do teste ELISA, entre os soros reagentes e não reagentes, utilizou-se a absorbância dos soros de animais que foram utilizados como controle negativo para padronização dos testes. A absorbância dessas amostras variou de 0,008 a 0,038, conforme o extrato utilizado, e foi usada para estabelecer o *cut-off* de 0,033; 0,051; 0,023; e 0,029 para os extratos com larvas L_1 ; L_2 ; L_3 e L_2 e L_3, respectivamente. A fórmula usada para o cálculo foi composta da média aritmética dos resultados, somado três desvios padrão. Valores superiores a este foram considerados reagentes para o teste imunoenzimático.

3.4. CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE ANTICORPOS EM COELHOS IMUNIZADOS COM OS DIFERENTES EXTRATOS PRODUZIDOS COM LARVAS DE *D. hominis*.

As médias das absorbâncias da reação antígeno-anticorpo do teste ELISA para todos os animais encontraram-se acima do *cut-off* estabelecido, a partir da primeira imunização, sendo progressiva e atingindo pico máximo da produção de anticorpos aos 45 dias (4ª semana) da primeira imunização. Os valores de absorbância obtidos pela técnica ELISA indireto para cada grupo de animais segundo o tratamento estão discriminados no ANEXO 07.

O comportamento da absorbância da reação antígeno/anticorpo mostrou-se distinto ($p<0,01$) para os diferentes extratos de acordo com o estadio da larva. Entretanto, os animais imunizados com extratos de larvas de primeiro e segundo estadio apresentaram comportamento linear, mas com valores de absorbância inferiores aos extratos de larvas de terceiro estadio assim como no extrato com os estadios L_2 e L_3 (FIGURA 04).

Os extratos produzidos a partir de larvas L_3 e do *pool* de L_2 e L_3 apresentaram um comportamento similar, com aumento progressivo da formação de anticorpos, seguindo em declínio a partir dos 60 dias (5ª coleta). No presente experimento, apesar destes extratos apresentarem comportamento semelhante, o extrato de larvas L_3 mostrou também que os animais imunizados apresentaram título de anticorpos mais altos que os demais extratos, inclusive do extrato com mistura de larvas L_2 e L_3.

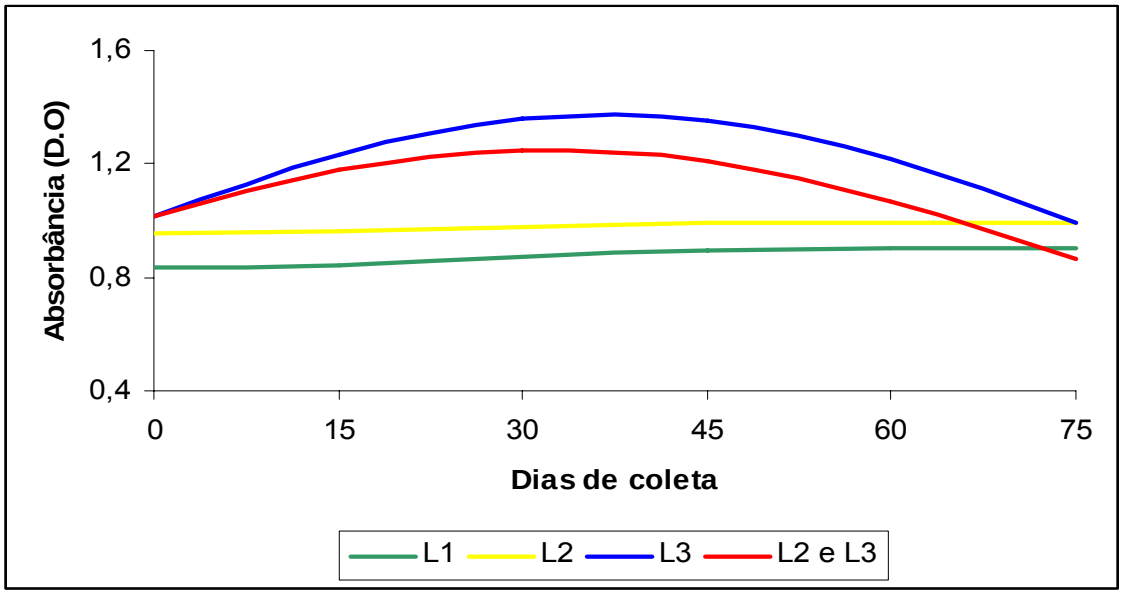


FIGURA 04: **Comparação das absorbâncias obtidas na reação antígeno-anticorpo, através do teste ELISA, distribuídas ao longo das colheitas de sangue, realizadas a cada 15 dias, entre os grupos de animais imunizados com os diferentes extratos de larvas de *D. hominis*.**

Ao analisar os valores de absorbância (ANEXO 07), levando em consideração o valor do *cut off*, é possível verificar que alguns animais apresentam valores menores ou maiores que o esperado em função do número de imunizações. Desta forma, os valores encontrados não assumiram uma distribuição normal, por esse motivo, optou-se por analisar o comportamento de cada grupo em relação ao teste em função do número de coletas. Os dados do teste ELISA foram ajustados para a curva de regressão, deste modo os valores de absorbância discriminados no gráfico da FIGURA 04, são representativos, sendo os valores reais descritos na tabela do ANEXO 07.

4. DISCUSSÃO

A produção de anticorpos policlonais contra os diferentes instares larvais da *D. hominis* é de extrema importância para buscar qual proteína é mais imunogênica. Para a obtenção de todos os diferentes instares larvares foi necessária a criação e manutenção em laboratório, uma vez que, no hospedeiro, a primeira fase larval é diminuta e passa despercebida, em função do pequeno orifício cutâneo formado pela sua penetração ou pela resposta inflamatória por ela desenvolvida. O primeiro obstáculo encontrado para produção de L_1 foi à obtenção das larvas L_3, através da compressão manual dos nódulos em animais infestados. Para obter sucesso na criação de larvas em laboratório, as larvas precisavam estar no final do terceiro instar, ou seja, o mais próximo possível da fase de pupa, para que estas completassem o ciclo evolutivo. Muitas vezes ao comprimir um nódulo furuncular do hospedeiro, a larva obtida ainda estava no final do segundo instar ou no início da fase L_3 e estas não apresentaram sobrevida, não conseguindo penetrar no meio (substrato) para evoluir a fase de pupa. Outro fator negativo importante foi a lesão mecânica provocada pela compressão manual no momento da retirada da larva.

Para que o desenvolvimento das larvas atingisse a fase de pupa, com êxito, foi necessário encontrar um meio mais próximo das condições encontradas à campo. A textura do meio substrato utilizado teria de ser porosa e macia para permitir a fácil penetração das larvas, mas ao mesmo tempo deveria reter a umidade necessária para o seu desenvolvimento e conservar a temperatura ideal. A importância das condições ideais de temperatura e umidade está diretamente relacionada à permeabilidade e maciez do solo para que as larvas L_3 possam penetrar e evoluir até a fase de pupa. Por este motivo foram testados diferentes meios substratos para o desenvolvimento desta fase.

Os três meios substratos avaliados continham serragem (pó de serra), precedentemente avaliados com sucesso por RIBEIRO *et al*. (1993). Para os outros meios substratos utilizou-se areia e terra, misturados ou não. A areia e a terra foram usadas com a intenção de permitir que o substrato permanecesse com maior umidade e conservasse a temperatura mais elevada.

Os resultados obtidos com esses substratos foram satisfatórios, onde os machos emergiram cinco a seis dias antes do que as fêmeas, apresentando o mesmo comportamento descrito por RIBEIRO *et al*. (1989) e RODRIGUES (1998).

O período médio de vida dos insetos obtidos em condições laboratoriais foi de seis dias para os machos e nove dias para as fêmeas, corroborando com os dados de RIBEIRO *et al*. (1993) que obtiveram sobrevivência de três a 11 dias para as fêmeas e de cinco a oito dias para os machos. Estes dados diferem dos encontrados por NELL *et al*. (1956) e SERRA (1963) que relatam uma vida média de quatro e seis dias respectivamente. A maior taxa de emersão tanto de machos como de fêmeas no tratamento B provavelmente ocorreu em função das melhores condições deste meio em manter a umidade e temperatura, exigidas para a fase de pupa.

Quanto à capacidade de postura encontrada nas condições deste experimento variou de 18 a 237 ovos por mosca, num total de 1530 ovos, dos quais 1224 ovos foram postos do segundo ao terceiro dia de vida. TOWNSEND (1922) registrou variação de 250 a 450 ovos e PESSOA (1963) relata que a *D. hominis* pode ovipor de 380 a 400 ovos. TOLEDO (1952) observou duas fêmeas de *D. hominis* com uma postura de 726 e outra com 1200 ovos, com período de vida médio de 6 dias. NEEL *et al*. (1956) estimaram que o período médio de vida, para 221 espécimes de *D. hominis* foi de quatro dias, variando de 1 a 10 dias. RIBEIRO e OLIVEIRA (1987) trabalhando com adultos de *D. hominis* em condições de laboratório observaram que as posturas variaram de dois a 634 ovos com média de 111 ovos por mosca, com período médio de vida de 9,7 e 7,5 dias respectivamente, para machos e fêmeas.

Com o desenvolvimento de todos os estádios padronizados em laboratório, tornou-se possível a avaliação das condições para a sobrevivência de cada instar, o que pôde contribuir para o desenvolvimento de novas técnicas de controle. A produção de todas as fases parasitárias *in vitro*, também pôde permitir a produção de extratos antigênicos obtidos a partir de larvas, contribuindo para maior conhecimento das frações imunogênicas desses extratos, bem como da resposta imune-humoral desenvolvida nos hospedeiros imunizados com estes extratos.

A partir de cada instar larval, foi produzido um extrato de larvas, com a finalidade de comparar o perfil protéico desses extratos, imunizar coelhos e estudar sua resposta imune.

Extratos brutos obtidos a partir de larvas foram preparados seguindo a mesma metodologia proposta por PINTO *et al*. (2003) e FERNANDES *et al*. (2007) e os valores encontrados, nas condições em que foi realizado este trabalho, foram similares aos obtidos por MOTA *et al.* (1980) e PINTO *et al.* (2003), que encontraram 8,0 e 8,3 mg/mL, respectivamente. Entretanto os dados diferem dos encontrados por FERNANDES *et al.* (2007), com extrato antigênico preparado com larvas L_2 e L_3, onde a concentração protéica encontrada foi de 10,02 mg/mL. Por sua vez, estes também diferem dos valores determinados por BARBOSA *et al.* (2000), que comprovaram diferentes concentrações protéicas para os extratos antigênicos, obtidos para cada estádio larval, sendo o extrato de larvas L_3 o menos concentrado. As diferenças nas concentrações protéicas dos extratos preparados com larvas de *D. hominis* variam de acordo com a técnica de preparação do antígeno ou pela variabilidade nucleotídica (estimada em 2,75%), uma vez que as populações brasileiras de *D. hominis* em diferentes regiões estudadas apresentou alto polimorfismo quando utilizadas técnicas com diferentes marcadores moleculares (GEURGAS, 1998). Porém, LEMOS (2000) conclui que a espécie não apresenta estruturação nas populações em relação ao DNA mitocondrial (DNAmt), com as populações das diferentes localidades podendo ser consideradas homogêneas geneticamente.

A analise do perfil protéico dos extratos brutos das larvas de *D. hominis* , por SDS-PAGE, revelou um padrão similar de proteínas nos três estádios larvares e na mistura de extratos com larvas L_2 e L_3, sendo que o extrato com larvas L_2 apresentou o menor número de bandas. Entretanto, pode-se verificar que pelo menos sete bandas protéicas (15; 24; 26; 39; 50; 72 e 87 kDa) são comuns a todos os extratos avaliados. Estes resultados são em parte corroborados pelo fato de antígenos solúveis, comuns a L_1, L_2 e L_3, haverem sido detectados em pele de bovinos infestados com larvas de *D. hominis* (OLIVEIRA-SEQUEIRA *et al*., 1996), ao estudarem a reação imunohistoquímica em tecido bovino infectado por larvas nos diferentes estádios.

Em todos os extratos há predominância de bandas de peso molecular entre 39 e 50 kDa, exceto no estádio de L_2. Também merece destaque maior a intensidade aparente das bandas protéicas de massas moleculares de 39 e 72 kDa em todos os estádios.

Algumas bandas protéicas que apareceram no extrato de L_2 não são encontradas no *pool* com larvas L_2 e L_3, contrariando o esperado. Este padrão apresentado pelos extratos pode ter ocorrido graças a ação de proteases, existentes em cada fase das larvas, que teriam causado a degradação ou digestão das mesmas ou até mesmo sua modificação molecular em função do requerimento fisiológico para seu desenvolvimento.

BRANT, (2004) ao estudar a atividade proteolítica de enzimas de excreção e secreção da *D. hominis* e YONG *et al*. (1996), ao identificar o perfil eletroforético de larvas de *Lucilia cuprina*, observaram que há uma modificação no padrão de proteínas durante o curso do desenvolvimento das larvas passando de um padrão que predominam proteínas de alta massa molecular para um que inclui proteínas de massas inferiores à medida que ocorre o desenvolvimento larval. No ciclo biológico provavelmente ocorrem alterações dessas moléculas de acordo com o papel fisiológico que exercem no desenvolvimento de cada instar larval. Outro fator que poderia explicar o maior número de frações protéicas no extrato de larvas L_1 seria a maior ação proteolítica dessas larvas no momento da penetração nos tecidos do hospedeiro. Segundo OLIVEIRA-SEQUEIRA *et al*. (1996) e BRANT (2004) as larvas L_1, tem em sua composição serino-proteases que auxiliariam a ação dos ganchos das larvas no momento da penetração no tecido cutâneo.

No presente trabalho, foram comparados através da eletroforese em gel de poliacrilamida, os extratos obtidos de cada estadio larval além de um extrato obtido com um *pool* de larvas L_2 e L_3, este último com a finalidade de comprovar os resultados obtidos por PINTO *et al*. (2003) ao imunizar coelhos e FERNANDES *et al.* (2007) ao imunizarem bovinos com extrato de larvas de segundo e terceiro estadio de *D. hominis.*

A hipótese era que a imunização com o extrato obtido com larvas L_2 e L_3 poderia desenvolver uma resposta imune mais intensa uma vez que o hospedeiro estaria exposto ao maior número de epítopos antigênicos, da mesma forma, LELLO e BOULARD (1990) observam que a melhor resposta humoral em coelhos imunizados foi usando antígenos com *pool* de larvas L_2 e L_3, do que em animais imunizados com antígenos de um único estádio larval (L_1 ou L_2 ou L_3). Os extratos preparados com apenas um estádio larval não produzem resposta anamnésica, ou quando o fazem, esta apresenta títulos muito baixos e pouco duradouros.

O presente trabalho mostra que o antígeno produzido a partir de larvas L_3 é o que desenvolve melhor resposta humoral comprovada pela cinética da produção de anticorpos, através da técnica de enzimo-imunoensaio (ELISA).

Este trabalho mostrou que a resposta imune apresentada pelos coelhos imunizados com extrato de larvas L_3 foi semelhante a encontrada no experimento realizado com bovinos (FERNANDES *et al*., 2007) com o desenvolvimento de uma resposta imune crescente até os 45 dias após a primeira imunização, decrescendo então até os 75 dias, quando se equipara aos outros extratos antigênicos. Portanto, coelhos poderão ser utilizados como unidade experimental para estudos posteriores com a resposta imune produzida por larvas de *D. hominis* e os resultados obtidos poderão ser extrapolados à espécie bovina.

5. CONCLUSÕES

- Nas condições em que este estudo foi realizado é possível concluir que o substrato composto por areia e pó-de-serra propiciou o melhor desenvolvimento das larvas de *D. hominis* em laboratório;

- A criação e manutenção da *D. hominis* possibilitou o preparo de antígeno de todos os instares larvares, com produção de anticorpo policlonal em coelhos;

- O perfil eletroforético dos extratos protéicos obtidos apresentou sete bandas protéicas comuns a todos os estádios larvares, com massa molecular de 15, 24, 26, 39, 50, 72 e 87 kDa;

- A cinética de produção de anticorpos policlonais produzidos por coelhos imunizados, mostrou que o extrato solúvel obtido a partir de larvas L_3 é o que produz melhor resposta, com produção do maior título de anticorpos.

- A resposta imune observada pela formação de anticorpos produzidos por coelhos imunizados tem o mesmo comportamento observado em bovinos imunizados com esses extratos de larvas, permitindo assim que os estudos realizados com esses animais possam ser extrapolados a espécie bovina.

6. REFERÊNCIAS

BARBOSA, C. G.; SANAVRIA, A; FREIRE, R. B. Humoral immune response in cattle experimentally infested with larvae of *Dermatobia hominis.* **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 3, p. 449-453, 2000.

BELLATO, V.; PALOSCHI, C. G.; SOUZA, A. P.; RAMOS, C. I.; SARTOR, A. A. Variação sazonal das larvas da mosca de berne em bovinos no planalto catarinense. **Comunicado Técnico - EMPASC**, Florianópolis, n. 101, p. 1-7, 1986.

BORJA, G. E. M. Retrospectiva da dermatobiose e epidemiologia da *Dermatobia hominis.* In: SEMINÁRIO NACIONAL SOBRE PARASITOSE DOS BOVINOS, 1., 1982, Campo Grande. **Anais**..., 1982. p. 303-314.

BRITO, L. G; PAES, M. J.; BORJA, G. E. M. Infestação artificial e desenvolvimento larval de *Dermatobia hominis* (L.Jr., 1781) (Diptera: Cuterebridae) em suínos e eqüinos. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 48, n. 277, p. 401-403, 2001.

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

BRANT, M. P. R. C. **Análise Bioquímica dos Produtos de Excreção/secreção de Larvas de *Dermatobia hominis***. São Paulo, 2004. 69f Dissertação de mestrado. Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

DAEMON, E.; PRATA, M. C. A. Miíase conjuntival por larvas de *Dermatobia hominis* (Linnaeus Jr., 1781) (Diptera: Cuterebridae) em eqüino: descrição de um caso. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 2, p. 81-84, 1997.

FERNANDES, N. L. M. **Dinâmica populacional da *Dermatobia hominis* (Linnaeus, 1781) (Díptera:Cuterebridae) e o Comportamento da resposta imune de bovinos imunizados com extrato de larvas.** Curitiba, 2004. 113 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

FERNANDES, N. L. M.; THOMAZ-SOCCOL, V.; PINTO, S. B.; MINOZZO, J. C.; OLIVEIRA, C. A. L. Resposta imune-humoral e celular em bovinos da raça Nelore imunizados com extrato de larvas (L2 e L3) de *Dermatobia hominis* (Linnaeus Jr., 1781). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 3, p. 789-795, 2007.

FONSECA, A. J. C. **Aspectos imunológicos, atividade antibacteriana e efeito de várias doses de ivermectina sobre larvas de *Dermatobia hominis* (Linnaeus Jr., 1781) (Diptera: Cuterebridae)**. Itaguaí, 1989. 23 f. Dissertação (mestrado em Medicina Veterinária) – Instituto de Biologia, Universidade Federal d Rio de Janeiro.

GEURGAS, S. R. **Análise do polimorfismo de populações brasileiras de *Dermatobia hominis* (díptera:Oestridae) através de RFLP do DNA mitocôndrial.** Campinas, 1998. 90 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas. (1998),

GILMOUR, A. R.; GOGEL, B. J.; CULLIS, B. R.; WELHAM, S. J.;THOMPSON, R. **ASRemL User Guide Release 1.0**. Hemel Hempstead, United Kingdom, 2002. HP1 1ES, ISBN 1-904375-07-3

GUIMARÃES, J. H.; PAPAVERO, N. **Myiasis in Man and Animals in the Neotropical Region.** São Paulo: Plêiade/FAPESP, 1999.

GOMES, A.; HONER, M. R.; KOLLER, W. W.; SILVA, R. L. Vetores de ovos de *Dermatobia hominis* (L. Jr., 1781) (Diptera: Cuterebridae) na região de cerrados do Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 7, n. 1, p. 37-40, 1998.

JANEWAY Jr., C. A.; TRAVERS, P. **Imunobiologia: o sistema imunológico na saúde e na doença.** 2. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997.

LELLO, E.; BOULARD, C. Rabbit antibody responses to experimental infestation with *Dermatobia hominis*. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, 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**, Amsterdam, v. 47, p. 129-138, 1993.

LELLO, E.; PERAÇOLI, M. T. S.; OLIVEIRA-SEQUEIRA, T. C. G. Inflammatory response in *Dermatobia hominis* infested rabbits. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 8, p. 287-291, 1999.

LEMOS, T. A. **Caracterização da variabilidade da mosca do berne *Dermatobia hominis* (díptera:Oestridae) através de dois marcadores moleculares**. Campinas, 2000. 104 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.

MAGALHÃES, F. E. P.; LESSKIU, C. Efeito do controle do berne sobre o ganho de peso e qualidade dos couros em novilhos de corte. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 17, n. 2, p. 329-336, 1982.

MINOZZO, J. C. **Imunoeletrotransferência e Enzimoimunoensaio como Ferramentas para o Imunodiagnóstico da Neurocisticercose**. Curitiba, 2003. 114 f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

MOTA, N. G. S.; PERAÇOLI, M. T. S.; LELLO, E. Anticorpos circulantes em coelhos imunizados com antígenos obtidos de larvas de *Dermatobia hominis* Lin. (Díptera: Cuterebridae). **Ciência e Cultura**. São Paulo**,** v. 32, n. 4, p. 453-457, 1980.

NEEL, N. W.; URBINA, O.; VIALE, E.; ALBA, J. Ciclo biológico del tórsalo (*Dermatobia hominis*) em Turrialba, Costa Rica. **Turrialba,** São José, v.5, n. 3, p. 91-104, 1956.

OLIVEIRA, G. P. Ecologia de *Dermatobia hominis* L. Jr. 1781 (Díptera: Cuterebridae) na Região de São Carlos, Estado de São Paulo, Brasil. **Turrialba**, São José, v. 41, n. 3, p. 367-375, 1991.

OLIVEIRA-SEQUEIRA, T. C. G.; SEQUEIRA, J. L.; SCHIMITT, F. L.; LELLO, E. Histological and immunological reaction of cattle skin to first-instar larvae of *Dermatobia hominis*. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v. 10, p. 323-30, 1996.

PERAÇOLI, M. T. S.; LELLO, E.; MOTA, N. G. S. Comportamento da resposta imune-humoral em coelhos imunizados com antígenos de D*ermatobia hominis* Linnaeus, frente às larvas desse parasita (Díptera: Cuterebridae). **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 32, n. 11, p. 1537-1542, 1980.

PESSOA, S. B. **Parasitologia Médica.** 11ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. 872 p.

PINTO, S. B; THOMAZ-SOCCOL, V.; VENDRUSCULO, E.; ROCHADELLI, R.; RIBEIRO, P. B.; FREITAG, A.; HENEMANN, C.; UEMURA, M. Bioecologia de *Dermatobia hominis* (Linnaeus Jr., 1781) em Palotina, Paraná, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 5, p. 821-27, 2002

PINTO, S. B.; THOMAZ-SOCCOL; V.; MINOZZO, J. C.; ZABOTT, M. V.; VENDRUSCOLO, E. G.; ROCHADELLI, R.; FREITAG, A.; GUETNER, C. Resposta imune humoral de coelhos frente a extratos de larvas de *Dermatobia hominis*. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v. 8, n. 2, p. 19 - 25, 2003.

RIBEIRO, P. B. **Ciclo biológico de *Dermatobia hominis* (L.Jr., 1781) (Diptera: Cuterebridae) oriunda de bovinos**. Porto Alegre, 1982. 24 f. Dissertação (Mestrado em Doenças Parasitárias) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

RIBEIRO, P. B.; OLIVEIRA, C. M. B. Artrópodos parasitos de animais domésticos da zona sul do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte v. 39, n. 4, p. 533-537, 1987

RIBEIRO, P. B.; OLIVEIRA, C. M. B.; COSTA, P. R. P.; BRUM, J. G. W.; BATISTA, Z. R. Flutuação populacional de *Dermatobia hominis* (L. Jr., 1781) sobre bovinos no município de Pelotas, RS. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 41, n. 3, p. 223-231, 1989.

RIBEIRO, P. B.; VIANNA, E. E. S.; COSTA, P. R. P.; SCHOLL, P.J. Período de vida e capacidade de postura da *Dermatobia hominis* em laboratório. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 2, n. 1, p. 29-31, 1993.

RODRIGUES, B. R. ***Dermatobia hominis* (L. Jr., 1781) (Díptera: Oestridae: Cuterebrinae): ciclo silvestre e ecologia das infestações de bovinos pelo berne no município de Pedro Leopoldo**, MG, Brasil. Belo Horizonte, 1998. 101 f. Tese (Doutorado em Parasitologia) – Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

SANAVRIA, A.; BARBOSA, C. G.; BEZERRA, E. S.; MORAIS, M. C.; GIUPPONI, P. C. Distribuição e freqüência de larvas de *Dermatobia hominis* (Linnaeus Jr., 1781) (Díptera: Cuterebridae) em peles de bovinos. **Parasitologia Latinoamericana**, Santiago, v. 57, n. 1-2, p. 21-24, 2002.

SARTOR, A. A. **Parasitismo por larvas de *Dermatobia hominis* (Linnaeus Jr., 1781) em bovinos no município de Lorena, estado de São Paulo.** Rio de Janeiro, 1986. 76 f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1986.

SERRA, R. G. Contribuição à biologia de *Dermatobia hominis*. Capacidade ovígera e oviposição. **Revista da Faculdade de Farmácia e Biologia**, Universidade de São Paulo, v. 1, n. 2, p. 119-24, 1963.

SILVA JUNIOR, V. P.; LEANDRO, A. S. BORJA, G. E. M. Ocorrência do berne, *Dermatobia hominis* (Diptera: Cuterebridae) em vários hospedeiros, no Rio de Janeiro, Brasil. **Parasitologia al Dia**, Santiago, v. 22, n. 3-4, p. 97-101, 1998.

TOWBIN, H.; STAEHELIN, T.; GORDON, I. 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**, Washington, v. 76, n. 9, p.4350-52, 1979.

TOWNSEND, C. H. T. O berne e sua eliminação. **Almanaque Agrícola Brasileiro**, São Paulo, 1922.

TOLEDO, A. A. Nocividade das chuvas ao efeito dos inseticidas clorados sobre o berne. **O Biológico**, São Paulo, v. 15, n. 4, p.57-61, 1952.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA. Centro de Processamento de Dados. UFV. **Sistema para Análises Estatísticas – SAEG 8.0**, Viçosa, 2002.

YONG, A. R.; MEEUSEN, E. N.; BOWLES, V. M. Characterization of ES products involved in wound initiation by *Lucilia cuprina* larvae. **International Journal of Parasitology**, Amsterdam, v. 26, p. 245-52, 1996.

CAPÍTULO II

CARACTERIZAÇÃO DE PROTEÍNA ANTIGÊNICA DE EXTRATO DE LARVAS DE *D. hominis* (Linnaeus Jr., 1781).

CARACTERIZAÇÃO DE PROTEÍNA ANTIGÊNICA DE EXTRATO DE LARVAS DE *D. hominis* (Linnaeus Jr., 1781).

Resumo: O desenvolvimento de vacinas para o controle de ectoparasitos depende da identificação dos principais antígenos desses parasitos. Visando ampliar o conhecimento da resposta imunológica do hospedeiro frente à dermatobiose, extratos de larvas L_1, L_2 e L_3 de *Dermatobia hominis* foram produzidos, com o objetivo de caracterizar as frações protéicas antigênicas de cada estádio larval, separá-las e obter o seqüenciamento da cadeia de peptídeos destas proteínas. Os extratos de cada estádio larval foram testados contra anticorpos policlonais produzidos em coelhos e bovinos. O extrato de larvas L_1 não apresentou reação de imunodetecção para os soros de coelho e bovino. A imunodetecção de anticorpos de coelho e bovinos no extrato de larvas L_2 e L_3 revelou algumas frações antigênicas, com intensidade proeminente na banda de 50 kDa, para ambos os soros. Essa proteína antigênica foi analisada e os peptídeos tripsínicos obtidos a partir das bandas do imunoprecipitado, em gel de poliacrilamida, foram submetidos à espectrometria de massa. As seqüências obtidas foram submetidas aos bancos de dados para confronto com as seqüências depositadas, não sendo observada nenhuma proteína similar à seqüenciada neste trabalho.

Palavras-chave: anticorpos policlonais, imunodetecção, *Dermatobia hominis*

CHARACTERIZATION OF ANTIGENIC PROTEIN FROM LARVAL EXTRACTS OF *D. hominis* (Linnaeus Jr., 1781).

Abstract: Vaccine development for ectoparasites control depends on identification of main parasite antigens. In order to improve the knowledge about host immune response against dermatobiosis, *Dermatobia hominis* L_1, L_2 and L_3 larval extracts were produced with the goals of characterizing and separating antigenic protein fractions of every larval stage and sequenciating these proteins. Extracts of larval stages were tested against polyclonal antibodies previously produced in rabbits and bovines. L_1 larval extract was not immune-detected by incubation with rabbit or bovine sera. Conversely, some antigenic fractions of L_2 and L_3 larval extracts were immune-detected by reaction with the antibodies. In particular, 50 kDa protein band was prominent in intensity for both aforementioned sera. Then, this antigenic protein was analyzed by mass spectrometry performed with trypsinic peptides from this protein band, which was obtained after immunoprecipited protein electrophoresis in polyacrilamide gel. Amino acids sequences were compared with the sequences of public data and we did not find any protein similar in sequence to the one studied in here.

Key words: polyclonal antibodies, immune-detection, *Dermatobia hominis*

1. INTRODUÇÃO

Os insetos constituem um dos grupos bem sucedidos na natureza, representando 80% das espécies do reino animal. Estima-se que existam mais de 2,5 milhões de espécies, sendo que destas apenas um milhão seja conhecida (ALVES, 1998). Os insetos se desenvolvem em quase todos os ambientes e, desde os tempos mais remotos, o homem luta contra os insetos pragas que infestam animais e vegetais, especialmente aqueles destinados à alimentação humana e animal, influenciando diretamente a qualidade e produtividade dos rebanhos.

A produção agropecuária avançada e racional visa, entre outras coisas, a obtenção de maior produtividade por unidade de área e a sanidade do rebanho, além de baixo custo ecológico (poluição) (SILVA, 1993; BARROS, 1996). O uso de produtos químicos como os inseticidas, difundiu-se amplamente para atingir estas finalidades. Entretanto, ficou evidenciado que a utilização cada vez maior desses produtos de alta toxicidade e amplo espectro apresenta desvantagens, como a poluição do ambiente, a qual pode alterar todo o complexo biótico, afetando plantas, animais e o próprio homem (MOSCARDI e SOUZA, 2002).

Fatores de comportamento e fisiológicos que podem alterar a susceptibilidade de insetos a moléculas químicas podem também afetar certos mecanismos de resistência a esses produtos (SOSA-GÓMEZ; PEREIRA; ALVES, 1998). No sistema imunológico dos insetos não foram evidenciadas imunoglobulinas específicas para reconhecimento de antígenos (WILLOTT *et al*., 1994; NIERE *et al*., 1999; SILVA, 2002). Assim, torna-se importante a caracterização e a purificação de peptídeos produzidos em resposta a infecções causadas por ectoparasitas, juntamente com informações da biotecnologia, principalmente de natureza genética, propiciando novos discernimentos sobre a organização e a regulação do sistema imunológico dos mesmos.

OTRANTO e STEVENS, (2002) verificaram que a resposta do hospedeiro frente à infestação de larvas produtoras de miíases, depende do estado de saúde do hospedeiro, da biologia da larva, do local parasitado, da natureza da larva e dos mecanismos de defesa específicos contra a larva.

Algumas miíases podem provocar lesões com intensa destruição tecidual como os califorideos e sarcofagídeos, outras se desenvolvem em ferimentos cutâneos ou penetram pela pele integra do hospedeiro desenvolvendo-se na derme

e em camadas mais profundas do tecido cutâneo. Este mecanismo de ação das larvas permite que o organismo do hospedeiro, desenvolva resposta imune a esta agressão. A intensidade ou efetividade desta resposta está diretamente ligada à extensão da lesão ou ao período de permanência da larva no hospedeiro (PRUETT, 1999)

Miíases são infestações provocadas por larvas de diferentes espécies de dípteros, em tecidos vivos ou mortos dos animais ou do homem, durante um período de seu desenvolvimento. Estas larvas causam graves prejuízos econômicos para a indústria pecuária, afetando os índices de produtividade e a produção de carne e leite (OTRANTO, 2001).

Embora as miíases tenham sido descritas desde os tempos antigos, muitos aspectos destas infestações ainda são desconhecidos. Durante o século passado, os quimioterápicos, principalmente organofosforados e lactonas macrocíclicas, propiciaram uma verdadeira revolução no controle parasitário. No entanto, hoje essa técnica é bastante discutida devido as recentes questões quanto a segurança ambiental, alimentar e ecologia sustentável (STEVENS *et al*., 2006).

A resistência natural ou adquirida à parasitas contribui para a distribuição desigual dos mesmos numa população de hospedeiros. Indivíduos susceptíveis são responsáveis pela transmissão e manutenção do parasitismo. A promessa do controle populacional parasitário, baseada neste conceito, orienta o estudo dos mecanismos imunológicos do hospedeiro para a produção de vacinas. Espécies para as quais vacinas estão em desenvolvimento incluem *Lucillia cuprina*, *Pediculus humanos*, *Chrysomya bezziana*, *Hypoderma lineatum, H. bovis* e *Haematobia irritans exígua*. Atualmente, Tick-Gard TM® e Gavac TM®, para o controle do *Boophilus microplus*, são as únicas vacinas contra estes artrópodes disponíveis comercialmente (PRUETT, 2003; FUJIWARA *et al*., 2005 e HERRERA *et al*., 2007).

As larvas de *Dermatobia hominis*, embora pareçam ser menos patogênicas, do que outras larvas, como a de *Lucillia cuprina*, por se desenvolverem no tecido subcutâneo, poderiam oferecer pouca oportunidade de resposta imune, em contrapartida este parasito permanece longo período no tecido hospedeiro, desencadeando resposta imune humoral e celular (MOTA *et al*., 1980; LELLO *et al*., 1999; PINTO *et al*., 2003 e FERNANDES *et al*., 2007).

A biologia, imunologia, epidemiologia e mecanismos de controle para a *D. hominis*, tem sido estudados, na tentativa de se estabelecer programas de controle

alternativos contrapondo-se ao emprego de substâncias químicas, diminuindo assim o impacto ambiental dos mesmos. O desenvolvimento dos mecanismos imunológicos do hospedeiro estão relacionados com a sanidade animal, a biologia da larva e o local do parasitismo. No entanto, há poucos dados disponíveis sobre a resposta imune às miíases cutâneas. Sabe-se que a resposta celular, com proliferação de neutrófilos e eosinófilos em animais maciçamente infestados ou imunizados com extratos de larvas, tem papel importante na modulação da resposta humoral desses hospedeiros, principalmente quando estes sofreram imunização com extrato bruto de larvas (FERNANDES *et al*., 2007).

O desenvolvimento de vacinas para o controle de ectoparasitos depende da identificação dos principais antígenos desses parasitos. Uma série de critérios podem ser aplicados a antígenos candidatos: o anticorpo do hospedeiro deve ter acesso ao antígeno parasitário; o(s) antígeno(s) deve compartilhar estrutura conservada, que permita seu seqüenciamento, para utilização de tecnologia recombinante. BARRIGA (2002) sugere três grandes grupos de antígenos: serino-proteases; quimiorreceptores e neuropeptídeos. Estudos realizados com proteases secretadas pela larva em seus diferentes estádios de crescimento têm sido realizados, onde serino-proteases de *Hypoderma* spp foram detectadas e bioquimicamente caracterizadas. Estas proteases parecem estar envolvidas, não só no tecido larval e estímulo da resposta imune do hospedeiro, mas também na formação da resposta inflamatória em torno da migração das larvas daquele parasito (CHABAUDIE e BOULARD, 1992).

O conhecimento da resposta imune frente a antígenos, bem como a sua caracterização, será ferramenta indispensável para a concepção de futuras vacinas, contribuindo para a produtividade da pecuária nacional e sendo a melhor opção ambientalmente sustentável.

Métodos de vacinação contra artrópodes têm sido desenvolvidos com diferentes graus de sucesso; seu papel protetor contra ectoparasitos em geral, e contra larvas causadoras de miíase, ainda é motivo de controvérsia, uma vez que não induzem o rápido efeito produzido por pesticidas químicos (PRUETT, 1999). Estratégias de vacinação são consideradas uma importante ferramenta reduzindo a população de artrópodes parasitos. A partir da década de 90, as pesquisas para o desenvolvimento de vacinas, concentram-se em dois tipos de antígenos vacinais: antígeno convencional, produzido por larvas do parasito e antígeno “oculto”,

produzido com fragmentos do parasito ou até mesmo substâncias do seu metabolismo obtidas a partir dos produtos de secreção e/ou excreção (WILLADSEN, 1997).

Visando ampliar o conhecimento da resposta imunológica do hospedeiro frente à dermatobiose, foram produzidos extratos de larvas L_1, L_2 e L_3 de *Dermatobia hominis* com o objetivo de:

a) caracterizar as frações protéicas imunogênicas de cada instar larval, separadas por SDS-PAGE, através da imunoeletrotransferência (*Western blotting*);
b) identificar as proteínas imunogênicas contra os anticorpos policlonais produzidos em coelhos e bovinos;
c) obter o seqüenciamento da cadeia de peptídeos das proteínas imunogênicas através da espectrometria de massa.

Esses dados serão de suma importância para a obtenção de um antígeno candidato a uma possível vacina recombinante para o controle da *D. hominis*

2. MATERIAL E MÉTODOS

A imunoeletrotransferência foi realizada com todos os extratos obtidos a partir de larvas de *D. hominis* (L_1, L_2, L_3 e mistura de L_2 e L_3) com o objetivo de detectar frações protéicas antigênicas contra os soros de coelhos e bovinos imunizados com esses extratos.

2.1. OBTENÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS EM COELHOS E BOVINOS

Soros hiperimunes de coelhos e bovinos foram obtidos a partir da imunização desses animais com extratos de larvas L_1, L_2 e L_3 (CAPÍTULO I). Foram aplicadas três doses do antígeno de larvas, de cada estádio larval, acrescidas do adjuvante de Freund. As imunizações foram realizadas com intervalos de 15 dias, sendo a primeira aplicação com o adjuvante completo e as subseqüentes com adjuvante incompleto. Os soros então foram armazenados (-20ºC) até o momento de sua utilização.

2.2. ELETROTRANSFERÊNCIA (*Western blotting*) E IMUNODETECÇÃO DAS FRAÇÕES PROTÉICAS OBTIDAS

Para análise da presença de frações protéicas antigênicas do extrato de larvas de *D. hominis* foram realizados ensaios de imunodetecção, por eletroforese dos extratos (CAPÍTULO I). A imunoeletrotransferência permite detectar frações protéicas numa mistura de proteínas dando também informação acerca de sua massa molecular. Inicialmente as proteínas foram separadas por SDS-PAGE e, posteriormente, transferidas para uma membrana de nitrocelulose.

A membrana de nitrocelulose foi incubada com o anticorpo policlonal primário que se ligou à proteína que se pretendia detectar, formando um complexo anticorpo-proteína. Adicionou-se o anticorpo secundário conjugado a uma enzima, que se ligou ao anticorpo primário. A enzima funciona como um sinalizador molecular que permite a visualização, na presença de um substrato cromógeno, que dará origem a

um precipitado insolúvel, localizando o anticorpo primário que por sua vez se ligou à proteína.

2.2.1. Montagem da Cuba para a Transferência (*blotting*)

Ao término da eletroforese, verificada quando o indicador de corrida (azul de bromofenol) atingiu o final, o gel foi removido e colocado, em recipiente plástico e este, por sua vez, disposto sobre uma folha de espuma. Uma extremidade do gel foi então identificada e montado o conjunto de placas, ficando assim disposto: folha de espuma, papel filtro, gel, membrana de nitrocelulose (Hybond 303D - Amersham), papel filtro e folha de espuma. Este conjunto foi então fechado em forma de "sanduíche", sendo que o gel ficou voltado para o pólo negativo da cuba e a membrana de nitrocelulose para pólo positivo. Tomou-se o cuidado de manter todo o material sempre submerso em tampão de transferência (ANEXO 08).

2.2.2. Transferência (*blotting*)

Após a montagem do "sanduíche" anteriormente mencionado, este foi acondicionado em cuba de transferência, que foi totalmente preenchida com a solução tampão. A fonte de energia foi ligada e a transferência ocorreu com voltagem constante de 24 volts, por um período de 14 horas, seguido de mais uma hora com voltagem de 48 volts, ambas etapas sob refrigeração (4ºC).

2.2.3. Coloração do Gel de Poliacrilamida

Após esse período a transferência foi avaliada com a coloração do gel pelo Coomassie e a coloração da membrana de nitro celulose pelo corante de Ponceau (ANEXO 09). A eficiência da transferência foi verificada ao comparar as bandas coradas no gel com as bandas coradas da membrana.

2.2.4. Preparação da Membrana de Nitrocelulose

Após a coloração, a membrana foi seca em papel filtro e tiras, correspondentes as linhas da corrida no gel de poliacrilamida, foram cortadas e identificadas. Estas tiras de nitrocelulose foram submetidas a imunodetecção, que é um procedimento semelhante ao de um ELISA indireto.

2.2.5. Lavagem

As tiras cortadas foram acondicionadas em canaletas da placa de incubação com 3 mL/canaleta de água destilada, e deixadas sob agitação contínua, em agitador tipo gangorra, por três minutos. Uma tira foi guardada para ser utilizada como padrão.

2.2.6. Bloqueio

A solução de bloqueio foi usada para bloquear os sítios de ligação não específicos. O bloqueio da placa foi feito utilizando-se 3 mL/canaleta de solução de bloqueio (leite Molico® 3% e 0,05% tween 20, diluídos em PBS pH 7,4). A mesma foi incubada por 60 minutos a temperatura ambiente, sob agitação constante.

2.2.7. Segunda Lavagem

Após o bloqueio as tiras foram lavadas, três vezes, durante cinco minutos. As duas primeiras lavagens foram realizadas com solução PBS pH 7,4 e a última com a solução de bloqueio. Todas com volume de 3 mL/canaleta e sob agitação constante.

2.2.8. Incubação com Soros Hiperimunes

Diluições seriadas, em solução de bloqueio, foram realizadas dos soros de coelhos e de bovinos imunizados com extratos de larvas, para determinar a melhor diluição dos mesmos. Os soros de coelho foram analisados nas diluições de 1000, 2000, 4000, e 8000 vezes. Enquanto os soros de bovinos imunizados foram analisados nas diluições de 50, 100, 200 e 400 vezes.

Cada tira foi incubada com 3 mL/canaleta da solução, sob agitação contínua. Foram realizadas duplicatas das amostras para cada diluição, sendo possível testar diferentes períodos de incubação. Uma das amostras foi submetida a um período de incubação de duas horas em temperatura ambiente e a outra amostra "*over night*" (aproximadamente 14 horas) à 4ºC. Os soros de coelho e bovino foram avaliados a fim de avaliar a reatividade cruzada, do soro de bovino hiperimune, contra o antígeno de larvas de *D. hominis*.

2.2.9. Terceira Lavagem

Esta lavagem destinou-se à remoção de anticorpos que não se ligaram aos antígenos fixados na membrana de nitrocelulose. Procedeu-se de forma semelhante à segunda lavagem, entretanto, este procedimento foi repetido seis vezes, sendo as primeiros realizadas com PBS pH 7,4 e a última com solução de bloqueio.

2.2.10. Incubação do Conjugado

O conjugado foi diluído em solução de bloqueio e as tiras incubadas sob lenta agitação contínua à temperatura ambiente, por duas horas. Para o soro de coelho foi utilizado anti-IgG de coelho peroxidase (Sigma, A-0545) e para os soros de bovino, anti-IgG de bovino peroxidase (Sigma, A-7414). Foram avaliadas diluições de 1:1000, 1:2000 e 1:4000 para as amostras com soros de coelho e diluições de 1:500, 1:1000 e 1:2000 para as amostras com soros de bovinos.

2.2.11. Quarta Lavagem

Após o término da incubação do conjugado, as canaletas foram lavadas seis vezes, seguindo-se o mesmo protocolo da 3ª. lavagem. Sendo a última lavagem realizada com tampão ótimo de incubação do substrato e do cromógeno.

2.2.12. Substrato e Cromógeno

Para enzima peroxidase o substrato usado foi o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Como cromógeno optou-se pelo Aminoetilcarbazole (AEC). A substância 3-amino 9-ethylcarbazol desenvolve uma cor avermelhada, sendo mais sensível que o cloronaphtol e resultando em menos reação de fundo que a Diaminobenzidina (ANEXO 10).

2.3. SEPARAÇÃO DA FRAÇÃO PROTÉICA OBTIDA NA IMUNODETECÇÃO

2.3.1. Imunoprecipitação

A imunoprecipitação é baseada na ligação de anticorpos à agarose através da proteína A, isolada da parede celular do *Staphylococcus aureus*. A proteína A interage com a porção Fc das moléculas de IgG de várias espécies. A sedimentação deste complexo por centrifugação proporciona a possibilidade de separação de proteínas específicas. Proteína A-Sepharose (SIGMA), que tem como princípio a ligação a resíduos de tirosina na cadeia curta do anticorpo por interação hidrofóbica (LIRIA e MIRANDA, 2005).

2.3.1.1. Preparação das amostras

As amostras de extratos de larva de *D. hominis*, foram descongeladas e centrifugadas (12.000g/10 min.), para se ter a certeza que todo o antígeno era solúvel.

Equilibrou-se então o volume adequado de Proteína A-Sepharose com o tampão de lise (ANEXO 11), para obter um *pellet* de 50 µL. Foram pipetados 100 µl

da solução de proteína A, centrifugados (14.000g/40 seg.) e acrescidos de 1,0 mL de tampão de lise. Esta solução foi novamente centrifugada (14.000g/40 seg.), sempre desprezando o sobrenadante. Repetiu-se esta operação por três vezes.

2.3.1.2. Clareamento

Foram pipetados 1000 µl do extrato de larvas de *D. hominis* e transportados para o frasco com 50 µl de proteína A. Incubou-se por duas horas à 4ºC sob agitação constante. O material foi centrifugado (14.000g/40 seg.) recuperando-se o sobrenadante que foi dividido em duas alíquotas. O *pellet* precipitado foi guardado à - 20ºC para servir como contra prova.

2.3.1.3. Imunoprecipitação

Foram acrescidos 20 µl de proteína A e 10 µl de soro hiperimune (contra larvas L_3) às alíquotas da etapa de clareamento. Foram preparadas amostras com soro de coelho e de bovino. As amostras foram incubadas *over nigth*, em geladeira (4ºC). Após esse período as amostras foram centrifugadas (12.000g/2 min.) e o sobrenadante desprezado. O *pellet* formado foi lavado com solução tampão de lise por cinco a oito vezes, sendo a última realizada com tampão de lise acrescido de SDS a 0,05%.

2.3.1.4. Eluição

O imunocomplexo obtido foi eluído em tampão de amostra (ANEXO 12) e fervido por 5 minutos. As amostras foram submetidas a centrifugação (10.000g/30 seg.) e o sobrenadante aplicado em gel de poliacrilamida a 10%, como já descrito anteriormente e submetidas a eletroforese. Como controles negativo foram usadas amostras com soro pré-imune e o *pellet* recuperado na etapa de clareamento. Após a eletroforese as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose e

identificadas por reação de imunoperoxidase. O gel foi corado pelo Coomassie (ANEXO 13).

2.4. SEQUENCIAMENTO DE AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA

2.4.1. Digestão Tripsínica *in situ* de Proteínas Separadas por SDS-PAGE.

Após a imunoprecipitação da amostra, a banda obtida, separada por eletroforese em gel de poliacrilamida, foi recortada do gel com auxílio de lâmina de bisturi e submetida à digestão enzimática com tripsina. O duodecil sulfato de sódio (SDS) e o corante Coomassie blue foram removidos por 3 lavagens de 15 minutos, agitando em vortex, com 400 µl de bicarbonato de amônio 100mM contendo 50% de acetonitrila. Por último a amostra foi desidratada com 200 µl de acetonitrila pura, por 5 minutos, até que os fragmentos de gel ficassem esbranquiçados. A acetonitrila foi removida totalmente e os pedaços de gel secos em centrífuga rotatória à vácuo (SpeedVac, Savant) por cerca de 15 minutos.

A banda de gel seco foi re-hidratada com uma solução de tripsina (Promega) a 0,5ug/20ul de ácido acético 50 mM e após o completo intumescimento do gel, a tripsina foi removida e foi adicionado um volume de bicarbonato de amônio 0,1M suficiente para cobrir completamente o gel, sendo incubado a 37ºC por 24 horas.

A reação foi interrompida pela adição de 5µl de ácido fórmico 5% e mantida em temperatura ambiente por 30 min para extração dos peptídeos. O extrato foi conservado em freezer (-20ºC) até o momento da análise por espectrometria de massas.

Os peptídeos obtidos por digestão tripsínica da amostra foram preparados em *micro-tip* contendo resina de fase reversa (POROS R2, Perseptive Biosystems, USA) previamente ativada com metanol, equilibrada com ácido fórmico a 0,2%. A amostra foi carregada em micro-tip e purificada de sais e outros componentes hidrofílicos com 3 x 100µl de ácido fórmico a 0,2%, sendo os peptídeos eluídos da resina em 30µl de uma solução de metanol a 60% em ácido fórmico 5%. Neste solvente a amostra foi diretamente infundida no espectrômetro de massas.

2.4.2. Espectrometria de Massa

A análise por espectrometria de massa identifica peptídeos por meio da massa dos compostos analisados. O espectrômetro é constituído por uma fonte de íons, um analisador de massa – que mede a relação carga/massa (m/z) do analíto ionizado – e um detector que registra o número de íons para cada valor de m/z.

Os peptídeos tripsínicos foram analisados em um espectrômetro de massas do tipo *eletrospray* triplo-quadrupolo (Quattro II, Micromass, Manchester, UK) utilizando uma origem *eletropray* do tipo *nanoflow* contendo um capilar de sílica fundida de 75μm de diâmetro interno, mantido a 4 kVolts, e 40 Volts no cone de entrada e a uma temperatura de 100ºC.

A amostra foi introduzida através de uma bomba tipo seringa (Harvard, Inc, USA) a um fluxo de 300nl/min e os espectros de massa foram coletados na forma de média de scans (15-30 scans) e processados com o software MassLynx v.3.3 (Micromass, Manchester, UK). A coleta de dados de massa utilizou varredura em MS1 (400-1500 u.m.a) obtendo-se assim a determinação da massa dos peptídeos (*peptide mass fingerprint*). Cada íon de peptídeo detectado foi submetido a CID-MS/MS (*daughter ion scanning*) que promove a fragmentação do íon selecionado por colisão com argônio na pressão parcial de 3,0 x 10^{-3} mBar e energia variando entre 20-30 eV originando fragmentos de íons do tipo *b* e *y* que foram utilizados para a dedução das respectivas seqüências de aminoácidos dos peptídeos.

A dedução das seqüências de aminoácidos foi realizada por submissão dos espectros de CID-MS/MS ao programa Biolynx (Micromass, Manchester, UK). Os dados gerados por MS foram submetidos aos bancos de dados NCBI e Swiss-Prot utilizando os sítios na internet Blast, ProteinProspector e Mascot, acessados respectivamente em:

- www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/
- www.prospector.ucsf.edu/
- www.matrixscience.com/search_form_select.html

na tentativa de identificar a(s) proteína(s).

3. RESULTADOS

3.1. IMUNOELETROTRANSFERÊNCIA DAS PROTEÍNAS ANTIGÊNICAS IDENTIFICADAS NOS DIFERENTES EXTRATOS DE LARVAS

Os extratos de cada instar larval foram testados contra os soros hiperimunes produzidos em coelhos e bovinos. O extrato de larvas L_1 não apresentou nenhuma reação de imunodetecção no soro de coelho, nem no de bovino (FIGURA 01).

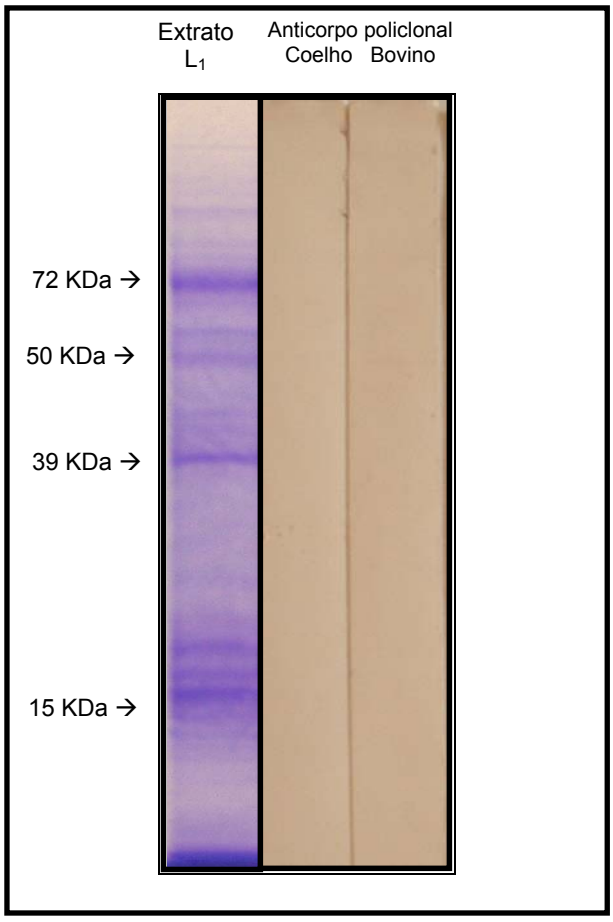


FIGURA 01: Corrida eletroforética do extrato de larvas L_1 de *D. hominis* em gel de poliacrilamida 12%, corado pelo Coomassie e sua imunoeletrotransferência para membrana de nitro celulose, frente a anticorpos policlonais contra larvas L_1 produzidos em coelho e de bovino, identificadas por reação de imunoperoxidase, com o cromógeno diaminoetilcarbazole.

A reação antígeno/anticorpo com extratos de larvas de segundo estádio permitiu revelar bandas protéicas na imunoeletrotransferência contra os soros de coelho e bovinos com massa molecular entre 72 e 18 kDa (FIGURA 02).

Os anticorpos produzidos em coelho revelaram proteínas diferentes daquelas produzidas em bovinos, somente na sua intensidade de coloração, pois as frações protéicas de 39 kDa reveladas no soro de coelho também podem ser visualizadas no soro de bovinos, mas com muito menos intensidade. Por sua vez, as frações protéicas de 26 kDa reveladas no soro de bovino, podem também ser visualizadas no soro de coelho, mas com menor intensidade. Apenas a fração protéica de 18 kDa, visualizada no soro de bovinos, não foi encontrada no soro de coelhos.

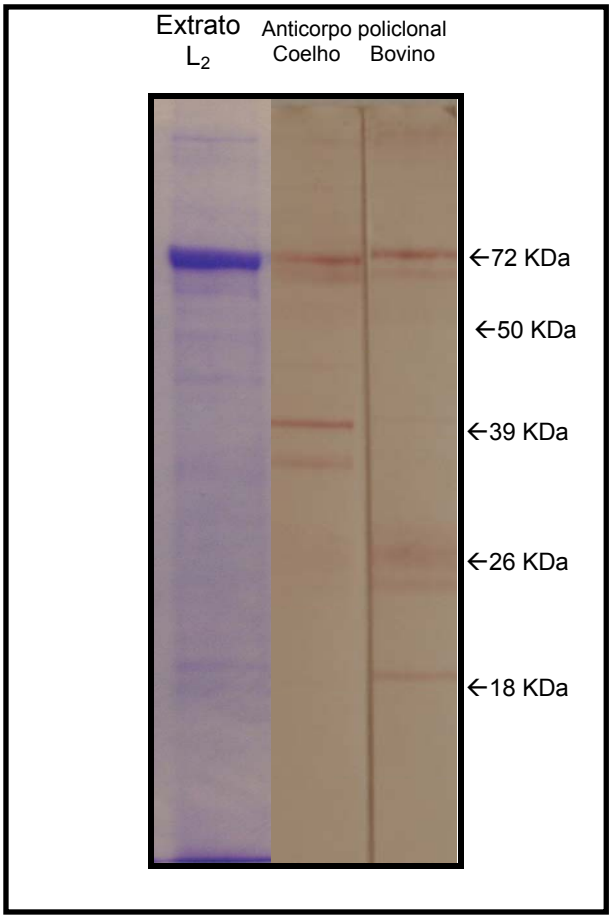


FIGURA 02: Corrida eletroforética do extrato de larvas L_2 de *D. hominis* em gel de poliacrilamida 12%, corado pelo Coomassie e sua imunoeletrotransferência para membrana de nitro celulose, frente a anticorpos policlonais contra larvas L_2, produzidos em coelho e bovino, identificadas por reação de imunoperoxidase, com o cromógeno diaminoetilcarbazole.

A imunodetecção de anticorpos de coelho e bovinos no extrato de larva L_3 revelou algumas frações antigênicas, com intensidade proeminente na banda de 50 kDa, para ambos os soros e com menor intensidade na banda de 26 kDa,

principalmente no soro de coelho. Apenas no soro de coelho foi possível identificar uma fração protéica de 18 kDa (FIGURA 03).

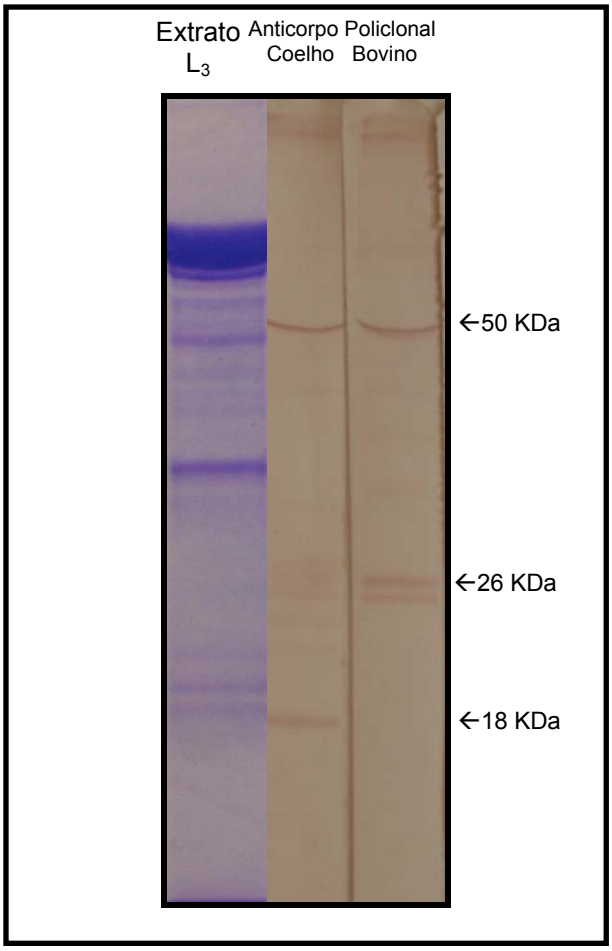


FIGURA 03: Corrida eletroforética do extrato de larvas L_3 de *D. hominis* em gel de poliacrilamida 12%, corado pelo Coomassie e sua imunoeletrotransferência para membrana de nitro celulose, frente a anticorpos policlonais contra larvas L_3, produzidos em coelho e bovino, identificadas por reação de imunoperoxidase, com o cromógeno diaminoetilcarbazole.

Como as larvas de segundo e terceiro estádio são mais facilmente encontradas no hospedeiro, um extrato com a mistura dessas larvas, na mesma proporção, também foi preparado e a imunodetecção com os anticorpos policlonais de coelho e bovino mostrou uma fração protéica de 50 kDa (FIGURA 04)

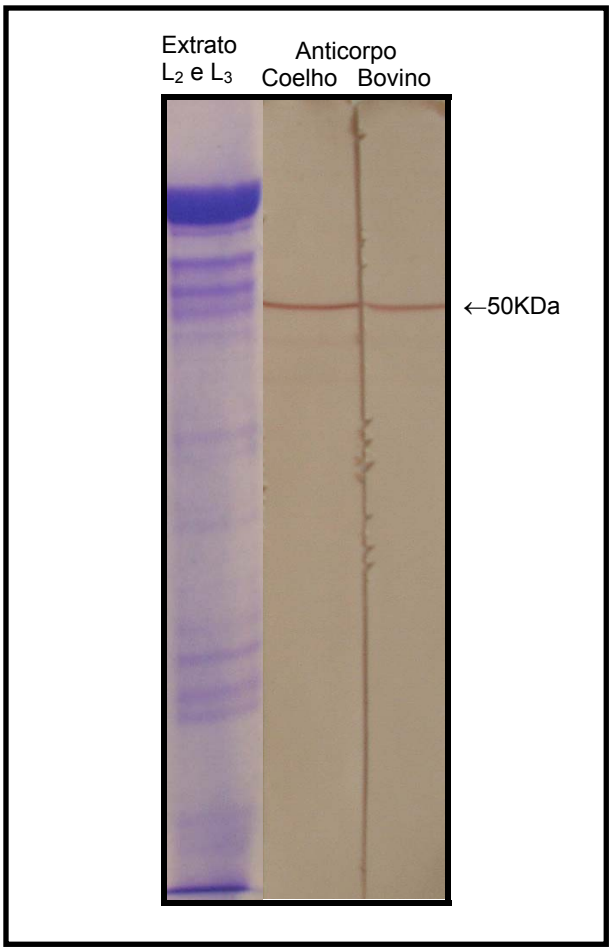


FIGURA 04: Corrida eletroforética do extrato de larvas L_2 e L_3 de *D. hominis* em gel de poliacrilamida 12%, corado pelo Coomassie e sua imunoeletrotransferência para membrana de nitro celulose, com anticorpos policlonais contra larvas L_2 e L_3, produzidos em coelho e bovino, identificadas por reação de imunoperoxidase, com o cromógeno diaminoetilcarbazole.

3.2. PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA ANTIGÊNICA POR IMUNOPRECIPITAÇÃO

Após a realização da reação antígeno/anticorpo verificou-se que nos diferentes estádios larvais havia uma proteína de 50 kDa que se ligava ao anticorpo. Esta passou a ser denominada Dh50 e a ser a proteína alvo para ser purificada e seqüenciada. Para realizar a separação foi usada a técnica de imunoprecipitação e os anticorpos policlonais produzidos pelos animais imunizados com o extrato de larvas foram usados para se ligar à proteína A, reconhecendo o antígeno específico (FIGURA 05).

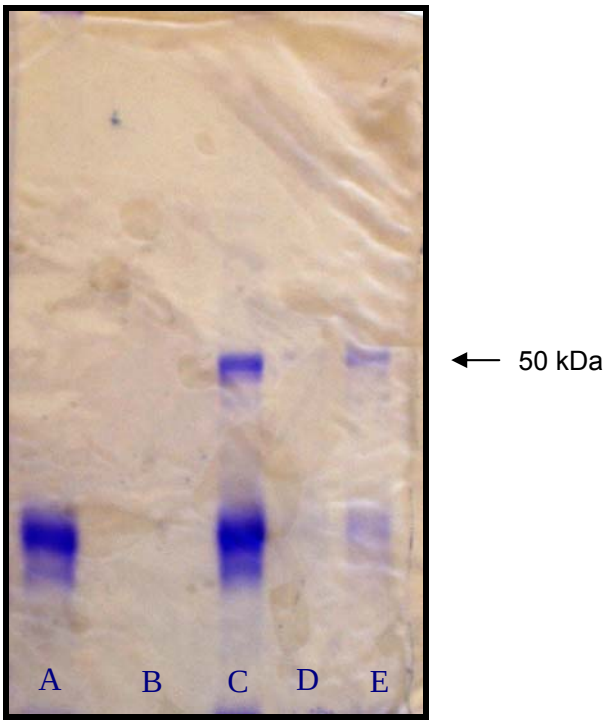


FIGURA 05: SDS-PAGE da imunoprecipitação do extrato de larvas L_3 de *D. hominis*, corado pelo Coomassie, onde são observadas as "*lines*": (A)- soro hiperimune e prot A; (B)- antígeno e prot A; (C)- antígeno, prot A e soro imune; (D)- *pellet* do clareamento; (E)- sobrenadante após clareamento.

A proteína antigênica do extrato de larvas, imunoprecipitada, foi analisada pela imunodetecção (Western Blotting – descrito no item 2.2). As amostras apresentaram imunorreatividade para o extrato tanto para o soro de coelhos, como para os bovinos imunizados.

Na técnica de imunoeletrotransferência, foram realizados vários ensaios usando anticorpos, contra as proteínas de *D. hominis*, combinando o soro de coelho, como anticorpo primário, revelando a membrana com soro (anticorpo) de bovino, a fim de verificar imunorreatividade (FIGURA 06).

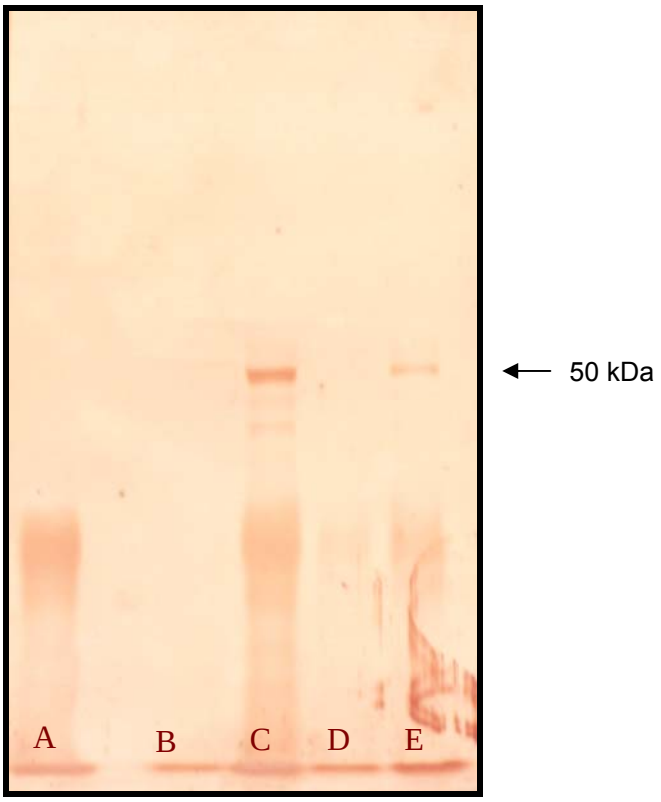


FIGURA 06: Eletrotransferência do extrato de larvas L_3 de *D. hominis*, corada pela diaminaetilcarbazole, onde foram usados como anticorpo primário, o soro de coelho, o anticorpo secundário, soro de bovino e o imunoprecipitado com soro de coelho. As "*lines*" são as mesmas da figura 05.

3.3. ESPECTROMETRIA DE MASSA DA PROTEÍNA Dh50

Confirmada a imunorreatividade a banda de 50 kDa foi removida e os peptídeos tripsinisados foram submetidos à espectrometria de massa. Em condições experimentais específicas as moléculas se ionizam e vaporizam e os íons de valores variados de massa/carga (m/z) são separados e detectados (SHEVCHENKO *et al*., 1996). O conjunto de valores m/z possibilitou a determinação da massa molar do peptídeo em estudo, através de sua fragmentação e registro gráfico (FIGURA 07).

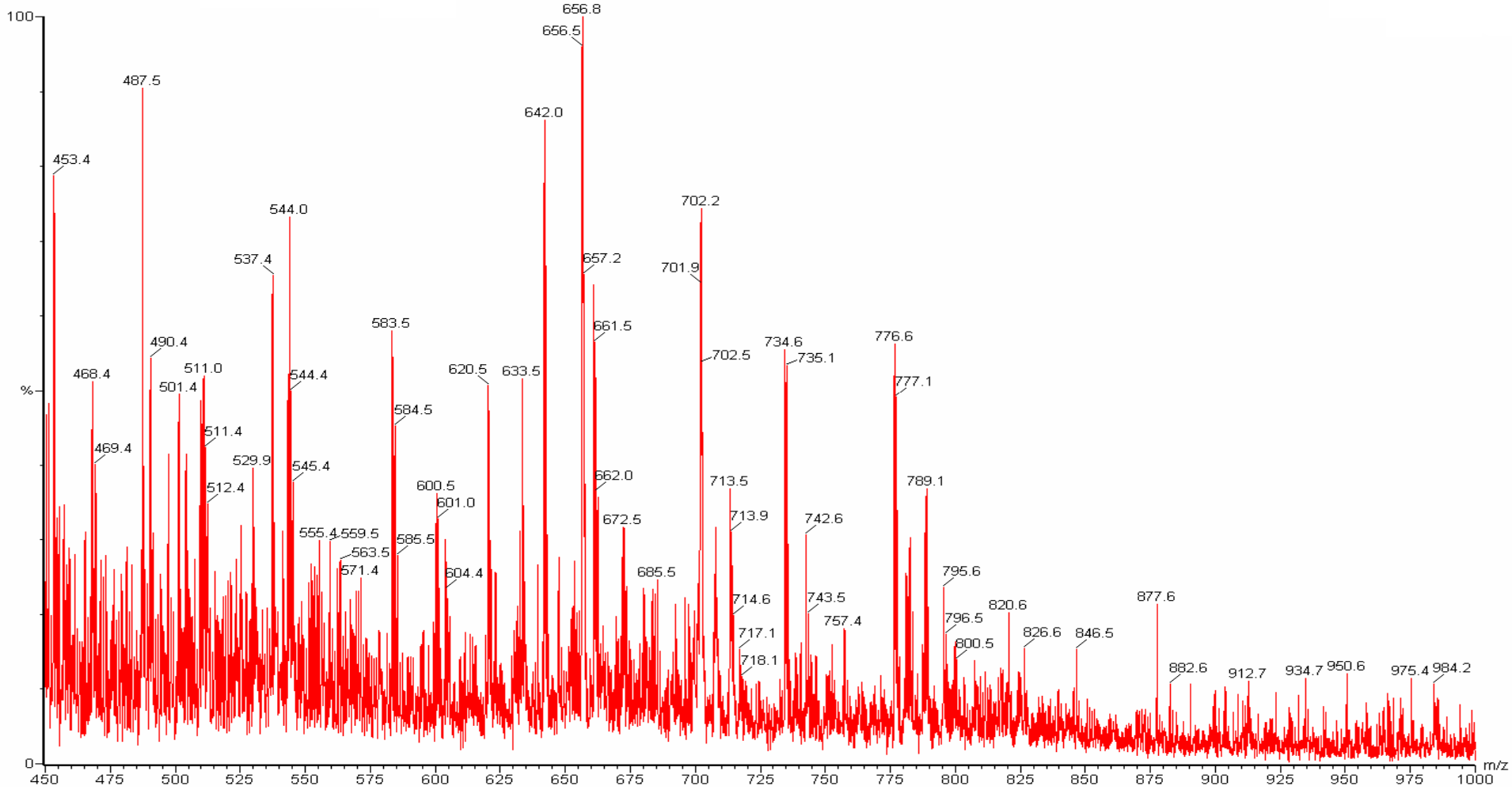


Figura 07: Mapeamento dos peptídeos tripsínicos de proteína antigênica Dh50, obtida de extrato de larvas L_3 de *Dermatobia hominis*, através da espectrometria de massa CDI-MS/MS.

As seqüências de aminoácidos deduzidas a partir dos espectros de massas estão indicadas do N-terminal para o C-terminal, onde o C-terminal será lisina ou arginina, pois são peptídeos obtidos pelo tratamento com tripsina.

As seqüências geradas foram interpretadas a partir dos espectros de fragmentação (CID-MS/MS) do tipo y e b em concordância com a massa molecular determinada para cada um dos respectivos íons peptídicos detectados. O ion m/z 743, de acordo com o espectro de massa, pode ser deduzido em duas seqüências FFWDK ou FFWSR, as seqüências obtidas estão na TABELA 01. O mapeamento de todos os peptídeos encontra-se no ANEXO 14.

TABELA 01: SEQÜÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS OBTIDOS PELA FRAGMENTAÇÃO DOS ÍONS PEPTÍDEOS DO EXTRATO DE LARVAS DE TERCEIRO ESTÁDIO DE *D. hominis*, GERADOS POR CID-MS/MS.

Seqüência de Aminoácidos	Íon m/z	Massa molecular
N M Y R	584	582,6
F F W D K	743	741,8
F F W S R	743	741,8
Y L D L F A C L K	543	1085,3
F I F Y Y F Q H R	661	1320,5
W F F Q L V D T H F K	735	1467,6
D L D P L F F N N T E V K	777	1551,7
F V D E S P F G Y P F D R	789	1575,6

As seqüências obtidas foram submetidas aos bancos de dados para confronto com as seqüências depositadas nestes bancos (NCBI e Swiss-Prot).

Após ter sido comparada com as diferentes seqüências de proteínas depositadas, não foi encontrada nenhuma similaridade com uma proteína já descrita.

4. DISCUSSÃO

Há poucos relatos sobre a resposta imunológica às miíases cutâneas, diferente daquelas produzidas pela infestação de *L. cuprina*. No entanto, o aumento de células de defesa ao redor de lesões cutâneas encontrado em infestações de *Dermatobia hominis*, *Coclhiomya hominivorax* e *W magnífica*, sugere um papel importante anticorpo dependente (OTRANTO, 2001; PINTO *et al*., 2003).

Em estudos com outros dípteros, cujas larvas produzem miíases, verificou-se que o seu estabelecimento nos tecidos do hospedeiro é facilitado pela produção de enzimas digestivas que são secretadas e/ou excretadas. Desta forma, estas enzimas passaram a ser vistas como um elemento chave para o estabelecimento e sobrevivência larval uma vez que são responsáveis pela digestão extra-corpórea de proteínas integrais dos tecidos, auxiliando no estabelecimento e na nutrição das larvas (MUHARSINI *et al*., 2000).

Na bibliografia consultada não foi encontrado nenhum trabalho que fizesse uma comparação entre os extratos obtidos com os diferentes estádios larvais de *D. hominis* (L_1, L_2 e L_3). MOTA *et al.* (1980), observaram uma única fração protéica, na eletroforese de extrato preparado com larvas L_2 e L_3 de *D. hominis*. A técnica foi realizada com gel inoágar nº 2, a 1%. BRANT (2004), caracterizou os produtos de excreção/secreção de larvas de primeiro, segundo e terceiro estádios, bem como a atividade proteolítica desses produtos em cada estádio do desenvolvimento larval e encontrou frações protéicas distintas para os três estádios larvais e uma banda de proteína comum a todos os estadios de 62 kDa, muito embora, tenha trabalhado com antígenos de secreção/excreção, e não com as larvas inteiras.

No presente estudo foram observados componentes antigênicos dos extratos obtidos de cada estádio larval de *D. hominis* (L_1, L_2,L_3 e mistura de L_2 e L_3) que apresentaram similaridade nas frações protéicas dos extratos nas bandas de 50 kDa. Algumas diferenças observadas entre os extratos sugerem diferenças na composição protéicas entre os estádios de larvas ou mesmo a ação de proteases que estariam inibindo determinadas proteínas durante o desenvolvimento larval ou ainda componentes antigênicos liberados durante o crescimento, muda, maturação, alimentação e excreção das larvas. Pequenas variações nas condições eletroforéticas (± 1 kDa) entre os extratos foram atribuídas a técnica e desconsideradas na avaliação pelo “software” Gel Pro Analyzer.

A reação dos componentes protéicos dos antígenos de *D. hominis* testados com os anticorpos dos soros imunes de coelhos e bovinos seguiu o reconhecimento pela imunoeletrotransferência (*Western blotting*). A imunodetecção para o extrato de larvas L_1 não revelou frações antigênicas para os soros de coelhos ou bovinos. Este resultado corrobora com os apresentados, quando foi avaliada a cinética de anticorpos de cada estádio larval através do ELISA (Capítulo I). Houve produção de anticorpos em níveis crescentes e com regressão linear de acordo com o número de aplicações recebidas do imunógeno, mas sem elevar o título do mesmo, a ponto de desencadear uma resposta imune satisfatória. Esse fato também foi observado em ovelhas imunizadas contra *L. cuprina* (GINGRICH, 1982; BARON e WEINTRAUB, 1987). Os autores demonstraram que as larvas causadoras de miíases, produzem três enzimas digestivas, que são secretadas nos tecidos adjacentes à sua localização, para digestão extracorpórea. Estas proteases mostraram-se imunogênicas, pela produção de anticorpos específicos no hospedeiro. No entanto, anticorpos produzidos, frente à infestação de larvas de primeiro estádio, não inibiram esta atividade enzimática. Este fato demonstra que larvas de primeiro estádio não são boas candidatas ao preparo de antígenos.

TELLAM *et al*. (1994) purificaram duas quimiotripsinas a partir de produtos de excreção/secreção de larvas de primeiro estádio de *L. cuprina* e verificaram que, embora essas proteases induzissem a uma significativa produção de anticorpos, essa resposta não foi capaz de prevenir a infestação dos animais imunizados. Além disso, verificaram que o soro dos animais vacinados não teve atividade sobre as larvas nos ensaios “in vitro”, concluindo que essas proteases não são candidatas viáveis para a produção de vacinas.

O extrato de larvas de segundo estádio possibilitou o reconhecimento de algumas bandas protéicas na imunotransferência contra os soros de coelho e bovinos. A diferença observada na formação de bandas reveladas entre os soros pode ser caracterizada apenas pela quantidade de anticorpos formados, uma vez que a similaridade das bandas é praticamente a mesma (72; 50; 39; 26 e 18 kDa). Apenas a banda de 18 kDa foi revelada no soro hiperimune de bovinos. Pequenas diferenças nas frações protéicas, reveladas pela imunodetecção como extrato de larvas de segundo estádio, para o soro de coelhos e bovinos, podem ser identificadas pela intensidade de coloração das bandas, o que sugere menor título de anticorpos. Já a fração protéica de 18 kDa, visualizada apenas no soro de

bovinos, pode ser atribuída a reação cruzada, ou até mesmo a proteases produzidas durante este estádio larval.

PIRES, *et al*. (2007), ao estudarem as serino-proteinases presentes dos extratos de larvas L_2 e L_3 de *D. hominis* verificaram similaridade para bandas protéicas de aproximadamente 13 e 20 kDa para os dois extratos e a atividade desta enzima inibida por proteínas de 30 kDa para os extratos de larvas L_3 e 50 kDa para o extrato de L_2.

INNOCENTI *et al*. (1995) verificaram que os polipeptídeos presentes nas glândulas salivares de *Oestrus ovis* constituem a principal fonte de imunógenos para ovinos infestados. Posteriormente, TABOURET *et al.* (2001) demonstraram que os produtos de excreção/secreção liberados pelas larvas de *O. ovis* são produzidos no tubo digestivo e glândulas salivares e que a principal fração antigênica está presente nas glândulas salivares de larvas, sendo constituída por um complexo protéico de 18 kDa. A caracterização dos produtos de excreção/secreção dessas larvas revelou que a maioria das enzimas são proteases do grupo serina secretadas no tubo digestivo de larvas. Além de estarem envolvidas na atividade trófica das larvas, estas proteases foram relacionadas à evasão da resposta imune (TAUBORET *et al.*, 2003).

Proteases do tipo tripsina também predominam nos produtos de secreção/excreção de larvas de *Chrysomya bezziana* (MUHARSINI *et al*., 2000). De acordo com esses autores, além de estarem envolvidas no desenvolvimento das lesões nos tecido dos animais, algumas podem construir potenciais alvos para o desenvolvimento de vacinas, pois quando utilizadas como imunógenos produziram redução do crescimento larval em ovinos.

Na imunodetecção de anticorpos de coelho e bovino, o extrato de larvas L_3, no presente experimento, revelou algumas frações antigênicas, com intensidade proeminente na banda de 50 kDa, para ambos os soros e com menor intensidade na banda de 26 kDa, principalmente no soro de coelho. Apenas no soro de coelho foi possível identificar uma fração protéica de 18 kDa. Essa proteína poderia ser a mesma identificada em extrato larval de *O. ovis*, encontrada por TABOURET *et al*. (2001), devido a proximidade filogenética entre as duas espécies.

Neste trabalho a imunoeletrotransferência no extrato de larvas L_3 revelou um menor número de frações antigênicas (50, 26 e 18 kDa), que os demais extratos,

porém com maior intensidade, principalmente na banda de 50 kDa, que foi revelada pela eletrotransferência em todos os estádios larvares.

O destaque de intensidade da formação da banda, pode estar relacionado com uma maior produção de anticorpos pelos hospedeiros, como já foi comprovado pelo teste ELISA nos animais imunizados (Capítulo I), além da maior atividade metabólica da larva de terceiro estádio, que está relacionada à intensidade de crescimento da larva, como sugerem TAUBORET *et al.*, (2003) ao analisarem serino-proteases de *Oestrus ovis*.

A mistura de extrato de larvas L_2 e L_3 apresentou uma única fração antigênica, com aproximadamente 50 kDa, de intensidade bastante evidente, o que revelaria um título alto de anticorpos. O não aparecimento de bandas protéicas similares na imunodetecção do extrato de larvas L_2 ou L_3 provavelmente está relacionado a presença de substâncias inibidoras para algum tipo de proteína. A mistura de extratos L_2 e L_3 apresentou o mesmo comportamento que o antígeno preparado apenas com larvas L_3, muito embora com um título mais baixo de anticorpos, como já descrito no capítulo I deste trabalho, quando avaliados pelo teste ELISA.

COLDITZ *et al*, (2002) estudaram a produção de anticorpos em ovelhas imunizadas com antígeno recombinante obtido a partir de células da membrana do intestino de larvas L_3 de *Lucilia cuprina*. Muitos trabalhos estudando a resposta imune de hospedeiros frente às infestações provocadas por larvas produtoras de miíases têm sido realizados e concluem que larvas de terceiro estádio desenvolvem melhor resposta antigênica que os demais estádios, este fato poderia justificar a sua expulsão do hospedeiro.

Antígenos obtidos de células intestinais de larvas de terceiro estadio de *L. cuprina* foram detectados através do *Western blotting* com anticorpos produzidos em ovinos. Esses anticorpos produziram uma diminuição de 85% na infestação de ovinos imunizados em relação ao grupo controle (BOWLES *et al.,* 1996). Em estudos realizados com infestações pela *Hypoderma* spp, em bovinos, foram isoladas algumas proteínas de secreção e excreção de larvas L_3, as quais deram origem a antígenos denominados Hipoderminas. A caracterização bioquímica das hipoderminas abriu uma nova era na pesquisa de vacinas, embora o papel protetor de vacinas contra *Hypoderma* spp seja controverso (BARON e COLWELL, 1991; CHABAUDIE *et al*., 1992; TELLAM e BOWLES, 1997). Larvas de terceiro estádio

foram testadas para a produção de anticorpos contra as mesmas enzimas digestivas (hipoderminas) e demonstraram uma eficiência de resposta de 88,5% em relação ao grupo controle. Esta enzima, denominada hipodermina A, foi então escolhida como imunógeno, e clonada para produção de vacina recombinante (PRUETT, 1999).

A utilização da massa molecular de peptídeos gerados por espectrometria de massa para identificação de proteínas é bastante difundida (HENZEL *et al.*, 1989). Para serem traduzidos em informação biológica, os espectros de íons de peptídeos são confrontados com seqüências depositadas em bancos de dados com o auxílio de *softwares* específicos, que geram listas de proteínas com diferentes graus de homologia com o dado experimental (RUSSELL *et al*., 2004). Esses bancos de dados são formados a partir do depósito de seqüências descobertas nas pesquisas dos vários projetos genoma. Esta é a maior dificuldade para identificar as seqüências obtidas, uma vez que o genoma da *D. hominis* ainda não está descrito. Devido à existência de grandes regiões do DNA não codificarem genes, tem sido utilizada a alternativa de seqüenciar apenas as regiões codificadoras, dando origem aos bancos de etiquetas de seqüências expressas (ESTs) ou de genomas expressos (LIPPERT *et al*., 2005)

Os recentes avanços em imunologia e biotecnologia têm estimulado muito a investigação sobre o controle de doenças parasitárias através da vacinação. A vacinação com uma proteína de *Hypoderma* spp, clonada, produziu 90% de proteção contra infestações subseqüentes (BARRIGA, 2002). Deste modo espera-se conseguir resultados semelhantes com a *D. hominis*, uma vez que estes ectoparasitos pertencem a mesma família e possuem características etiopatogênicas bastante semelhantes e não são conhecidos os seus genomas.

5. CONCLUSÕES

- A fração protéica do extrato de larvas de *D. hominis*, reconhecidamente antigênica pelo soro de bovinos tem a massa molecular de 50 kDa;

- A espectrometria de massa dessa proteína gerou o seqüenciamento de sete polipeptídeos;

- A proteína aqui identificada, Dh50 não apresentou similaridade e homologia com as seqüências já depositadas em bancos de dados (NCBI e Swiss-Prot).

6. REFERÊNCIAS

ALVES, S. B. Patologia e controle microbiano: vantagens e desvantagens. In: **Controle microbiano de insetos**. 2.ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. p.21-37

BARON, R. W.; WEINTRAUB, J. Lymphocyte responsiveness in catele previously infested and unifested with *Hypoderma lineatum* and *H. Boris* (L.) (Diptera:Oestridae). **Veterinary Parasitology**, Madison, v. 24, p. 285-296, 1987.

BARON, R. W.; COLWELL, D.D. Enhanced resistence to catle grup infestation (*Hypoderma lineatum*, de Vill) in calves immunized with purified hypodermin A, B and C plus monophosphoril lipid A (MPL). **Veterinary Parasitology**, Madison, v. 38, p. 185-197, 1991.

BARRIGA, O. O. A review on vaccination against protozoa and arthropods of veterinary importance**. Veterinary Parasitology**, Madison, v. 55, n. 1, p.29-55, 2002.

BARROS, N. M. Utilização do fungo Nomuraea rileyi para o controle da lagarta da soja. In: MEDEIROS, L.; ARAÚJO, M. C. G. P.; COELHO, G. C. (Org.). **Interações Ecológicas & Biodiversidade**. Ijuí: Unijuí, 1996. p.225-233.

BOWLES, V. M.; FEEHAN, J.P., SANDEMAN, R.M. Sheep plasma protease inhibitors influencing protease activity and growth of *Lucilia cuprina* larvae in vitro. **International Journal for Parasitology**, Amsterdam, v. 20, p. 169-74, 1996.

BRANT, M. P. R. C. **Análise Bioquímica dos Produtos de Excreção/secreção de Larvas de *Dermatobia hominis***. Botucatu, 2004. 69 f. Dissertação (Mestrado em Ciencias Veterinárias) – Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

CHABAUDIE, N.; BOULARD, C. Effect of hypodermin A, an enzyme secreted by *Hypoderma lineatum* (Insect Oestridae) on the bovine immune system. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Shannon, v. 31, p. 167-177, 1992.

COLDITZ, I. G.; WATSON, D. L.; EISEMANN, C. H; TELLAM, R. L. Production of antibodies to recombinant antigens from *Lucilia cuprina* following cutaneous immunization of sheep. **Veterinary Parasitology**, Madison, v. 104, n. 4, p.345-350, 2002.

FERNANDES, N. L. M.; THOMAZ-SOCCOL, V.; PINTO, S. B.; MINOZZO, J. C.; OLIVEIRA, C. A. L. Resposta imune-humoral e celular em bovinos da raça Nelore imunizados com extrato de larvas (L2 e L3) de *Dermatobia hominis* (Linnaeus Jr., 1781). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 3, p. 789-795, 2007.

FUJIWARA, R. T.; BETHONY, J.; BUENO, L. L.; WANG, Y.; AHN, S. Y.; SAMUEL, A.; BOTTAZZI, M. E.; HOTEZ, P.; MENDEZ, S. Immunogenicity of the hookworm Na-ASP-2 vaccine candidate: characterization of humoral and cellular responses after vaccination in the Sprague Dawley rat. Hum. **Vaccine**, Guildford, v. 1, p. 123-8, 2005.

GINGRICH, R. E. Acquired resistente to *Hypoderma lineatum*: comparative immune response of resistant and susceptible cattle**. Veterinary Parasitology**, Madison, v. 9, p. 233-242, 1982.

HENZEL, W. J.; STULTS, J. T.; WATANABE, C. **Proceedings of the Third Symposium of the Protein Society**, Seatle, WA, 1989.

HERRERA, S.; CORRADIN, G.; AREVALO-HERRERA, M. An update on the search for a *Plasmodium vivax* vaccine. **Trends in Parasitology**, London, v. 23, p. 122–28, 2007.

INNOCENTI, L.; MASETTI, M.; MACHHIONI, F.; GIORGI, F. Larval salivary gland proteins of the sheep nasal bot fly, (*Oestrus ovis* L.), are major immunogens in infested sheep. **Veterinary Parasitology**, Madison, v. 60, p.273-82, 1995.

LELLO, E.; PERAÇOLI, M.T.S.; OLIVEIRA-SEQUEIRA, T. C. G. Inflammatory response in *Dermatobia hominis* infested rabbits. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 8, p. 287-291, 1999.

LIPPERT, D.; ZHUANG, J.; RALPH, S.; ELLIS, D.E.; GILBERT, M.; OLAFSON, R.; RITLAND, K.; ELLIS, B.; DOUGLAS, C. J.; BOHLMANN, J. Proteome analysis of early somatic embryogenesis in *Picea glauca*. **Proteomics**, New York, v. 5, p. 461-73, 2005.

LIRIA, C. W.; MIRANDA, M. T. M. Análise, purificação e quantificação de peptídeos. In Pessoa Jr., A & Kilikian, B.V. (Eds.), **Purificação de Produtos Biotecnológicos**, Editora Manole, São Paulo, cap. 21, 2005, p. 411-427.

MINOZZO, J. C. **Imunoeletrotransferência e Enzimoimunoensaio como Ferramentas para o Imunodiagnóstico da Neurocisticercose**. Curitiba, 2003. 114 f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

MOSCARDI, F.; SOUZA, M. L. Baculovírus para o controle de pragas. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v.24. p.22-29, 2002.

MOTA, N. G. S.; PERAÇOLI, M. T. S.; LELLO, E. Anticorpos circulantes em coelhos imunizados com antígenos obtidos de larvas de *Dermatobia hominis* Lin. (Díptera: Cuterebridae). **Ciência e Cultura**. São Paulo**,** v. 32, n. 4, p. 453-457, 1980.

MUHARSINI, S.; SUKARSIH, R. G.; PARTOUTOMO, S.; HAMILTON, S.; WILLADSEN, P.; WIJFFELS, G. Identifcation and characterisation of the excreted serine protease of larvae of the Old World Srewworm Fly, *Chrysomya bezziana*. **International Journal for Parasitology**, Amsterdam, v.30, p. 705-14, 2000.

MUHARSINI, S.; DALRYMPLE, B.; VUOCOLOT, T.; HAMILTON, S.; WILLADSEN, P.; WIJFFELS, G. Biochemical and molecular characterization of serine proteases from larvae of *Chrysomya bezziana*, the old world screwworm fly. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Amsterdam, v. 11, p.1029-40, 2001.

NCBI, National Center for Biotechnology Information, Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi, acessado em: 12 de agosto de 2007.

NIERE, M; MEIBLITZER; DETTLOFF, M; WEISE, C; ZIEGLER, M; WIESNER, A. Insect immune activation by recombinant *Galleria mellonella* apolopophorin III. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.1433. p.16- 26, 1999.

OTRANTO, D.; TARSITANO, E.; GIANGASPERO, A.; PUCCINI, V. Differentiation by polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism of some Oestridae larvae. **Veterinary Parasitology**, Madison, v. 90, n. 4, p.305-313, 2000.

OTRANTO, D.The immunology of myiasis: parasite survival and host defense strategies. **TRENDS in Parasitology**, London, v.17,n.4, p. 176-182, 2001.

OTRANTO D.; STEVENS J. R. Molecular approaches to the study of myiasis-causing larvae. **International Journal for Parasitology**, Amsterdam, v. 32, n.11, p. 1345-1360. 2002.

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**, Madison, v. 145, n. 3-4, p.326-331, 2007.

PINTO, S. B.; THOMAZ-SOCCOL, V.; MINOZZO, J. C.; ZABOTT, M. V.; VENDRUSCOLO, E. G.; ROCHADELLI, R.; FREITAG, A.; GUETNER, C. Resposta imune humoral de coelhos frente a extratos de larvas de *Dermatobia hominis*. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v. 8, n. 2, p. 19 - 25, 2003.

PRUETT, J. H.; JRAND KUNZ, S. E. Development of resistente to *Hypoderma lineatum* (Diptera: Oestridae) within cattle herd. **Journal of Medical Entomology**, Columbia, v. 33, p. 49-52, 1996.

PRUETT, J. H. Immunological control of arthropod ectoparasites—a review **International Journal for Parasitology**, Amsterdam, v. 29, n.1, p.25-32, 1999

PRUETT, J. H.; STEELMAN, C. D.; MILLER, J. A.; POUND, J. M.; GEORGE, J. E. Distribution of horn flies on individual cows as a percentage of the total horn fly population. **Veterinary Parasitology**, Madison, v. 116, n. 3, p. 251-8, 2003.

RUSSEL, S. A.; OLD, W.; RESING, K. A.; HUNTER, L. Proteomic informatics. **International Review of Neurobiology**, Oxford, v. 61, p. 134-45, 2004.

SHEVCHENKO, A., WILM, M., VORM, O. E MANN, M. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 68, p. 850-8, 1996.

SILVA, C. C. Aspectos do sistema imunológico dos insetos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v.24, p.68-72, 2002.

SILVA, M. T. B. Controle da lagarta da soja (*Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818. Lepidoptera: Noctuidae), 4.controle biológico natural. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.23, n.2, p.127-132, 1993.

SOSA-GÓMEZ, D. R.; PEREIRA, R. M.; ALVES, S. B. Environmental impact of entomopathogens: impacto ambiental de entomopatógenos. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. 2.ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. p.1075-1095.

STEVENS, J. R.; WALLMAN, J. F.; OTRANTO, D.; WALL, R.; PAPE, T. The evolution of myiasis in humans and other animals in the Old and New Worlds (part II): biological and life-history studies. **Trends in Parasitoloy**, London, v.22, n. 4, p. 181-88, 2006.

SWISS-PROT. Disponível em: http://www.prospector.ucsf.edu/ e em: http:// www.matrixscience.com/search_form_select.html. Acessado em: 12 de agosto de 2007.

TAUBORET, G.; PREVOT, F.; BERGEAUD, J.P.; DORCHIES, P.; JACQUIET, P. H. *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae) sheep humoral immune response to purified excreted/secreted salivary gland 18 kDa antigen complex from second and third instar larvae. **Veterinary Parasitology**, Madison, v. 101, p. 53-66, 2001.

TABOURET, G.; BRET-BENNIS, A.; DORCHIES, P.; JACQUIET, P.H. Serine protease activity in excretory-secretory products of *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae) larvae. **Veterinary Parasitology**, Madison, v. 114, p. 305-14, 2003.

TELLAM, R. L.; EISMANN, C. H.; PEARSON, R.D. Vaccination of sheep with purified serine porteases from the secretory and excretory material of *Lucilia cuprina*. **International Journal for Parasitology**, Amsterdam, v. 24, p. 757-64, 1994.

TELLAM, R. L.; BOWLES, V. M. Control of blowfly strike in sheep: Current strategies and future prospects**. International Journal for Parasitology**, Amsterdam, v.27, n. 3, p.261-273, 1997.

WILLADSEN, P. Novel vaccines for ectoparasites. **Veterinary Parasitology**, Madison, v. 71, p. 209-222, 1997.

WILLOTT, E.; TRENCZEK, T.; THROWER, L.; KANOST, M. R. Immunochemical identification of insect populations monoclonal antibodies distinguish four major hemocyte types in *Manduca sexta*. **European Journal of Cell Biology**, Stuttgart, v, v.65, p.417-423, 1994.

CAPÍTULO III

IMUNOHISTOQUÍMICA EM LARVAS DE TERCEIRO ESTADIO DE *Dermatobia hominis* (Linnaeus Jr., 1781)

IMUNOHISTOQUÍMICA EM LARVAS DE TERCEIRO ESTADIO DE *Dermatobia hominis* (Linnaeus Jr., 1781)

Resumo: O presente trabalho tem por objetivo a caracterizar as reações antígeno/anticorpo nas larvas de *D. hominis* através da identificação e localização de proteínas antigênicas nos tecidos larvais. Para atingir os objetivos propostos foi usado como ferramenta o método imunohistoquímico. A avaliação dos cortes histológicos foi baseada no sistema Avidina-Biotina-Peroxidase, utilizando-se soros policlonais produzidos em coelhos e bovinos. A reatividade histoquímica evidenciada pela reação antígeno/anticorpo pode ser observada em toda a extensão das larvas L_2 e L_3 de *D. hominis*, evidenciando que os anticorpos produzidos por animais vacinados têm total acesso aos epítopos no tecido larval. A utilização de anticorpos policlonais contra *D. hominis* de bovinos e de coelhos produziu o mesmo padrão de resposta imunohistoquímico.

Palavras-chave: imunohistoquímico, avidina-biotina-peroxidase, anticorpos policlonais, *Dermatobia hominis*.

IMMUNOHISTOCHEMISTRY IN LARVAES OF *Dermatobia hominis* (Linnaeus Jr., 1781)

Abstrat: The goal of the current study was to characterize antigen-antibody reactions in *D. hominis* larvaes through identification and localization of antigenic proteins in larval tissues by means of immunohistochemistry technique. The evaluation of histological sections was based on avidin-biotin peroxidase system utilizing polyclonal antibodies produced in rabbits and bovines. Immunohistochemical reactivity was observed in the whole body extension of *D. hominis* L_2 and L_3 larvaes; this was indicative that antibodies produced by vaccinated animals had total access to epitopes in larval tissues. Furthermore, utilization of rabbit and bovine polyclonal antibodies against *D. hominis* had similar pattern of immunohistochemical response.

Key words: immunohistochemistry, avidin-biotin peroxidase, polyclonal antibodies, *Dermatobia hominis*.

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, vários trabalhos têm sido desenvolvidos com o objetivo de conhecer melhor os mecanismos de ação da *Dermatobia hominis*, enfocando principalmente as alterações do tecido cutâneo dos hospedeiros frente ao parasitismo (PEÇAROLLI *et al*., 1980; SANAVRIA *et al*., 1987; OLIVEIRA-SEQUEIRA *et al*., 1996; LELLO *et al*., 1999; PINTO *et al*., 2003 e FERNANDES, 2004). Algumas miíases como as causadas por califorídeos e sarcofagídeos podem provocar lesões com intensa destruição tecidual, outras, no entanto, se desenvolvem em ferimentos cutâneos ou penetram pela pele do hospedeiro desenvolvendo-se na derme e em camadas mais profundas do tecido cutâneo.

Devido a este mecanismo de ação das larvas, o organismo do hospedeiro desenvolve resposta imune à agressão. A intensidade ou efetividade desta resposta está diretamente ligada à extensão da lesão ou ao período de permanência da larva no hospedeiro (PRUETT, 1999). OTRANTO e STEVENS (2002) verificaram que a resposta do hospedeiro frente à infestação de larvas produtoras de miíases depende do estado de saúde do hospedeiro, da biologia da larva, do local parasitado, da natureza da larva e dos mecanismos de defesa específicos contra a larva.

As larvas permanecem por algum período no hospedeiro alimentando-se continuamente dos fluídos teciduais, células e microorganismos presentes na área ao redor da inflamação (LEITE, 1988). Ao mesmo tempo, estas larvas podem liberar na lesão, antígenos de secreção ou excreção, indicando que estudos detalhados do trato digestório dessas larvas poderiam contribuir para o melhor entendimento da relação destas substâncias com os mecanismos de defesa do hospedeiro.

Poucos são os trabalhos que descrevem a anatomia interna de *D. hominis*. REIS *et al*. (1994) compararam o trato digestório de espécimes adultos desta espécie, com as moscas adultas de *Cochliomya hominivorax* e detectaram semelhanças, porém puderam constatar que as *D. hominis* não apresentam glândulas salivares e papo, o que pode explicar porque os adultos desta espécie não se alimentam. As microvilosidades do intestino de *D. hominis* são pouco freqüentes nas larvas L_1, aumentando nos estádios subseqüentes, muito provavelmente associadas a menor atividade celular exigidas nesta fase de desenvolvimento (EVANGELISTA e LEITE, 2005). A membrana peritrófica também ainda não é formada no estádio de L_1, estando bastante desenvolvida no estádio de L_3, o que

favorece os mecanismos de defesa das larvas contra a resposta inata dos hospedeiros. Este mecanismo de defesa não é apresentado pela *Hypoderma bovis*, que não possui membrana peritrófica nos três estádios larvares (COLWELL e LEGGETT, 2004).

As glândulas salivares de larvas de *D. hominis* têm morfologia anatômica tubular, semelhante à encontrada em insetos hematófagos, diferentemente das glândulas salivares de outros dípteros da mesma família, que apresentam anatomia globular das glândulas. Esta diferença anatômica está relacionada com a capacidade da *D. hominis* secretar, em grande quantidade, enzimas que permitam as larvas de primeiro estádio iniciar sua vida parasitária no tecido cutâneo de mamíferos (LEITE e EVANGELISTA, 2002)

Assim, como em outras larvas de insetos, o intestino é o órgão mais longo e importante do terceiro estádio de *D. hominis*, responsável pela digestão e absorção de nutrientes (DOW, 1986). Como tem a necessidade de ingerir alimentos continuamente, o intestino é formado basicamente por um segmento único, como observado em insetos hematófagos (TERRA *et al.*, 1996) e semelhante a *Hypoderma bovis* (BOULARD, 1969) e *Gasterophilus intestinalis* (KEILIN, 1944). O epitélio intestinal é constituído por células epiteliais simples, formando a membrana peritrófica, seguindo o padrão encontrado em larvas de dípteros como: *Lucilia cuprina*, *Calliphora* spp e *Musca domestica* e em adultos de *Stomoxys calcitrans*, *Chrysomya rufifacies* e *Haematobia irritans* (PEREIRA e LEITE, 2003).

Técnicas histológicas de microscopia eletrônica foram utilizadas para estudar as alterações teciduais provocadas pelas larvas em seus hospedeiros. Grande parte destes trabalhos retrata o tipo de reação celular desencadeada pela agressão da larva, outros descrevem alterações dos constituintes das larvas, como a hemolinfa. FARALDO e LELLO (2003) estudaram as reações de defesa das células granulares e dos hemócitos nos mecanismos de encapsulação de substâncias estranhas às larvas L_3. Estes estudos confirmam o importante papel da resposta celular nos mecanismos de controle parasitário.

Estudos baseados no mecanismo de resposta imune desencadeado pelas larvas de diversos insetos, procuram definir o papel dos hemócitos nessa defesa. Os hemócitos circulam livremente na hemolinfa, mas após a invasão de bactérias, fungos, vírus ou protozoários, rapidamente migram para o local da infecção, onde

fagocitam e destroem os invasores (SILVA *et al.*, 2000; RUSSO *et al.*, 2001). Os fatores naturais de defesa são constituídos por aglutininas, lisozimas e fatores de imobilização. Tais fatores podem estar envolvidos no reconhecimento de moléculas estranhas, de modo similar às aglutininas (GÖTZ e BOMAN, 1985; RATCLIFFE *et al*., 1985; RATCLIFFE, 1986).

Nos insetos, a natureza das moléculas de reconhecimento não está bem definida. Alguns receptores associados à membrana dos hemócitos e outros solúveis na hemolinfa são capazes de reconhecer e aglutinar diretamente os patógenos, enquanto outros podem induzir a ativação de cascatas proteolíticas (PATHAK, 1993).

O estudo dos hemócitos através da microscopia óptica gerou controvérsias quanto à identificação devido às diferentes funções que podem assumir ao longo do desenvolvimento. Os principais tipos presentes em várias ordens de insetos são: prohemócito (PR), plasmatócito (PL), granulócito (GR) e oenocitóide (OE). Os hemócitos PR são considerados por diversos autores como *stem cells*, ou seja, células que originam outros tipos celulares. Quando as partículas ou invasores possuem dimensões ou número considerável, estes hemócitos participam da encapsulação celular e da formação de nódulo (GUPTA, 1985; TANADA e KAYA, 1993). A encapsulação é um processo desencadeado quando patógenos invasores muito grandes ou numerosos para serem fagocitados, são envolvidos em agregados multicelulares, podendo formar cápsulas ou nódulos ao redor do invasor (RATCLIFFE *et al*., 1985; PECH *et al*., 1995; MEYER-FERNANDES *et al*., 2000). Os fluidos corporais dos insetos possuem uma variedade de fatores de defesa humoral, naturais ou induzidos. Hemócitos dos dípteros, *D. hominis* e *Chrysomya megacephala,* já foram descritos por FARALDO e LELLO (2003).

A imunohistoquímica (IHQ) é um método diagnóstico que tem como objetivo detectar um antígeno tissular ou celular, através da utilização de um anticorpo específico dirigido contra este componente celular. Na bibliografia consultada nenhum estudo histoquímico foi realizado com a larva de *D. hominis.*

SANAVRIA *et al*. (1987) e OLIVEIRA-SEQUEIRA *et al*. (1996) analisaram a reação histopatológica e imunológica da pele de bovinos infestados por larvas L_1 de *D. hominis*. LELLO *et al*. (1980) e PINTO *et al.*, (2003) estudaram a reação inflamatória causada pelo berne, em coelhos imunizados e descreveram a

importante resposta eosinofílica observada devido à formação do complexo antígeno-anticorpo.

PEREIRA *et al.* (2001) coletaram amostras de pele de ratos experimentalmente infestados com larvas L_1 de *D. hominis* e observaram que as primeiras células encontradas no infiltrado foram os neutrófilos. Após o sétimo dia de infestação, quando as larvas de segundo instar formaram-se, as células predominantes foram os neutrófilos e linfócitos, e após a formação da L_3, predominaram os eosinófilos e neutrófilos.

LELLO *et al.* (1999) compararam a resposta tissular de coelhos infestados artificialmente por *D. hominis* não imunizados e imunizados com extratos de larvas e comprovaram que a reação inflamatória nos animais imunizados era mais intensa e precoce do que nos animais apenas infestados. As células predominantes no infiltrado inflamatório foram os neutrófilos e eosinófilos, que apareceram após as primeiras 24 h no grupo imunizado.

LELLO e ROSIS (2000) mostraram que em camundongos o contato prévio com o antígeno estimulou a rápida presença de eosinófilos. PEREIRA e LEITE (2002) constataram a produção e a presença de eosinófilos em ratos infestados artificialmente e observaram que L_1 e L_3 estimulam maior produção destas células. Posteriormente, FERNANDES (2004) observou resultados semelhantes com bovinos infestados naturalmente.

Diante do exposto, o presente trabalho teve por objetivo a caracterização das reações antígeno/anticorpo em larvas de *D. hominis* através da identificação e localização de proteínas antigênicas nos tecidos larvais com o auxílio de métodos imunohistoquímicos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado em duas etapas. A primeira foi a obtenção de anticorpos policlonais (Capítulo II, item 2.1) para estudo da ligação dos anticorpos aos epítopos antigênicos e a segunda fase constituiu na obtenção e preparo dos cortes histológicos para estudo imunohistoquímico.

As larvas de *D. hominis* destinadas à preparação histológica, para os testes imunohistoquímicos, foram obtidas no campo em animais infestados, como descrito no Capítulo I.

2.1. FIXAÇÃO DAS LARVAS DE *D. hominis* PARA OBTENÇÃO DOS CORTES HISTOLÓGICOS

As larvas selecionadas para realização dos testes imunohistoquímicos foram preservadas em dois meios para fixação: Bouin e formalina tamponada (ANEXOS 15 e 16). As larvas foram classificadas segundo seu estádio, em L_2 e L_3 e separadas em frascos distintos contendo os meios para fixação. As larvas submetidas ao fixador de Bouin permaneceram submersas no meio por até 14 horas e as larvas fixadas na formalina tamponada, por 24 h. Após esse período as larvas foram lavadas em álcool 70% e preservadas neste meio até o momento de sua utilização.

2.2. PREPARO DO MATERIAL PARA INCLUSÃO EM PARAFINA

2.2.1. Desidratação da Amostra.

As larvas foram desidratadas em série de etanol diluído em água: 70, 80, e 90% e por último em etanol absoluto, permanecendo submersas 15 minutos, repetindo-se esses banhos, por três vezes, em cada concentração de etanol.

2.2.2. Diafanização

As larvas foram transferidas para uma mistura de etanol absoluto e xilol na proporção 3:1 (V/V) durante 15 minutos e a seguir para misturas 1:1 e 1:3 por igual período. O material foi transferido para o xilol puro e em seguida submerso em solução de xilol e parafina 1:1, mantendo-o em estufa por 30 minutos. As larvas foram retiradas desta solução uma a uma e submersas em parafina pré-aquecida a 60°C, em compartimentos cúbicos individuais medindo 2,5 x 1,5 x 2,0 para que o material pudesse ser emblocado, assim que o resfriamento da parafina a solidificasse.

2.3. PREPARO DAS LÂMINAS COM OS CORTES HISTOLÓGICOS

O bloco de parafina contendo a larva foi então aparado e levado ao micrótomo para realização dos cortes. Cortes histológicos de 4μm foram distendidos sobre lâminas de vidro para avaliação em microscópio óptico. Dois tipos de lâminas foram utilizados: lâminas comuns e silanizadas.

Com uma pinça, os fragmentos da navalha de cortes foram colocados em Banho-Maria com água destilada a 45° a 50°C. Os cortes foram separados um a um usando delicadamente a pinça e deixados no banho-maria até que esticassem para poderem ser “pescados” com as próprias lâminas previamente preparadas. As lâminas foram levadas à estufa a 50 a 60° para secar, por 24 horas. Desta maneira, a parafina derrete bem e os cortes grudam satisfatoriamente na lâmina.

2.3.1. Silanização de Lâminas

Lâminas de vidro foram previamente silanizadas a fim de que os cortes histológicos permanecessem aderidos à lâmina durante o processo imunohistoquímico. As lâminas de vidro foram lavadas em solução de Extran e submetidas a banho em solução de HCl 1N por 20 minutos, em seguida foram lavadas em água destilada por 3 vezes e transferidas para solução de acetona P.A. por 20 minutos. Após esse período as lâminas foram secas em temperatura

ambiente e imersas em solução de organosilano 2% (3-aminopropiltrietoxisilano, Sigma A-3648)

2.4. IMUNOHISTOQUÍMICA

As lâminas tratadas com organosilano contendo cortes de tecido foram desparafinadas, hidratadas e submetidas a técnicas de recuperação de antígenos, contra os soros policlonais de coelhos e bovinos, com a finalidade de expor os epítopos teciduais para as reações imunohistoquímicas.

2.4.1. Preparo das Lâminas

As lâminas, contendo o tecido de larvas, foram retiradas da estufa e submetidas a imersão em xilol por 30 minutos, repetido por duas vezes. Em seguida as lâminas foram reidratadas em solução de etanol diluído em água, nas concentrações de 90, 80, 70 e 50% por banhos de imersão subseqüentes e com intervalo de 3 minutos.

2.4.2. Bloqueio da Peroxidase Endógena

As lâminas foram então lavadas em água destilada por três minutos e imersas em solução PBS (pH 7,2), durante cinco minutos, por duas vezes. Após essa lavagem foram imersas em solução de metanol e peróxido de hidrogênio 1%, por 45 minutos, a fim de que a peroxidase endógena fosse eliminada.

2.4.3. Bloqueio de Ligações Inespecíficas

Após o bloqueio da peroxidase as lâminas foram lavadas em PBS por cinco minutos, repetindo-se a operação. As lâminas foram novamente lavadas com solução de Triton®-X100 (Sigma – 234729) 0,05% em PBS, por 5 minutos e em

seguida submetidas a solução de BSA (soro albumina bovina) 1% em PBS, por 1 hora em câmara úmida e a temperatura ambiente.

2.4.4. Diluição dos Anticorpos Policlonais Produzidos em Coelhos e Bovinos

Para a ligação dos anticorpos policlonais contra antígenos de *D. hominis* foram usados anticorpos obtidos em coelhos e bovinos imunizados com extrato bruto de larvas L_3 e bovinos imunizados com a proteína Dh50. Foram estabelecidas diluições distintas para os soros hiperimunes de coelhos e de bovinos. Para obter diferentes diluições, três lâminas de larvas L_3 foram preparadas e cada uma contendo, dois cortes histológicos, sendo um usado para controle negativo. As diluições para os soros de coelho, foram de 1:250; 1:500; 1:1000 e 1:2000 e para os soros de bovino, 1:50; 1:100 e 1:200. A diluição dos soros foi realizada com BSA 1% e a solução colocada sobre os cortes de tecido de maneira que ficasse totalmente recobertos, um círculo feito com lápis dermatográfico, ao redor do corte, serviu de auxílio para que a solução não saísse do corte. No controle negativo não foi adicionado o anticorpo.

2.4.5. Aplicação do *Kit* Avidina-Biotina-Peroxidase

Após aplicação do anticorpo primário, as lâminas foram deixadas em câmara úmida a 4ºC na geladeira *over night*. Após 18 a 20 horas de incubação, foram então lavadas duas vezes em PBS pH 7,2 por 5 minutos. As lâminas foram incubadas com o *Kit* LSAB® (Dako K-0679), pronto para o uso, aplicando-se 100µL de biotina sobre os cortes de cada lâmina, incubando em câmara úmida por 10 minutos, em seguida as lâminas foram viradas para remover o líquido e aplicou-se a streptoavidina da mesma maneira, com o mesmo intervalo de tempo.

2.4.6. Revelação da Reação Imunohistoquímica

As lâminas foram lavadas em PBS durante cinco minutos, por 3 vezes e a reação revelada pela adição do DAB (Diaminobenzidina Tetrahidrocloridro Sigma, C-5637) (ANEXO 17), por aproximadamente 20 minutos. As lâminas foram lavadas em água corrente e contra-coradas com Hematoxilina - Eosina (ANEXO 18). A seguir desidratados em banhos sucessivos de água corrente, álcool 50, 70, 80, 90% e absoluto, xilol e cobertos com lamínula usando-se resina sintética.

Após o preparo as lâminas foram analisadas em microscópio óptico com aumento de 100x.

3. RESULTADOS

Para o desenvolvimento da técnica de imunohistoquímica com larvas de *D. hominis*, não há na literatura, uma metodologia previamente proposta para o preparo de lâminas e meios de fixação. Desta forma, além do emprego da técnica houve a necessidade de padronizar o método. O primeiro parâmetro avaliado foi o emprego de dois tipos de lâminas de vidro, comum e silanizadas. Os resultados mostraram que não há diferença na aderência das amostras (cortes) utilizados no desenvolvimento da técnica, podendo-se usar lâminas comuns, o que diminui os custos e a execução do preparo.

No que diz respeito aos meios de fixação das larvas antes do corte histológico, a formalina tamponada e o fixador de Bouin. Observou-se que o emprego do segundo fixador resultou na melhor preservação das estruturas teciduais da larva, provavelmente por permitir um corte mais preciso do tecido (TABELA 01).

TABELA 01: CARACTERÍSTICAS DOS FIXADORES UTILIZADOS PARA O PREPARO DAS LÂMINAS DO CORTE HISTOLÓGICO DAS LARVAS DE *D. hominis*.

Variáveis	Fixadores	
	Formalina tamponada	BOUIN
Integridade do corte	+	++++
Fixação na lâmina	++	+++
Silanização	++++	++++
Coloração	++++	++++
Imunohistoquímica	+	++++

Legenda: ++++: muito bom; +++: bom; ++: regular; +: ruim

Na avaliação das diluições dos anticorpos empregadas no processo imunohistoquímico, optou-se pelas diluições de 1:100 para o soro de bovinos e de 1:500 para o soro de coelhos (FIGURAS 01, 02 e 03). As diluições acima de 1:100 para bovinos, assim como as acima de 1:500 para coelhos, apresentaram baixa imunorreatividade e as diluições de 1:50 e 1:250 mostraram reações inespecíficas de fundo (*background*) para os soros de bovinos e coelhos, respectivamente.

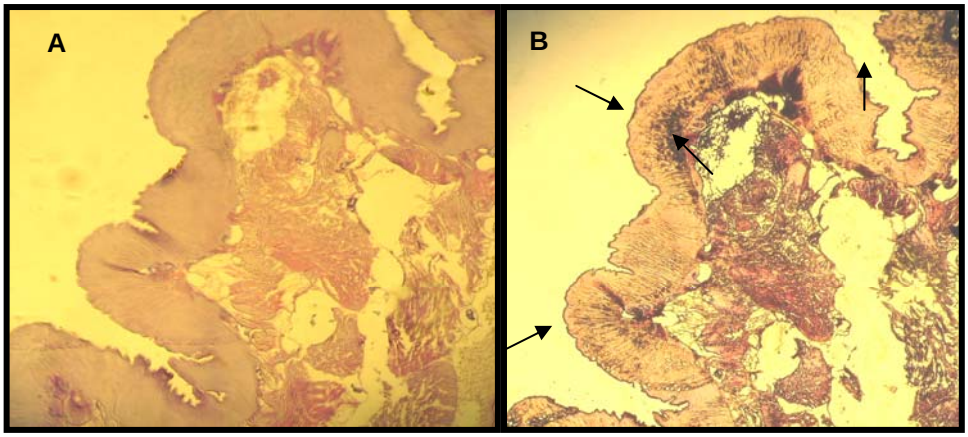


FIGURA 01: Fotomicrografia de cortes corados pelo H.E. de larvas de *D. hominis.* (A) células da cutícula das larvas, controle negativo. (B) setas indicando a reação imunohistoquímica, por anticorpos policlonais em bovinos contra larvas L_3, na parede das larvas. Aumento microscópico de 100X.

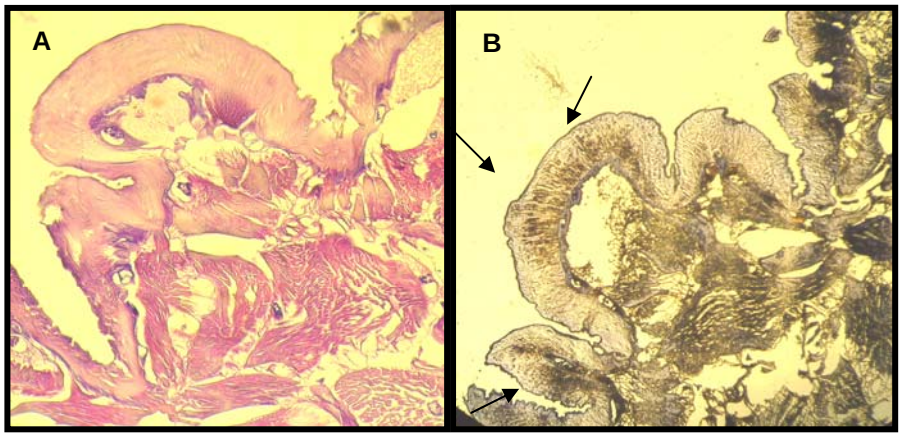


FIGURA 02: Fotomicrografia de cortes corados pelo H.E. de larvas de *D. hominis.* (A) células da cutícula das larvas, controle negativo. (B) setas indicando a reação imunohistoquímica, por anticorpos policlonais em coelhos contra larvas L_3, na parede das larvas. Aumento microscópico de 100X.

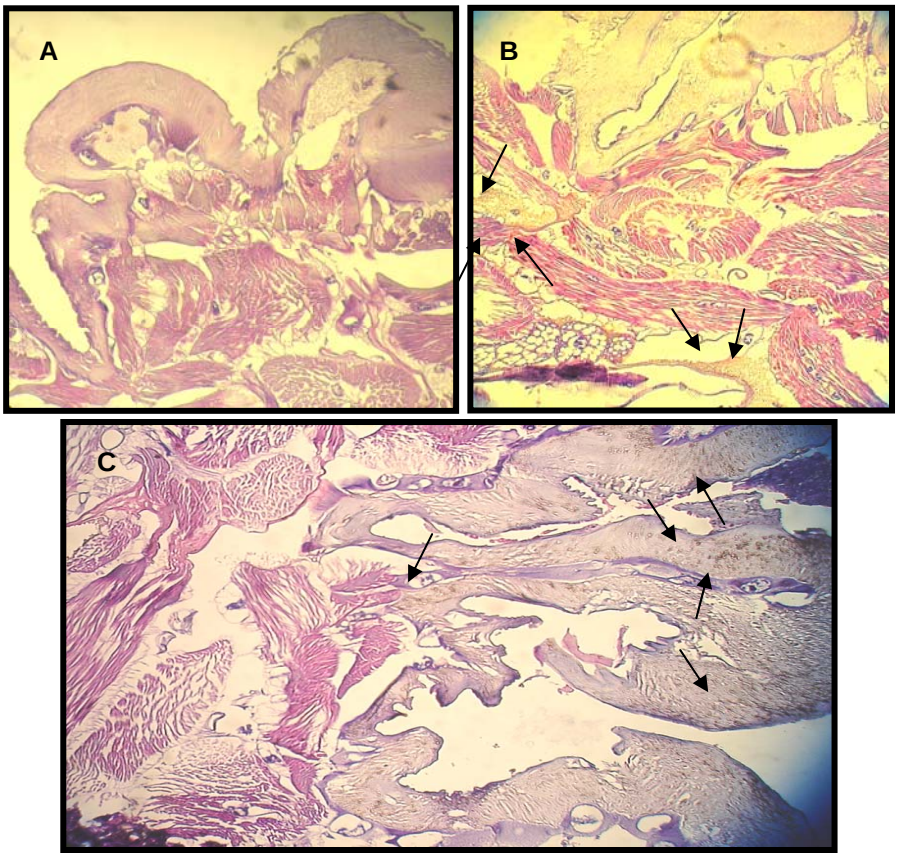


FIGURA 03: Fotomicrografia de cortes corados pelo H.E. de larvas de *D. hominis*. (A) controle negativo. (B) setas indicando a reação imunohistoquímica, por anticorpos produzidos em bovinos contra a proteína Dh50 – Aumento microscópico de 100X. (C) setas indicando a reação imunohistoquímica, por anticorpos produzidos em bovinos contra a proteína Dh50 – Aumento microscópico de 400X.

Os resultados obtidos para a avaliação imunohistoquímica dos cortes de tecidos de larvas L_3 de *D. hominis*, utilizando os anticorpos policlonais produzidos em coelhos e em bovinos, apresentaram reatividade similar para ambas as espécies sem diferença significativa entre as mesmas.

Também pôde ser observado que a reação antígeno-anticorpo foi encontrada em toda a extensão das larvas, demonstrando que a proteína imunogênica presente nas larvas da *D. hominis* e, portanto, não tem localização específica. Este teste foi realizado com o objetivo de determinar a localização das proteínas na larva e saber se os anticorpos produzidos teriam acesso aos epítopos nas larvas.

Já a reação imunohistoquímica apresentada nos cortes das larvas L_3 frente aos soros produzidos em animais imunizados com a proteína Dh50, indicou que a sua localização está na membrana da larva e no espaço entre as fibras musculares da larva, o que permitiria a ligação com anticorpos no caso de uma imunização (FIGURA 03).

4. DISCUSSÃO

O sistema de avaliação imunohistoquímica usando Avidina-Biotina-Peroxidase recomenda o tratamento prévio das lâminas de vidro com 3-aminopropiltrietoxisilano (BOENISCH, 2001). Todavia, durante nossos experimentos verificamos que a opção pelas lâminas comuns atende os requisitos técnicos básicos, além de diminuir os custos com a realização da metodologia.

A fixação das larvas, em meios distintos teve como objetivo selecionar a melhor metodologia, uma vez que não há na literatura a indicação do melhor meio de fixação de larvas para realização de testes imunohistoquímicos. O fixador ideal deve preservar a morfologia do tecido após o corte, além de prevenir a extração, difusão e deslocamento do antígeno durante as etapas que se seguem à fixação, não pode interferir com reações subseqüentes na localização do antígeno (BANCROFT & COOK, 1994). O fixador de Bouin é a base de ácidos pícrico e acético e apesar de não ser o mais recomendado pela literatura especializada na fixação de tecido para a imunohistoquímica, apresentou resultados mais satisfatórios que a utilização da formalina tamponada na preservação dos tecidos larvais.

A fixação em formalina promove ligações múltiplas entre os grupos amino e a formação de pontes de metileno entre os vários aminoácidos presentes nos peptídeos de uma determinada proteína e desta com as proteínas adjacentes. Estas múltiplas ligações bloqueiam o acesso de anticorpos aos epítopos alvo, mascarando o antígeno. Provavelmente, em função desta ação, a formalina tamponada não se mostrou adequada no preparo deste tipo de amostra.

Outra dificuldade observada no preparo das amostras foi a fixação das larvas ainda vivas. Após os primeiros cortes histológicos pode-se verificar que as larvas eram rompidas e o material permanecia muito friável, o que dificultava a confecção da lâmina. Desta forma, novas larvas foram colhidas de animais infestados e após serem lavadas em solução fisiológica, foram submergidas em solução fisiológica aquecida a 50°C, com a finalidade de produzir a sua morte e ao mesmo tempo permitir um relaxamento muscular. Após a constatação da morte das larvas, estas foram secas em papel filtro e então submersas nos meios de fixação. Após o período de fixação das larvas, estas foram seccionadas, com auxílio de bisturi, no sentido longitudinal, para que o fixador penetrasse com maior facilidade nos tecidos. Essas larvas permaneceram submersas nos meios por um período de mais 4 horas,

sendo então transferidas para o álcool 70%. Esses procedimentos propiciaram cortes das larvas sem as alterações morfológicas anteriormente descritas.

Os nossos resultados sugerem importantes contribuições no estudo do mecanismo antigênico das larvas de *D. hominis*, das quais podem ser destacados dois fatos relevantes, o primeiro é o mapeamento tissular da larva, apontando a localização da proteína antigênica pela observação dos anticorpos acoplados aos epítopos no tecido larval. O segundo, de importância para o desenvolvimento metodológico da técnica de imunoshistoquímica de tecidos de larvas, diz respeito ao preparo das lâminas e a escolha do fixador, que dispensa o uso do organosilano e aponta o Bouin como fixador potencial para este tipo de amostra.

5. CONCLUSÕES

- A reatividade histoquímica evidenciada pela reação antígeno/anticorpo pode ser observada em toda a extensão das larvas L_3 de *D. hominis*, evidenciando que os anticorpos produzidos por animais vacinados têm total acesso aos epítopos no tecido larval;

- A utilização de anticorpos policlonais contra *D. hominis* de bovinos e de coelhos produziu o mesmo padrão de resposta imunohistoquímico;

- A reação imunohistoquímica observada nas larvas por anticorpos contra a proteína Dh50, evidenciou a sua presença em algumas células da cutícula e em segmentos entre as suas fibras musculares;

- Considerando os parâmetros que apresentaram resultados satisfatórios para a aplicação em imunohistoquímica em larvas de *D. hominis*, recomenda-se o uso de lâminas comuns e a fixação em Bouin.

6. REFERÊNCIAS

BAYARDO, F. M. H; SPROESSER, R. Couro Bovino. **Boletim Técnico UFMS**. Campo Grande, n. 3, 190 p, 2003.

BANCROFT, J. D.; COOK, H. C. **Manual of Histological Techniques and their Diagnostic Application**. Edinburgh, Churchill Livingstone, 1994, 457p.

BOENISCH, T. Formalin-fixed and heat-retrieved tissue antigens: a comparison of their immunoreactivity in experimental antibody diluents. **Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphology**, Philadelphia, v. 9, p. 176-79, 2001.

BOULARD, C. Anatomie et histologie du tube digestif de la larve d'*Hypoderma bovis* - Diptère oestriforme. **Annales de la Société Entomologique de France**, Paris, v. 5, n. 2, p. 371-387, 1969.

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

DOW, J. A. T. Insect midgut function. **Advances in Insect Physiology**, New South Wales, v. 19, p. 178- 183, 1986.

EVANGELISTA, L. G.; LEITE, C. R. Optical and Ultrastructural Studies of Midgut and Salivary Glands of First Instar of *Dermatobia hominis* (Diptera: Oestridae). **Journal of Medical Entomology**, Columbia, v. 42, n. 3, p. 218-223, 2005.

FARALDO, A.C.; LELLO, E. Defense reactions of *Dermatobia hominis* (Diptera: Cuterebridae) larval hemocytes. **Biocell**, Mendoza, v. 27, n. 2, p. 197-203, 2003.

FERNANDES, N. L. M. **Dinâmica populacional da *Dermatobia hominis* (Linnaeus, 1781) (Díptera:Cuterebridae) e o Comportamento da resposta imune de bovinos imunizados com extrato de larvas.** Curitiba, 2004. 113 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

GÖTZ, P.; BOMAN, H. G. Insect immunity. In: KERKUT, G. A.; GILBERT, L. I. (Ed.).**Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology**. Pergamon Press, Oxford, 1985. p.453-485.

GUPTA, A. P. Cellular elements in the hemolymph. In: KERKUT, G. A.; GILBERT, L. I., **Comprehensive insect physiology biochemistry and pharmacology**, v. 3, Pergamon Press, Oxford, 1985, 595p.

KEILIN D. Respiratory systems and adaptations in the larvae and pupae of Diptera. **Parasitology**, Oxford, v. 36, p. 1-66, 1944.

LEITE, A. C. R. Scanning electron microscopy of the egg and the first instar larva of *Dermatobia hominis* (Diptera, Cuterebridae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 83, p. 253-57, 1988.

LEITE, A. C. R.; EVANGELISTA, L. G. Activated host neutrophils in the larval midgut lumen of the human bot fly *Dermatobia hominis*. **Tissue and Cell**, Universidade de Siena: Itália, v. 34, n. 2, p. 98-102, 2002.

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* (Díptera: Cuteribridae). **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 32, p. 458-461, 1980.

LELLO, E.; PERAÇOLI, M. T. S.; OLIVEIRA-SEQUEIRA, T. C. G. Inflammatory response in *Dermatobia hominis* infested rabbits. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 8, p. 287-291, 1999.

LELLO, E.; ROSIS, A. M. B. Reação inflamatória em camundongos infestados com larvas de *Dermatobia hominis* (Diptera: Cuterebridae). **Naturália**, São Paulo, v. 25, p. 53-66, 2000.

MEYER-FERNANDES, J. R.; LANZ-MENDOZA, H.; GONDIM, K. C.; WILLOTT, E.; WELLS, M. A. Ectonucleotide diphosphohydrolase activities in hemocytes of larvae *Manduca sexta*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 382, n.1, p.152- 159, 2000.

OTRANTO D.; STEVENS J. R. Molecular approaches to the study of myiasis-causing larvae. **International Journal for Parasitology**, Amsterdam, v. 32, n.11, p. 1345-1360. 2002.

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

PATHAK, J. P. N. Cell-mediated defence reactions in insects. **Insect Immunity**, Kluwer Academic Publishers, India, p. 47-58, 1993.

PECH, L. L.; TRUDEAU, D.; STRAND, M. R. Effects of basement membranes on behavior of hemocytes from *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae): development of an *in vitro* encapsulation assay. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 41, n. 9, p. 801-7, 1995.

PERAÇOLI, M. T. S.; LELLO, E.; MOTA, N. G. S. Comportamento da resposta imune-humoral em coelhos imunizados com antígenos de D*ermatobia hominis* Linnaeus, frente às larvas desse parasita (Díptera: Cuterebridae). **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 32, n. 11, p. 1537-1542, 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**, Oxford, v. 15, n. 1, p. 22-27, 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**, Paris, v. 9, n. 4, p. 333-339, 2002.

PINTO, S. B.; THOMAZ-SOCCOL; V.; MINOZZO, J. C.; ZABOTT, M. V.; VENDRUSCOLO, E. G.; ROCHADELLI, R.; FREITAG, A.; GUETNER, C. Resposta imune humoral de coelhos frente a extratos de larvas de *Dermatobia hominis*. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v. 8, n. 2, p. 19 - 25, 2003.

PRUETT, J. H. Immunological control of arthropod ectoparasites—a review **International Journal for Parasitology**, Amsterdam, v. 29, n.1, p.25-32, 1999

RATCLIFFE, N. A.; ROWLEY, A. F.; FITZGEALD, S. W.; RHODES, C. P. Invertebrate immunity: basici concepts and recent advances. **International Review of Cytology**, New York, v. 97, p. 283-279, 1985.

RATCLIFFE, N. A. Insect cellular immunity and the recognition of foreignness. In: LACKIE, A. M. (Ed.).**Zoological Symposium: immune mechanisms in invertebrate vectors**, London: The Zoological Society of London, 1986. p.21-43.

REIS, M. G.; INADA, T.; FERRY, F. R. A.; MOYA-BORJA, G.E. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 3, n. 1, p. 71-73, 1994.

RUSSO, J.; BREHÉLIN, M.; CARTON, Y. Haemocyte changes in resistant and susceptible strains of *Drosophila melanogaster* caused by virulent and avirulent strains of the parasitic wasp *Leptopilina boulardi*. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 47, p. 167-72, 2001.

SANAVRIA, A.; LOPES, C. W. G.; BORJA, G.E.M. Histologia da pele de bovino na infecção experimental por *Dermatobia hominis*. **Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, Itaguaí, v. 10, p. 9-23, 1987.

SILVA, C.; GARY, B. D.; RAU, M. E. Interaction of hemocytes and prophenoloxidase system of fifth instar nymphs of *Acheta domesticus* with bacteria*.* **Developmental and Comparative Immunology**, New York, v. 24, p. 367-379, 2000.

TANADA, Y.; KAYA, H. K. **Insect Pathology**. San Diego, Academic Press, 1993, 666p.

TERRA, W. R. Evolution of digestive systems of insects. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 35, p. 181-200, 1996.

CAPÍTULO IV

IMUNIZAÇÃO DE BOVINOS COM A PROTEÍNA ANTIGÊNICA PURIFICADA DE *Dermatobia hominis* - Dh50 kDa

IMUNIZAÇÃO DE BOVINOS COM PROTEÍNA ANTIGÊNICA PURIFICADA DE *D. hominis* - Dh50 kDa

Resumo: O desenvolvimento de vacinas para controlar ectoparasitos depende da identificação dos principais antígenos. Antígenos candidatos devem ter acesso aos anticorpos formados; serem administrados em quantidade suficiente, e a formação do complexo antígeno-anticorpo deve alterar a fisiologia do parasito. Além disso, os antígenos precisam possuir estrutura e ou seqüência conservada com caracterização protéica, permitindo assim o uso de métodos recombinantes para expressar esse antígeno. Este trabalho teve como objetivo imunizar bovinos com uma fração antigênica purificada (Dh50) do extrato de larvas de *Dermatobia hominis* e submetê-los a um desafio à campo, em região sabidamente infestada por este ectoparasito. Três grupos de bovinos foram selecionados, sendo o grupo A imunizado com a proteína purificada, grupo B imunizado com extrato bruto de larvas e o grupo C que serviu de controle. A cinética da produção de anticorpos contra a *D. hominis* foi acompanhada pela absorbância do teste ELISA no soro dos animais, onde foi possível comprovar diferença significativa ($p<0,05$) entre os grupos. O número de nódulos cutâneos observados em cada tratamento foi distinto ($p<0,01$) para os três grupos de animais. O grupo A apresentou 4,2% dos nódulos cutâneos totais, o grupo B, que recebeu o extrato bruto de larvas, 7,6% e o grupo C (controle) apresentou 88,2% dos nódulos. Os anticorpos produzidos pelos bovinos imunizados e a comparação do número de nódulos cutâneos encontrados nesses animais permitiu concluir que os extratos obtidos a partir de larvas de *D. hominis*, foram imunogênicos para bovinos, conferindo uma eficiência de 90,67% em relação ao grupo controle. A proteína de 50 kDa, extraída do extrato bruto de *D. hominis*, mostrou ser um antígeno candidato bastante promissor à produção de vacina efetiva contra a dermatobiose.

Palavras-chave: vacina, antigênica, nódulos, *Dermatobia hominis*.

IMMUNIZATION OF BOVINES WITH ANTIGENIC *D. hominis* PURIFIED PROTEIN - Dh50 kDa

Abstract: Vaccine development for ectoparasites control depends on identification of main parasite antigens. Antigen candidates must allow access of produced antibodies, be administrated in enough quantity and have conserved structure or amino acid sequences allowing, after protein characterization, the use of recombination techniques to produce organisms that express the antigen. Likewise, formation of antigen-antibody complex must change parasite physiology. The goals of the current study were to immunize bovines with purified antigenic fraction (Dh50) of *Dermatobia hominis* larval extract and to submit theses mammals to field challenge in region infested with this ectoparasite. So, three groups of bovines were selected; “A” and “B” groups had been immunized with the purified protein and raw larval extract respectively, and “C” group was used as control. Kinetics of antibodies production was accompanied in sera of bovines by means of enzyme-linked immuno-sorbent assay (ELISA); ELISA data analysis indicated significant difference ($p<0.05$) among “A”, “B” and “C” groups. Similarly, the number of cutaneous nodules due to parasite infection was distinct ($p<0.01$) in the three groups of bovines; “A” group had 4.2% of the total cutaneous nodules, while “B” and “C” groups had 7.6% and 88.2% of them, respectively. Based on comparison among “A”, “B” and “C” groups regarding the amount of antibodies produced by immunized bovines and the number of cutaneous nodules found in the animals, we conclude that the extracts obtained from *D. hominis* larvaes were immunogenic for bovines, yielding an efficiency of 90.67% in comparison to control. The 50 kDa protein, purified from raw *D. hominis* larvae extract, is one promising candidate antigen to produce an effective vaccine against dermatobiosis.

Key words: vaccine, antigenic, nodules, *Dermatobia hominis*.

1. INTRODUÇÃO

A relação parasito/hospedeiro é estabelecida pelo modo de alimentação do parasito no hospedeiro. O hábito alimentar dos ectoparasitos leva a lesões na pele e tecidos subcutâneos pela inflamação ou perda de sangue. Estas lesões estão normalmente associadas ao prurido, eritema, escoriações, pápulas, liquenificação e ferimentos sujeitos a infecções secundárias (WALL, 2007).

Hábitos alimentares distintos permitiram a evolução de várias espécies de ectoparasitos ao longo de milhares de anos, com isso a adaptação desses parasitos frente a condições adversas, ficou mais fácil, possibilitando uma maior resistência das espécies. Com a evolução dos ectoparasitos houve consequentemente a evolução dos hospedeiros, estabelecendo estratégias de ação para o seu controle desde a migração em massa, da população afetada, para áreas livres de parasitismo, até o desenvolvimento de respostas imunes. (STEVENS *et al.*, 2006).

Nos últimos anos, o papel dos antígenos produzidos a partir de larvas causadoras de miíases e a resposta imunomoduladora dos hospedeiros, têm sido amplamente investigados principalmente para *Hypoderma lineatum* e *Lucillia cuprina.* Muito embora, as informações obtidas nesses estudos ainda sejam iniciais quando comparadas aos estudos realizados com outros artrópodes, como os carrapatos e alguns mosquitos (OTRANTO e STEVENS, 2002). Por outro lado, para espécies de miíases de interesse localizadas exclusivamente na América Latina, como a *Dermatobia hominins*, não existem estudos a respeito da capacidade antigênica de suas larvas.

A escolha dos artrópodes a serem estudados deu-se, não só pelo expressivo prejuízo econômico causado, como também pelo fato desses parasitos (carrapatos e mosquitos) apresentarem distribuição mundial. Outro fator que contribuiu para o desenvolvimento destas pesquisas foi o hábito alimentar dessas espécies no hospedeiro, uma vez que parasitos hematófagos podem desenvolver mecanismos de antigenicidade mais específicos (PATARROYO *et al*., 2002).

Artrópodes que se alimentam de sangue tem uma elevada produção de substâncias candidatas a antigênicas graças às inúmeras proteínas responsáveis pelos mecanismos de ação de fixação e alimentação no hospedeiro. Esses artrópodes constituem um extraordinário exemplo de evolução convergente, sendo que cada espécie de artrópode hematófago desenvolveu um mecanismo particular

para o problema, através da expressão, na sua saliva, de uma complexa e redundante mistura de inibidores de vasoconstrição (MEJIA *et al*., 2006).

O desenvolvimento de vacinas para controlar ectoparasitos depende da identificação dos principais antígenos. Antígenos candidatos têm sido estudados em diversas espécies, mas algum sucesso só foi obtido com carrapatos. ELVIN *et al*., (1994) consideram que os candidatos vacinais devem ter acesso aos anticorpos formados serem administrados em quantidade suficiente, e a formação do complexo antígeno-anticorpo deve alterar a fisiologia do parasito em questão. Além disso, os antígenos precisam possuir estrutura e ou seqüência conservada com caracterização protéica, permitindo assim o uso de métodos recombinantes para expressar o antígeno candidato.

No caso dos carrapatos, o estudo de proteínas retiradas dos seus intestinos possibilitou a descoberta de uma seqüência de aminoácidos que passou a ser clonada e expressa e então utilizada como imunógeno para os bovinos parasitados. A vacina atua principalmente para controlar a população das larvas de carrapatos disponíveis para infestação, em vez de proteger individualmente os bovinos (WILLADSEN *et. al*., 1995). Além disso, é mais eficaz quando utilizada associada ao controle químico dos parasitos adultos, quando as infestações ultrapassam os limites aceitáveis (WILLADSEN e KEMP, 2003).

É conhecido também, que a distribuição de uma população de parasitos nos hospedeiros não é uniforme e acredita-se que a imunidade inata e a resistência adquirida contribuam para isso. Desta forma, a aplicação de uma vacina eficaz permitiria o aumento da população de hospedeiros resistentes possibilitando a redução da infestação e o controle da população de parasitos (PRUETT, 1999).

Quanto às larvas produtoras de miíases, os estudos relacionados se concentram apenas em espécies distribuídas no hemisfério norte, Austrália, Nova Zelândia e África, principalmente dos gêneros *Hypoderma* spp e *Lucillia* spp. JOHNSTON *et al*. (1992) imunizaram ovelhas com extratos de segundo estádio, de larvas de *Lucilia cuprina*, preparados com as larvas inteiras e somente com a cutícula dessas larvas. Os resultados obtidos levaram a conclusão de que o extrato feito com a larva inteira proporcionou uma melhor resposta imune do hospedeiro.

No caso de infestações pela *Hypoderma* spp foram isoladas algumas proteínas de secreção e excreção das larvas, as quais deram origem a antígenos denominados Hipoderminas. A caracterização bioquímica das hipoderminas

representou importante avanço nos ensaios de vacinação, embora o papel protetor ainda seja discutido (BARON e COLWELL, 1991; CHABAUDIE e BOULARD, 1992; TELLAM e BOWLES,1997).

Os poucos estudos disponíveis sobre a relação parasita/hospedeiro envolvendo *D. hominis* referem-se apenas à resposta imune celular ou humoral dos hospedeiros frente à presença de larvas nos tecidos, ou à inoculação de extratos larvais. A resposta imune celular contra a *D. hominis* foi verificada por diversos autores, comprovando a importante participação de eosinófilos e neutrófilos (LELLO e PERAÇOLI, 1993; BARBOSA *et al*., 2000; PINTO *et al*., 2003 e FERNANDES *et al*., 2007). Além da resposta imune celular, a resposta humoral também pode ser importante na defesa do hospedeiro contra as larvas. Assim, FERNANDES *et al*. (2007) investigaram os níveis de anticorpos produzidos por bovinos imunizados com extrato de larvas de *D. hominis* e verificaram uma correlação negativa entre o número de nódulos cutâneos e o título de anticorpos sorológicos dos animais imunizados, indicando um possível papel desses anticorpos no controle deste parasito.

A resposta imune dos hospedeiros aos ectoparasitas envolve vias efetoras como anticorpos, complemento e células (BROWN *et al*, 1982 e BROWN e ASKENASE, 1983 e 1985) e suas vias regulatórias que compreendem citocinas, células apresentadoras de antígenos e linfócitos T (LAMOREAUX *et al*, 2000). Os componentes efetores agem limitando a alimentação do parasito e, quando são ingeridos, causam lesões nos tecidos do mesmo. Como conseqüência, o número de parasitos alimentando-se de forma eficaz, em um hospedeiro resistente acaba reduzido (BROWN e ASKENASE, 1983; BROWN *et al*, 1984).

O processamento dos antígenos consiste na introdução de antígenos protéicos nas células apresentadoras de antígenos, na degradação proteolítica dessas proteínas em peptídeos, na ligação dos peptídeos as moléculas recém-montadas do MHC (Complexo Principal de Histocompatibilidade), e na exposição dos complexos peptídeo-MHC à superfície das células apresentadoras de antígeno, para o reconhecimento potencial pelas células T.

WOODLAND e BLACKMAN (2006) sugerem que o número e as funções das células T diminuem com a progressão da idade, porém há um número crescente de células de memória. Assim, com o aumento da idade, a resposta imune poderia ser mediada por células de memória, o que implicaria no contato prévio com o patógeno para que ocorra resposta satisfatória frente a uma imunização.

Este talvez seja o principal aspecto negativo do uso de antígenos ocultos, pois não havendo exposição freqüente do hospedeiro ao antígeno, como acontece com antígenos salivares, torna-se difícil a preservação de imunidade eficiente (TRIMNELL *et al*, 2002). Todavia, estas vacinas reforçam a idéia de que a imunoprofilaxia adotada com antígenos melhor selecionados possa ser uma maneira eficiente de se fazer o controle da infestação parasitária. Acredita-se que uma vacina baseada em um conjunto de antígenos, ocultos e não ocultos, possa produzir uma resposta mais satisfatória para a redução da infestação.

Antígenos ocultos são aqueles não expostos ao sistema imune do hospedeiro durante uma infestação natural, embora os antígenos ocultos sejam a base das vacinas comerciais e tenham sido estudados em outros ectoparasitos, como *Lucilia cuprina*, experimentos com antígenos naturalmente expostos ao sistema imunológico do hospedeiro associado a antígenos ocultos, demonstram o potencial da associação de diferentes alvos em uma mesma vacina (TRIMNELL, *et al*., 2002).

A biotecnologia empregada na produção de vacinas envolve além de estudos básicos para isolar antígenos candidatos, a avaliação da resposta imunológica, desenvolvimento de técnicas de clonagem, otimização de resposta do hospedeiro, experimentos de campo, avaliação de mercado e registro do produto. Nas ultimas décadas o número de pesquisadores trabalhando no controle de artrópodes por vacinas é muito pequeno e os resultados encontrados nem sempre são promissores (BARON e COLWELI, 1991; CHABAUDIE *et al*., 1991).

Neste sentido, FERNANDES *et al* (2007) comprovaram um índice 71 % de proteção contra a infestação em bovinos pela vacinação com antígeno solúvel bruto de larvas de *D. hominis*, comparados a bovinos não vacinados. Sendo assim, pelos resultados obtidos com este estudo preliminar, seria possível estabelecer o controle desta parasitose através de vacinação, entretanto, é necessário verificar quais frações antigênicas que estão presentes no antígeno bruto e quais proporcionariam proteção aos animais.

A presente investigação teve como objetivo imunizar bovinos com uma fração antigênica purificada do extrato de larvas de *D. hominis* e submetê-los a um desafio à campo, em local e animais sabidamente infestados por este parasito. Os anticorpos produzidos pelos bovinos imunizados e a comparação do número de nódulos cutâneos encontrados nesses animais fornecerá dados importantes para subsidiar novas estratégias de controle para a dermatobiose.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. OBTENÇÃO DA PROTEÍNA ANTIGÊNICA

A fração protéica, identificada por imunoeletrotransferência, como antigênica, foi separada do extrato bruto de larvas L_3 de *D. hominis* através da imunoprecipitação e submetida a eletroeluição para retirada da fração de 50 kDa do extrato de larvas.

2.1.1. Separação da Fração Antigênica do Extrato Bruto de Larvas

A banda antigênica identificada pelo seu peso molecular de 50 kDa foi retirada do gel após a eletroforese em gel de poliacrilamida, com auxílio de bisturi. Uma vez separada, a banda, foi cortada em diversos fragmentos e submetida à eletroeluição, realizada de acordo com HUNKAPILLER *et al*. (1983).

O material excisado foi colocado dentro das pipetas da cuba de eletroeluição na presença de tampão de SDS-PAGE (Tris 25mM, Glicina 192mM, SDS 0,1%), em seguida uma membrana de diálise (Sigma-Aldrich) foi acondicionada na extremidade inferior da pipeta, amarrando as extremidades. Feito isto, a cuba eletroforética contendo tampão SDS-PAGE, nos dois compartimentos, foi submetida a uma corrente de 6 mA por aproximadamente 5 horas. Após este período, o líquido presente dentro da membrana foi coletado e a solução obtida armazenada.

Uma alíquota desta amostra foi submetida à dosagem de proteína. Nesta alíquota foi realizada a remoção do SDS, através da eletrodiálise. O material foi acondicionado em membrana de diálise e acoplado na pipeta da cuba de eletroeluição, devidamente fixada na extremidade inferior. O compartimento inferior da cuba foi preenchido com aproximadamente 600mL de tampão de eluição sem adição de SDS. O conjunto foi então ligado a uma corrente de 10mA por 2 horas. Após esse procedimento foi realizada a leitura de proteína da amostra pelo método de BRADFORD (1976).

2.1.2. Preparação do Antígeno para Imunização

Após a separação da proteína antigênica, o material aliquotado foi submetido à centrifugação, com o auxílio de uma membrana para concentração do antígeno presente na amostra (AMICON® ultra centrifugal filter unit – MILLIPORE)

O material obtido foi separado em frascos estéreis e armazenado (-20ºC), em volume suficiente para a inoculação em um animal.

2.2. SELEÇÃO E MANEJO DOS ANIMAIS

Os animais utilizados pertencem a uma propriedade localizada no município de Mairinque-SP, onde se verificou um intenso parasitismo por *D. hominis* em todos os animais da região.

Foram utilizados 16 bovinos mestiços com idade e sexo variável de um a nove anos de idade, que receberam um número de identificação de 1 a 16. Os animais eram criados em regime extensivo com pastoreio contínuo, em campo nativo.

O início do período experimental foi marcado pela seleção dos animais (FIGURA 01) que foram submetidos a quatro coletas semanais de sangue, com a finalidade de identificar, através do teste ELISA, os animais que apresentaram menor título de anticorpos para a infestação de *D. hominis*.

Os animais foram então divididos em três grupos ficando dispostos:

- GRUPO A: quatro animais a serem imunizados com a proteína (Dh50) antigênica à *D. hominis*.
- GRUPO B: quatro animais a serem imunizados com extrato bruto de larvas de *D. hominis*.
- GRUPO C: oito animais que não receberam nenhum imunógeno e serviram como grupo controle.

FIGURA 01: Bovinos mestiços selecionados para a imunização com a proteína Dh50 e extrato bruto antigênico de larvas de *D. hominis*, no município de Mairinque-SP.

Após a seleção, os animais dos grupos A e B foram confinados em estábulo telado por um período de 77 dias, para evitar contato com insetos vetores e assim evitar a infestação pela *D. hominis*, antes do início das imunizações.

Todos os animais receberam tratamento contra ecto e endoparasitos, pela aplicação de Moxidectina (Cydectin®- Fort Dodge), na dose de 0,2mg/Kg de peso. Os procedimentos relacionados ao manejo dos animais e a coleta de material foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Paraná (CEEA/UFPR), processo nº. 23075.02931/2007-09, certificado 251 (ANEXO 05).

2.2.1. Imunização dos Animais

Aos 15 de setembro de 2007 animais do Grupo A foram imunizados com a proteína imunogênica do extrato de larvas L_3 e os do Grupo B com o antígeno bruto de larvas de *D. hominis*, ambos acrescidos do adjuvante de Freund (Sigma Chemical Company). Nos animais do grupo A foi aplicado um macerado de bandas protéicas recortadas do gel de poliacrilamida, acrescido de solução antigênica

resultante da eletroeluição, em igual volume. Para cada animal foram utilizadas quatro tiras de bandas protéicas, recortadas do gel, com 11,5 cm de comprimento, que foram maceradas com 2,0 mL da solução eletroeluída, acrescida de 2,0 mL do adjuvante completo de Freund.

Os animais imunizados do grupo B receberam a primeira dose de 2,0 mL do extrato bruto de larvas L_3 de *D. hominis*, acrescida de partes iguais do adjuvante completo de Freund.

Após 15 dias, os animais, desses dois grupos receberam uma segunda imunização, composta dos mesmos antígenos e do adjuvante, porém foi utilizado o adjuvante incompleto de Freund (Sigma Chemical Company). A terceira imunização foi repetida 15 dias após a aplicação da segunda dose, sendo idêntica a esta última.

Todos os animais imunizados receberam três doses do imunógeno, com intervalos de quinze dias. As doses (4 mL) foram inoculadas por via subcutânea, na região da escápula, seguindo os mesmos critérios estabelecidos por FERNANDES *et al*. (2007). Os animais foram imunizados pela via subcutânea, uma vez que a via através da qual o antígeno é administrado, afeta a magnitude e o tipo da resposta imune obtida. De acordo com JANEWAY e TRAVERS (1997), os antígenos injetados por via subcutânea em geral induzem as respostas mais fortes, enquanto que os antígenos injetados diretamente na corrente sangüínea tendem a induzir tolerância ou insensibilidade.

2.3. TESTE ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)

A cada quinze dias 10mL de sangue foram colhidos, através da punção da veia jugular esquerda de cada animal (após contenção). As amostras foram submetidas a centrifugação, para retirada do coágulo, e as alíquotas, em duplicata, de soro foram guardadas e congeladas para posterior realização do teste enzimoimuniensaio.

O método de enzimoimunoensaio foi usado no presente trabalho para detectar, no soro de bovinos imunizados, anticorpos específicos contra antígenos de larvas L_3 de *D. hominis.* A técnica foi padronizada para o presente estudo e seguiu os princípios

propostos por FERNANDES *et al*. (2007), o protocolo adotado está descrito no ANEXO 06.

O princípio da técnica é uma reação de cor. A coloração faz-se presente quando a enzima peroxidase, integrante do conjugado, desdobra o substrato. Para que haja manifestação de cor é preciso que ocorra uma série de eventos em seqüência. Estes eventos têm início com a sensibilização da placa com o antígeno até a aferição da cor pelo leitor de placas.

2.4. NÚMERO DE NÓDULOS CUTÂNEOS

A cada quinze dias os nódulos de larvas de *D. hominis* foram contados e mapeados seguindo-se a mesma metodologia dos experimentos realizados por PINTO *et al*. (2003) e FERNANDES *et al*., (2007).

2.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A metodologia empregada para a análise dos dados, foi a de modelos lineares generalizados, apropriadas para variáveis que apresentam distribuições de probabilidade da família exponencial (normal, gamma, Poisson e binomial). Foram adotados como ferramentas os programas estatísticos: Sistema para Análises Estatísticas e Genéticas (SAEG, 8.0, 2002) e ASRemL (GILMOUR, *et al.* 2002). O teste de LILLIEFORS (SAEG) foi utilizado para verificar a distribuição normal dos dados.

Na avaliação do número de nódulos observados ao longo do experimento em função dos tratamentos adotados, utilizou-se a distribuição de Poisson com função de ligação logarítmica, cujo modelo matemático ficou assim estabelecido:

$$y_{ijk} = \mu + T_i + b_1(x_i) + b_2(x_i)^2 + b_3(x_i)^3 + e_{ijk}$$

onde:

μ= constante geral;

T_i = efeito de tratamento (i = 1, 2, 3);

b_1, b_2 e b_3 = são os coeficientes linear, quadrático e cúbico, respectivamente, de regressão do número de nódulos em função dos meses;

x_i = efeito do período da coleta;

e_{ij} = resíduo ou erro aleatório;

Para a análise da absorbância do teste ELISA em função dos tratamentos durante o experimento, foi adotada a distribuição gamma com função de ligação logarítmica e o modelo matemático semelhante ao procedimento anterior, modificando-se apenas a variável número de nódulos pela absorbância do teste ELISA.

Para verificar o número de nódulos, em de cada tratamento, os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância, utilizando-se o Software SAEG (Universidade Federal de Viçosa, 2002)

3. RESULTADOS

A seleção dos animais da propriedade para imunização com extrato protéico de *D. hominis* foi baseada na absorbância dos soros dos bovinos, usando o teste ELISA e obtidas em coletas semanais (TABELA 01). O período de coletas foi definido baseado nos dados de literatura sobre a sazonalidade e dinâmica populacional para a *D. hominis* (PINTO *et al*. 2002 e FERNANDES, 2004), sendo neste considerada baixa infestação e ficando compreendido entre 25 de junho e 15 de julho de 2007.

TABELA 01: ABSORBÂNCIA DOS SOROS BOVINOS FRENTE AO ANTÍGENO DE *Dermatobia hominis* NO TESTE ELISA, REALIZADO PARA A SELEÇÃO DOS BOVINOS A SEREM IMUNIZADOS NO PERÍODO DE 25 DE JUNHO A 15 DE JULHO.

	Coletas (data)				
animais	25/jun	2/jul	8/jul	15/jul	Média absorbância
1	0,120	0,134	0,117	0,123	0,124
2	0,151	0,149	0,135	0,167	0,151
3	0,202	0,184	0,214	0,198	0,200
4	0,187	0,171	0,142	0,158	0,165
5	0,179	0,135	0,153	0,127	0,149
6	0,097	0,124	0,098	0,101	0,105
7	0,164	0,154	0,159	0,161	0,160
8	0,286	0,254	0,237	0,246	0,256
9	0,208	0,198	0,215	0,194	0,204
10	0,220	0,203	0,178	0,186	0,197
11	0,135	0,116	0,110	0,108	0,117
12	0,304	0,287	0,293	0,281	0,291
13	0,284	0,276	0,291	0,249	0,275
14	0,088	0,112	0,097	0,103	0,100
15	0,174	0,186	0,169	0,183	0,178
16	0,162	0,177	0,163	0,143	0,161

Após a análise das absorbâncias os animais foram então dispostos em três grupos de acordo com a média das mesmas. Procurou-se estabelecer o critério de imunizar (grupos A e B) os animais com menor título de anticorpos para a *D. hominis*

além de escolher para esses grupos, animais que apresentassem características semelhantes quanto à pelagem e idade. Desta maneira os grupos ficaram dispostos de acordo com as TABELAS 02, 03 e 04.

TABELA 02: ABSORBÂNCIA DO TESTE ELISA, APRESENTADA PELOS ANIMAIS SELECIONADOS PARA O GRUPO A, EM COLETAS SEMANAIS, NO PERÍODO DE 25 DE JUNHO A 15 DE JULHO DE 2007.

Animais (Grupo A)	25/jun	2/jul	8/jul	15/jul
1	0,120	0,134	0,117	0,123
4	0,187	0,171	0,142	0,158
6	0,097	0,124	0,098	0,101
16	0,162	0,177	0,163	0,143

TABELA 03: ABSORBÂNCIA DOS SOROS DO TESTE ELISA, APRESENTADA PELOS ANIMAIS SELECIONADOS PARA O GRUPO B, EM COLETAS SEMANAIS, NO PERÍODO DE 25 DE JUNHO A 15 DE JULHO DE 2007.

Animais (Grupo B)	25/jun	2/jul	8/jul	15/jul
2	0,151	0,149	0,135	0,167
11	0,135	0,116	0,110	0,108
14	0,088	0,112	0,097	0,103
15	0,174	0,186	0,169	0,183

TABELA 04: ABSORBÂNCIA DO TESTE ELISA, APRESENTADA PELOS ANIMAIS SELECIONADOS PARA O GRUPO C, EM COLETAS SEMANAIS, NO PERÍODO DE 25 DE JUNHO A 15 DE JULHO DE 2007.

Animais (Grupo C)	25/jun	2/jul	8/jul	15/jul
3	0,202	0,184	0,214	0,198
5	0,179	0,135	0,153	0,127
7	0,164	0,154	0,159	0,161
8	0,286	0,254	0,237	0,246
9	0,208	0,198	0,215	0,194
10	0,220	0,203	0,178	0,186
12	0,304	0,287	0,293	0,281
13	0,284	0,276	0,291	0,249

A preparação do imunógeno a ser aplicado nos animais do grupo A foi realizada com base nos dados anteriormente estabelecidos por FERNANDES *et al.* 2007, ao imunizarem bovinos com extrato bruto de larvas. A dose para cada animal foi determinada em 4,76mg de proteína, por aplicação. Para o cálculo da proteína, foi recortada do gel de poliacrilamida a banda antigênica e após eletroeluição e diálise foi dosada a concentração protéica da amostra obtendo-se 1,19mg. Portanto, foram utilizados quatro géis de eletroforese para a extração da dose a ser inoculada em cada animal a ser imunizado. O volume da dose foi de 4,0 mL, acrescido do adjuvante completo de Freund na primeira imunização e do adjuvante incompleto nas imunizações subseqüentes.

Os animais do grupo B receberam imunização com o extrato bruto de larvas para que se pudesse comparar os efeitos da resposta imune em bovinos submetidos às mesmas condições e em região geográfica altamente infestadas pelo parasito, uma vez que, em experimento realizado por FERNANDES *et al*. (2007) os resultados foram obtidos numa região de baixa incidência de dermatobiose.

A cinética da produção de anticorpos contra a *D. hominis* foi acompanhada pela absorbância do teste de ELISA no soro dos animais, TABELA 05.

TABELA 05: ABSORBÂNCIA OBTIDA PELA TÉCNICA DE ENZIMOIMUNOENSAIO – ELISA E NÚMERO DE NÓDULOS DE LARVAS DE *Dermatobia hominis* OBSERVADOS EM BOVINOS, EM COLHEITAS QUINZENAIS, NO PERÍODO DE 15 DE SETEMBRO A 16 DE DEZEMBRO DE 2007.

Grupos	Animal	15/set		29/set		13/out		02/nov		17/nov		02/dez		16/dez	
		nód	D.O	nód	D.O	nód	D.O	nód	D.O	nód	D.O	nód	D.O	nód	D.O
A	1	0	0,134	0	0,389	0	0,425	0	0,664	2	0,694	9	0,815	5	1,026
	4	0	0,152	0	0,405	0	0,578	0	0,926	3	1,033	7	1,178	6	1,261
	6	0	0,103	0	0,381	0	0,437	0	0,469	2	0,503	2	0,497	1	0,481
	16	0	0,131	0	0,369	0	0,507	0	0,466	0	0,398	3	0,502	3	0,477
B	2	0	0,125	0	0,345	0	0,532	0	0,671	4	0,698	7	0,903	9	1,052
	11	0	0,102	0	0,315	0	0,427	1	0,735	5	0,908	6	0,878	11	1,178
	14	0	0,101	0	0,215	0	0,278	0	0,305	1	0,408	5	0,634	7	0,947
	15	0	0,188	0	0,194	0	0,315	0	0,578	5	0,874	8	1,085	10	1,003
C	3	0	0,183	2	0,193	5	0,209	18	0,304	11	0,215	25	0,408	17	0,398
	5	0	0,121	4	0,207	2	0,112	26	0,256	18	0,187	29	0,345	25	0,321
	7	0	0,154	0	0,189	8	0,215	15	0,222	19	0,195	27	0,209	15	0,187
	8	3	0,241	6	0,292	2	0,198	19	0,215	23	0,232	34	0,348	30	0,329
	9	0	0,187	2	0,190	3	0,213	38	0,412	27	0,398	39	0,330	29	0,224
	10	0	0,162	9	0,242	5	0,379	42	0,525	33	0,561	62	0,494	45	0,538
	12	2	0,279	7	0,328	4	0,298	8	0,287	14	0,229	31	0,367	27	0,304
	13	1	0,225	4	0,257	11	0,302	29	0,455	12	0,364	26	0,397	29	0,415

Quanto a cinética de anticorpos apresentada pelos animais nos diferentes grupos, foi possível estabelecer curva de regressão significativamente diferente ($p<0,05$) para os três grupos, de acordo com as coletas realizadas, como mostra a FIGURA 01.

Quando se analisa o número de nódulos e os valores de absorbância (TABELA 05) do teste ELISA, é possível verificar que alguns animais apresentam valores menores ou maiores que o esperado em função do número de nódulos, levando em consideração o valor do "cut-off", que ficou estabelecido em 0.190. Isto fez com que os valores encontrados não assumissem uma distribuição normal, por esse motivo, optou-se por analisar o comportamento de cada grupo em relação ao teste em função do número de nódulos. Os dados do teste ELISA foram ajustados para a curva de regressão.

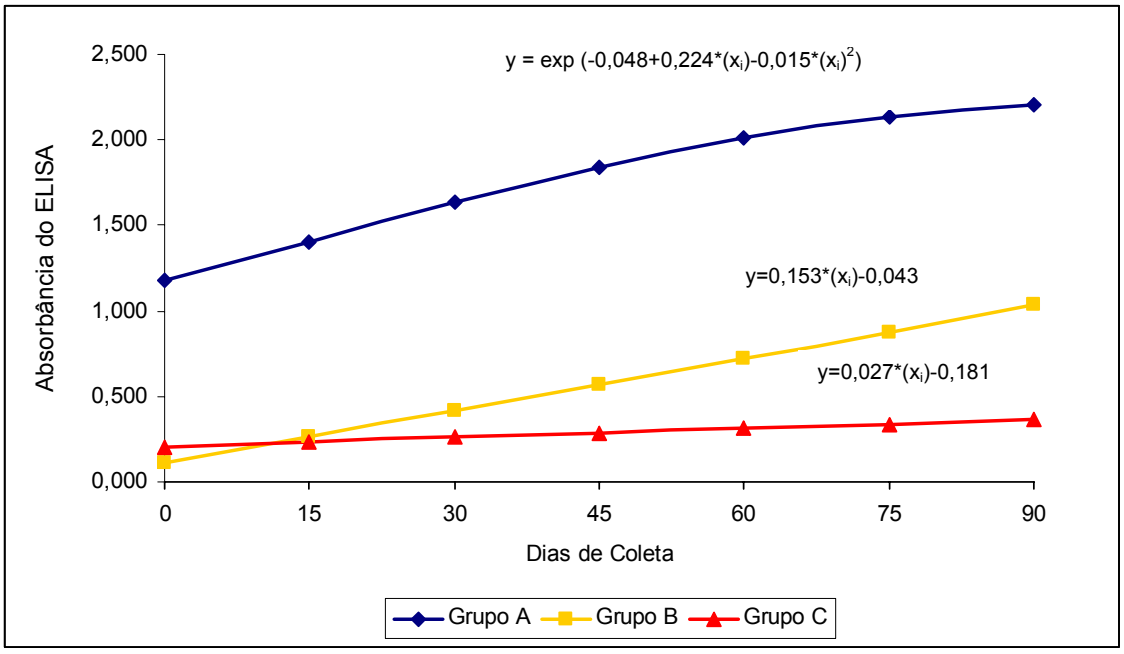


FIGURA 02: Comparação das absorbâncias da reação antígeno-anticorpo, através do teste ELISA, distribuídas ao longo das colheitas quinzenais de sangue, em bovinos imunizados e no grupo controle.

O comportamento dos anticorpos nos bovinos imunizados com a proteína Dh50 (grupo A) e os animais imunizados com o extrato bruto (grupo B) em relação ao longo do período experimental foi estatisticamente diferente dos animais do grupo C ($p<0,05$). A variação na produção de anticorpos durante o período do experimento (FIGURA 02), pode ser facilmente observada quando comparadas às curvas de regressão estabelecidas para os diferentes tratamentos, onde os animais do grupo

controle, apesar de mostrarem uma curva de regressão linear, mantiveram seus resultados de absorbância inferior aos grupos imunizados.

O número de nódulos cutâneos observados em cada tratamento (TABELA 06) foi distinto ($p<0,01$) para os três grupos de animais. O grupo A, animais que receberam a proteína antigênica apresentou 4,2% dos nódulos cutâneos totais, o grupo B, que recebeu o extrato bruto de larvas, 7,6% e o grupo controle apresentou 88,2% dos nódulos.

TABELA 06: NÚMERO DE NÓDULOS CUTÂNEOS DE *D. hominis* ENCONTRADOS NOS ANIMAIS DE CADA GRUPO EXPERIMENTAL, DE ACORDO O DIA DE COLETA

Coletas	Número de nódulos		
	Proteína (Grupo A)	**Atg bruto (Grupo B)**	**Controle (Grupo C)**
15/set	0	0	6
29/set	0	0	34
13/out	0	0	40
2/nov	0	1	195
17/nov	7	15	157
2/dez	21	26	273
16/dez	15	37	217
Total	**43**[b]	**79**[b]	**922**[a]

Valores seguidos de letras diferentes, na linha, diferem significativamente ($p<0,01$) pelo teste de Tukey.

Esses resultados comprovam uma eficiência da imunização dos animais com a proteína Dh50 de 91% em relação aos animais que não receberam o imunógeno.

4. DISCUSSÃO

A utilização de animais de laboratório para o acompanhamento dos resultados de uma vacina, é particularmente atraente devido à disponibilidade de vários modelos de ensaios imunológicos para estudos. No entanto, dado a variabilidade nas respostas imunes de diferentes espécies, animais de laboratório nunca serão um substituto para a realização de ensaios na espécie em questão e podem até mesmo fornecer enganosa informação (DALTON e MULCAHY, 2001). Os testes de campo, realizados com a espécie para qual o antígeno foi desenvolvido, são de fundamental importância não só para a avaliação e caracterização da proteção efetiva de uma vacina, como também pela avaliação da segurança das mesmas. Diante deste quadro, optou-se por imunizar bovinos com extratos de larvas de *D. hominis* numa propriedade rural voltada à exploração mista de carne e leite, com baixos índices técnicos de produtividade e com altos níveis de infestação por dermatobiose.

A seleção dos animais para a formação dos grupos foi realizada de maneira que em cada grupo houvesse animais com características similares de pelagem e idade. De acordo com vários autores (BELATO *et al*.,1986; BRITO *et al*., 2001; PINTO *et al*., 2002; MOZZAQUATRO e SANAVRIA 2003 e FERNANDES *et al*., 2007) animais com pelagem escura são mais predispostos a infestação por larvas de *D. hominis* e ainda por se tratar de um rebanho com animais de faixa etária distinta, teve-se a preocupação de manter em cada grupo, animais de idade aproximada. O declínio das respostas imune celular e humoral, de acordo com a evolução da idade são descritos por diversos autores (LINTON e DORSHKIND, 2004; MURASKO e JIANG, 2005). Este declínio é um problema clínico significativo porque os idosos se tornam altamente sensíveis à infecção e, simultaneamente, tendem a ser menos adequados para dar resposta às vacinas.

O desencadeamento da resposta imunológica aos antígenos de ectoparasitos, permitiu que os hospedeiros se tornassem mais capazes de tolerar ou minimizar os danos causados. Assim, tem sido sugerido que o período prolongado de co-evolução entre o parasito e seu hospedeiro resulta em associação de reduzida patogenicidade (BOYCE e WEISENBERGER, 2005)

Outro critério importante estabelecido, neste trabalho, para a seleção dos animais foi o título de anticorpos pré-existentes contra antígenos de larvas de *D.*

hominis, determinado pela média das absorbâncias obtidas na análise do teste de enzimoimunoensaio. Este teste já havia sido padronizado por FERNANDES *et al*. (2007) em imunizações de bovinos. Foram selecionados para imunização os animais que apresentaram títulos mais baixos de anticorpos contra a *D. hominis*, permitindo que a cinética de anticorpos após a imunização possa ser melhor avaliada, sem a influência de anticorpos pré-existentes.

Buscou-se também trabalhar com animais mestiços e sem raça definida criados em condições de campo e com baixa tecnologia, uma vez que a seleção de animais geneticamente superiores para as características produtivas, combinada as melhores práticas de manejo do rebanho, têm trazido um importante aumento da susceptibilidade a ectoparasitos (WALL, 2007).

O período para o início da imunização dos animais foi escolhido de acordo com vários estudos envolvendo a dinâmica populacional da *D. hominis* (MAIA e GUIMARÃES, 1985; RIBEIRO *et al.*, 1989; PINTO *et al*., 2002; MAIO *et al.,* 2002 e MOZZAQUATRO e SANAVRIA *et al*., 2003). Estes autores encontraram para diversas regiões geográficas, uma mesma característica de distribuição populacional, com maior ocorrência de nódulos de *Dermatobia hominis* nos animais, nos meses de primavera e verão, com pico no mês de novembro e diminuição do número de nódulos nos meses de junho e julho. Desta maneira, a realização das imunizações neste período permite alcançar o nível máximo de produção de anticorpos antes do pico populacional de parasitos.

Sob o controle de todas estas variáveis mencionadas foi possível atribuir ao tratamento composto por uma fração antigênica purificada do extrato de larvas de *D. hominis* a melhor resposta dos animais imunizados. Apesar de que os animais que receberam imunização com o extrato bruto de larvas L_3 de *D. hominis*, também conferiu imunidade aos animais, visto o baixo número de nódulos contados, semelhantes ao grupo que recebeu a proteína Dh50. Antígenos brutos preparados com extrato total de larvas podem apresentar melhor resposta imune, como foi encontrado por GINGRICH (1982), ao avaliar a sobrevivência de larvas de *Hypoderma* spp em animais imunizados com extrato bruto de larvas.

A cinética de produção de anticorpos presentes no soro de animais naturalmente infestados, que reagiram especificamente com as proteínas purificadas e com o extrato bruto de larvas, foi avaliada pelo método ELISA indireto. Esses dados podem ser comparados aos obtidos por FERNANDES *et al*. (2007), onde

comprovaram que os animais não imunizados apresentaram absorbâncias abaixo do valor do nível de corte, ou seja, considerados negativos, o que indica que um pequeno número de nódulos de larvas, não é suficiente para induzir a formação de anticorpos em níveis adequados. Entretanto, os animais do grupo C (controle, não imunizados) apresentaram absorbâncias acima do nível de corte, pelo fato de estarem infestados por um grande número de larvas.

O desenvolvimento de vacinas contra parasitos inicialmente foi embasado na utilização de extratos brutos de larvas ou até mesmo dos diversos estádios dos parasitos adultos. Na última década essas vacinas têm sido obtidas a partir de glicoproteínas, carbohidratos ou proteínas antigênicas, que passariam a ser produzidas pelo processo da proteína recombinante (CRAMPTON e VANNIASINKAM, 2007). Embora todo o organismo que origina uma vacina recombinante possa conter a mesma característica antigênica, o processo pelo qual a proteína recombinante é produzida poderia resultar na perda das características estruturais cruciais à imunogenicidade dessa proteína, em seu estado nativo (HEIN e HARRISON, 2005). Assim, a vacina recombinante pode ser menos eficaz do que o conjunto do organismo à base de vacina.

A maioria das vacinas parasitárias são vacinas vivas que estimulam uma reação imune no hospedeiro, mimetizando a infecção natural. As vacinas atualmente disponíveis são baseadas em frações antigênicas do parasito. Apenas uma vacina contra uma ectoparasitose está atualmente disponível, que é contra o carrapato bovino *Boophilus microplus*, baseada em uma proteína recombinante (Bm86). A proteína antigênica utilizada para a vacina está presente no intestino do carrapato.

Além da identificação de antígenos protetores, o estudo da indução de imunidade tem recebido especial atenção por pesquisadores. O número de genomas seqüenciados aumenta rapidamente e oferecem a perspectiva de identificar possíveis alvos para a produção de vacinas. Abordagens proteômicas também poderiam ser utilizadas para definir interações entre proteínas de um parasito e respostas imunes efetoras (DALTON, *et al.*, 2003).

Os fatores que podem influenciar no resultado das vacinas, em relação aos parasitos, incluem: dose do antígeno, número de doses aplicadas, tipo do adjuvante e local de administração. Ainda pode haver influência de outros patógenos, se indivíduos que receberam uma vacina, estiverem infectados por outros agentes patogênicos, estes podem prejudicar a produção de células de defesa Th1 e Th2 e

dificultar a produção de anticorpos pelo hospedeiro (DALTON e MULCAHY, 2001). Células Th1 são responsáveis por coordenar a resposta celular mediada por macrófagos ativados considerados mais importantes para a proteção contra protozoários parasitos, já as células Th2, pela resposta envolvendo mastócitos, eosinófilos e IgE que são importantes para resistência à helmintos.

As células T devem ser capazes de proliferar, produzir citocinas e ter possibilidade de migrar para o local requisitado. Além disso, a população de céluas T deve expressar um diversificado leque de receptores para assegurar o reconhecimento dos antígenos adequados (WOODLAND e BLACKMAN, 2006).

A saliva ou as fezes dos ectoparasitos podem produzir antígenos, estimulando respostas imunes em alguns indivíduos levando a hipersensibilidade (VAN DEN BROEK *et al*., 2003). Diversos trabalhos têm sido realizados com o objetivo de caracterizar essas respostas a fim de selecionar antígenos candidatos ao desenvolvimento de vacinas contra ectoparasitos. A vacinação contra infecções parasitárias ainda é ineficaz, apesar de décadas de pesquisas e milhões de dólares investidos. Uma razão é que as infecções parasitárias, contrariamente aos causadas por vírus ou bactérias patogênicas, tendem a ser crônicas. Isto é, em primeiro lugar, porque muitas vezes os parasitos podem suscitar uma resposta imune inadequada e ineficaz no hospedeiro, ou atenuar o seu sistema imune, impedindo assim uma sólida e eficaz resposta imunológica pelo reconhecimento de antígenos (COX, 1997).

Além disso, parasitas muitas vezes exibem diversas estratégias de evasão à resposta imune, como a variação antigênica, molecular ou de mimetismo, tanto no plano individual como da população afetada. Além disso, eles exibem um complexo ciclo de vida com características biológicas que dificultam o desenvolvimento de uma vacina contra eles (GOOD *et al*., 2004).

Um mecanismo de proteção, desencadeado pelo artrópode, para desativar o sistema imunológico inato e adaptativo do hospedeiro, que agiria no seu epitélio intestinal, é formado ao redor da membrana peritrófica dos insetos hematófagos (SHAO *et al*. 2001). A membrana peritrófica é uma estrutura anatômica em forma de filme, composta de quitina e proteínas (peritrofinas), que separa o alimento do epitélio do intestino médio. Esta membrana protege o epitélio de microorganismos e da abrasão, e possui outras funções baseadas no fato de que a membrana peritrófica promove a compartimentalização de enzimas, que incluem: aumento da

eficiência digestiva através da diminuição da taxa de excreção das enzimas, além de anular a inibição de enzimas envolvidas na digestão terminal, presentes na superfície do epitélio, impedindo que o alimento entre em contato com elas (BOLOGNESI, 2005).

Os mecanismos de defesa do parasito representam um aumento da pressão de seleção por polimorfismos, havendo diferentes epítopos antigênicos e consequentemente alterando a antigenicidade de substâncias que poderiam ser selecionadas como candidatas a vacinas (TRIMNELL *et al*., 2005).

Contudo, na maior parte dos casos, as infecções parasitárias conferem imunidade à subseqüentes infecções quando o mesmo parasito invade o hospedeiro, demonstrando assim o potencial de uma estratégia vacinal (SCOTT, 2005).

A parasitose causada por *Lucilia* spp é uma miíase cutânea de ovinos que ocorre principalmente na Austrália, Nova Zelândia, África do Sul e Reino Unido, trazendo prejuízos muito significativos, principalmente para a indústria de lã (ELKINGTON *et al.*, 2007). Vários mecanismos de controle para esta ectoparasitose foram desenvolvidos, mas todos sem o sucesso esperado. Uma solução intermédia seria uma vacina eficaz. Embora tenham sido utilizados recursos significativos para o desenvolvimento de uma vacina contra esta ectoparasitose, ainda não houve qualquer sucesso comercial (COLDITZ *et al*., 2006)

As dificuldades com a concepção e desenvolvimento de uma vacina contra a miíase nos ovinos estão relacionadas com a inexistência de relatos da imunidade protetora observada em condições de campo. Nenhuma das estratégias de imunização que avaliaram a capacidade de produção de anticorpos, para retardar sobrevivência larval apresentaram resultados satisfatoriamente positivos, para justificar a necessidade de progressos na direção de uma vacina comercial (ELKINGTON, *et al*, 2007).

Convém evidenciar que vários antígenos preparados com os diferentes instares de larvas de *L. cuprina*, foram usados para elevar os níveis séricos de IgG, além de preparados com antígenos de secreção/excreção e serino-proteases purificadas, tendo este ultimo alcançado os maiores títulos. Entretanto todos os resultados satisfatórios só foram obtidos com experimentos *in vitro*.

A principal justificativa para o fracasso dos experimentos à campo está apoiada na demora para a produção de anticorpos.O tempo necessário para o

anticorpo específico atingir o seu pico é consideravelmente mais longo do que o tempo despendido pelas larvas, para estabelecer uma substancial ferida na pele de ovinos (EAST *et al*.,1992).

Outro ponto importante a ser questionado no sucesso de uma vacina é a via de administração do imunógeno. Experimentos realizados contra infestações por *Lucilia* spp, em ovinos demonstraram resultados satisfatórios apenas quando a via nasal foi utilizada para a aplicação. Ovelhas que receberam aplicação de imunógenos por via subcutânea ou por via intradérmica, não apresentaram resposta imune satisfatória. Como as miíases são larvas que atuam na superfície da pele, a resposta mediada por IgE tem papel mais ativo e é melhor desencadeada quando estimulada pelas mucosas, como no caso da aplicação de antígeno via intranasal (HAGEL *et al*., 2004)

As serino proteases secretadas pelas larvas de *Hypoderma lineatum* foram identificadas como responsáveis pela lise do colágeno e da fibrina, além de participar da imunomodulação. A principal serino protease caracterizada é a hipodermina, responsável pela inibição do início da memória imunológica, reduzindo o número de linfócitos no hospedeiro (CHABAUDIE e BOULARD, 1992).

A utilização de produtos químicos para o tratamento de infecções parasitárias não é sustentável a longo prazo, devido ao aparecimento de parasitos resistentes aos medicamentos. Os resíduos químicos nos alimentos aumentaram as preocupações dos consumidores sobre o que estão ingerindo. Também há preocupações indesejáveis sobre como esses resíduos podem afetar o meio ambiente (DALTON e MULCAHY, 2001).

Um marco importante no desenvolvimento de vacina contra ectoparasitos foi o lançamento da primeira vacina obtida por engenharia genética, expressa em *E. coli*, TickGardTM®, produzida pela Biotech - Austrália, contra o carrapato bovino *Boophilus microplus* (WILLADSEN et al., 1995). Uma vacina recombinante semelhante, GavacTM®, produzido na levedura *Pichia pastoralis*, foi desenvolvida em Cuba e comercializadas por Heber Biotec AS (GARCIA-GARCIA *et al*., 2000).

A vacina induz a formação de anticorpos que se ligam à molécula Bm86 nas células intestinais causando lise das mesmas, assim, interfere diretamente nas condições de alimentação do carrapato. Contudo, a vacina não tem efeito imediato sobre o número de carrapatos (infestação pode ser reduzida em 20-30%), mas prejudica a capacidade reprodutiva das fêmeas. Ao longo do tempo, a utilização da

vacina pode reduzir o número de carrapatos sobreviventes entre as gerações em 70-90%. A principal vantagem da vacina é a redução da dependência em relação ao uso de acaricidas (DALTON e MULCAHY, 2001).

Atualmente existe uma variação bastante grande do número de animais que respodem satisfatoriamente à vacina, contra o antígeno Bm86, os animais pouco ou não responsivos à imunização contribuiriam para o restabelecimento da população de carrapatos. A solução para tal problema foi a inclusão de novos antígenos na vacina, a molécula Bm95, deu origem a nova vacina, TickGard PlusTM®, garantindo uma maior e mais longa duração da resposta imune (GARCIA-GARCIA, 2000).

Muitas vacinas podem encontrar a suas maior e mais imediata aplicação no controle estratégico integrado. A oportunidade do uso das vacinas juntamente com o controle químico, pode causar sinergismo, levando a uma redução no uso de parasiticidas. Há indícios de que lactonas macrocíclicas aplicadas aos carrapatos em bovinos vacinados, são muito mais eficazes do que quando usadas isoladamente. É possível que a vacina, ao induzir danos ao tubo digestório durante a alimentação, também facilite a penetração do acaricida (PIPANO *et al*., 2003).

Há uma série de vacinas que estão em desenvolvimento, contra outros ectoparasitas, como *Hematobia irritans*, *Chrysomya bezziana*, *Pediculus humanos*, *Lucilia cuprina* e *Hypoderma lineatum*, sendo esta ultima licenciada para comercialização (DALTON e MULCAHY, 2001). Um dos grandes problemas para o desenvolvimento de vacinas contra parasitos é a falta do interesse comercial. Algumas vacinas já desenvolvidas obtiveram excelentes resultados de eficácia, mas ainda são pouco comercializadas. Um exemplo deste quadro é a vacina contra o *Dictyocaulus viviparus* (helminto) que é extremamente eficaz contra as infecções em bovinos, mas apresenta algumas desvantagens, como exigir a freqüente exposição dos bovinos à infecção natural (SMITH e ZARLENGA, 2006) e ineficaz na proteção de outros hospedeiros, como os veados (JOHNSON *et al.*, 2003). Outra vacina desenvolvida contra o *Echinococcus granulosus* (helminto) também é bem sucedida, mas a permanência da imunidade tem curto período (GAUCI *et al*., 2005)

Estes problemas talvez sejam os responsáveis pelo pouco estudo em relação ao parasitismo pela a *D. hominis*. Experimentos comprovando a resposta imunológica de animais infestados têm sido realizados na tentativa de elucidar os mecanismos efetores dessa resposta. Larvas de *D. hominis* infestando coelhos previamente imunizados induziram o aumento de títulos de anticorpos, mais rapidamente do que nos coelhos não imunizados. Estes títulos mantiveram-se ainda altos mesmo depois das larvas de terceiro estádio terem abandonado o hospedeiro

(PERAÇOLI *et al.*,1980 ;LELLO e PERAÇOLI ,1993). Esses resultados corroboram com o presente experimento onde os resultados confirmam existir diferença no padrão da resposta imune entre os animais infestados naturalmente e os imunizados, concordando com os resultados encontrados por FERNANDES *et al*. (2007).

LELLO e BOULARD (1990) comprovaram a melhor resposta humoral de coelhos imunizados com antígenos utilizando larvas L_2 e L_3, do que em animais onde foram aplicados antígenos preparados com apenas um estádio larval (L_1 ou L_2 ou L_3). Os extratos preparados com apenas um estádio larval não produzem resposta anamnésica, ou quando o fazem, esta apresenta títulos muito baixos e pouco duradouros.

Embora o tratamento convencional para o controle de parasitas possa ser eficaz, preocupações de ordem pública a cerca dos resíduos químicos nos produtos de origem animal são constantes. Por esta razão, as vacinas vêm se constituindo em importante estratégia no controle das parasitoses (CRAMPTON e VANNIASINKAM, 2007).

5. CONCLUSÕES

- Os extratos obtidos a partir de larvas de *Dermatobia hominis* foram imunogênicos para bovinos;

- A proteína de 50 kDa, extraída do extrato bruto de *D. hominis*, mostrou ser um antígeno candidato bastante promissor à produção de vacina efetiva contra a dermatobiose;

- O número de nódulos de larvas de *Dermatobia hominis* encontrado nos animais do grupo controle foi extremamente mais alto, em relação aos animais imunizados;

- A imunização de bovinos com a proteína Dh50 comprovou uma eficiência de 91% no controle da infestação pela *D. hominis*. Estes resultados indicam que as perspectivas de obtenção do controle da dermatobiose, através vacinação, podem ser alcançadas.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A erradicação completa dos parasitos, principalmente pelo uso de substâncias químicas, não é uma prática sustentável ou opção economicamente viável. Sem uma estratégia elaborada, limitada geograficamente, o uso indiscriminado de inseticidas, na melhor das hipóteses, só contribuiria para a seleção de parasitos resistentes (WALL, 2007).

A preocupação com a saúde humana e ambiental, pela utilização de compostos neurotóxicos, como os organoclorados, organofosforados e piretróides, tem contribuído para retirada gradual e restrição em algumas áreas de todo o mundo (EISLER *et al.*, 2003). Esta tendência tem sido contrabalançada pelo desenvolvimento de novas drogas inócuas ao meio ambiente com princípios ativos como, o Fenilpirazol e o Cloronicotinil. No entanto, o rápido desenvolvimento e disseminação da resistência adquirida aos inseticidas já atingem a maioria dos grandes grupos de ectoparasitos (BOSSARD *et al*., 2002; JAMES, 2002). A ameaça da resistência aos medicamentos existentes é provavelmente a principal motivação para o desenvolvimento de vacinas contra ectoparasitos (VERCRUYSSE *et al*., 2004).

O desenvolvimento de uma vacina comercial é um processo longo e difícil, além disso, a produção de imunobiológicos nem sempre é atrativa frente às estratégias agressivas de vendas dos produtos químicos (HOMMA *et al*., 2003), os quais geram mais lucros às grandes empresas do setor.

A vantagem das vacinas é que não deixam resíduos químicos, portanto são de utilização aceitável para o meio ambiente. Grandes empresas têm investido no desenvolvimento de tecnologias para a obtenção de vacinas, muito embora, o uso de determinadas drogas ainda traga uma margem de lucro mais vantajoso além da aplicação desses produtos, muitas vezes, ser mais fácil. Cada um desses fatores apresenta um grande desafio para os cientistas envolvidos no desenvolvimento de vacinas.

O conhecimento epidemiológico de uma parasitose permitirá desenvolver programas estratégicos de controle parasitário com o uso das vacinas. Mesmo que ela num primeiro tempo, não seja comercialmente atraente, seu uso pode ser importante em programas de controle integrado, o que resultará, ao longo do tempo,

na redução da população de parasitos com menos utilização de produto químico ou até mesmo sem o seu uso.

DALTON e MULCAHY (2001) destacam que os elementos científicos que irão tornar as vacinas contra parasitos uma realidade, são o profundo conhecimento da biologia e fisiologia dos mesmos, ou seja, como se alimentam, como sobrevivem no hospedeiro, como realizam a penetração nos tecidos e como evitam o reconhecimento pelo sistema imune do hospedeiro. Será necessário elucidar a interação parasito–hospedeiro para que a busca de antígenos candidatos permita o desenvolvimento de uma vacina.

Entretanto, o avanço do conhecimento de técnicas aplicadas na biotecnologia de vacinas como isolamento e clonagem de proteínas, seqüênciamento de DNA, reação em cadeia de polimerase (PCR) e expressão de proteínas recombinantes são fundamentais no desenvolvimento de novas vacinas. O número de seqüências genéticas na base de dados tem aumentado significativamente e fornece informações importantes na busca por moléculas ou genes que desempenham funções biológicas essenciais e possam ser utilizadas como antígenos (KNOX *et al*., 2001).

Ao longo dos últimos 15 anos, os avanços científicos obtidos com o isolamento e caracterização de proteínas, as técnicas imunológicas e os métodos de clonagem genética, puderam proporcionar a produção de várias vacinas contra os parasitos. Muitas dessas vacinas já estão no mercado mas todas ainda apresentam deficiências, nos resultados obtidos ou no modo de obtenção industrial.

Os resultados obtidos no presente experimento contribuem para o acúmulo de informações importantes para o processo de produção de vacina contra a dermatobiose. De posse destas informações, nosso grupo vem dando continuidade na pesquisa visando a extração do RNA das larvas de terceiro estádio de *D. hominis* para a construção de biblioteca de cDNA. O isolamento e amplificação de fragmentos do DNA poderiam então ser clonados para a produção de proteína recombinante.

Neste presente trabalho foi possível delinear três primers aleatórios na tentativa de obter a amplificação dos mesmos. A dificuldade existente para a clonagem e expressão da proteína imunogênica deve-se a inexistência do genoma da *D. hominis*. O conhecimento do genoma contribuirá sobremaneira com a obtenção de uma vacina efetiva para o controle da dermatobiose.

É importante ressaltar que o conhecimento a cerca dos mecanismos de antigenicidade deste parasito ainda é muito pequeno e por isso mais pesquisas devem ser desenvolvidas buscando responder a estas questões.

7. REFERÊNCIAS

BARBOSA, C. G.; SANAVRIA, A; FREIRE, R. B. Humoral immune response in cattle experimentally infested with larvae of *Dermatobia hominis.* **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 3, p. 449-453, 2000.

BARON, R. W.; COLWELL, D. D. Enhanced resistence to catle grup infestation (*Hipoderma lineatum*, de Vill) in calves immunized with purified hypodermin A, B and C plus monophosphoril lipid A (MPL). **Veterinary Parasitology**, Madison, v. 38, p. 185-197, 1991.

BELKAID, Y.; SUN, C. M.; BOULADOUX, N. Parasites and immunoregulatory T cells. **Current Opinion in Immunology**, Amsterdam, v. 18, p. 406–412, 2006.

BELLATO, V.; PALOSCHI, C. G.; SOUZA, A. P.; RAMOS, C. I.; SARTOR, A. A. Variação sazonal das larvas da mosca de berne em bovinos no planalto catarinense. **Comunicado Técnico - EMPASC**, Florianópolis, n. 101, p. 1-7, 1986.

BOYCE, W. M.; WEISENBERGER, M. E. The rise and fall of psoroptic scabies in bighorn sheep in the San Andres Mountains. New Mexico. **Journal of Wildlife Diseases**, Laramie, v. 41, p. 525–31, 2005.

BOLOGNESI, R. **Síntese, degradação e funções da membrana peritrófica dos insetos**. São Paulo, 2005, 117f. Tese Doutorado, Instituto de Química. Universidade de São Paulo.

BOSSARD, R. L.; DRYDEN, M. W.; BROCE, A. B.; Insecticide susceptibility of cat fleas (Siphonaptera: Pulicidae) from several regions of the United States. **Journal of Medical Entomology**, Oxford, v. 39, 742–46, 2002.

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

BRITO, L. G; PAES, M. J.; BORJA, G. E. M. Infestação artificial e desenvolvimento larval de *Dermatobia hominis* (L.Jr., 1781) (Diptera: Cuterebridae) em suínos e eqüinos. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 48, n. 277, p. 401-403, 2001.

BROWN, S. J.; KRINSKY, W. L.; ASKENASE, P. W. *Ixodes dammini:* Induced skin lesions in guinea pigs and rabbits compared to erythema chronicum migrans in patients with lyme arthritis. **Experimental Parasitology**, Amsterdam, v 53, n. 3, p. 381-395, 1982.

BROWN, S. J.; ASKENASE, P. W. *Rhipicephalus appendiculatus:* Larval feeding sites in guinea pigs actively sensitized and receiving immune serum**. Experimental Parasitology**, Amsterdam, v 55, n. 1, p. 111-120, 1983.

BROWN, S. J.; BAGNALL, B. G.; ASKENASE, P. W.*Ixodes holocyclus:* Kinetics of cutaneous basophil responses in naive, and actively and passively sensitized guinea pigs. **Experimental Parasitology**, Amsterdam, v. 57,n. 1, p. 40-47,1984.

BROWN, S. J.; ASKENASE, P. W. *Amblyomma americanum:* Requirement for host Fc receptors in antibody-mediated acquired immune resistance to ticks. **Experimental Parasitology**, Amsterdam, v. 59,n. 2, p. 248-256, 1985.

CHABAUDIE, N; BOULARD, C. Effect of hypodermin A, an enzyme secreted by *Hypoderma lineatum* (Insect Oestridae), on the bovine immune system. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Oxford, v.;31, n. 1-2, p. 167–77. 1992.

COLDITZ, I. G.; MAHONY, T; ELKINGTON, R. Using immunology and resistant sheep to beat the fly. **International Journal of Sheep and Wool Science**, Armidale, v. 54, n. 2, p.22-6, 2006.

COX, F. E. Designer vaccines for parasitic diseases. **International Journal for Parasitology**, Amsterdam, v. 27, p. 1147-57, 1997.

CRAMPTON, A.; VANNIASINKAM, T. Parasite vaccines: The new generation Infection. **Genetics and Evolution**, British Columbia, v. 7, p. 664–73, 2007.

DALTON, J. P.; MULCAHY, G. Parasite vaccines - a reality? **Veterinary Parasitology**, Madison, v. 98, p. 149–67, 2001.

DALTON, J. P.; BRINDLEY, P. J.; KNOX, D. P.; BRADY, C. P.; HOTEZ, P. J.; DONNELLY, S.; O'NEILL, S. M.; MULCAHY, G.; LOUKAS, A. Helminth vaccines: from mining genomic information for vaccine targets to systems used for protein expression. **International Journal for Parasitology**, Amsterdam, v. 33, p. 621-40, 2003.

EAST, I. J; EISEMANN, C. H.; VUOCOLO, T; PEARSON, R. D.; DONALDSON, R. A; CADOGAN, L. C. Vaccines against blowfly strike: the effect of adjuvant type on vaccine effectiveness. **International Journal for Parasitology**, Amsterdam, v. 22, n. 3, p. 309-14, 1992.

EISLER, M. C.; TORR, S. J.; COLEMAN, P. G.; MACHILA, N.; MORTON, J. F. Integrated control of vector-borne diseases of livestock - pyrethroids: panacea or poison? **Trends Parasitology**, London, v. 19, p. 341–45, 2003.

ELKINGTON, R. A.; MAHONY, T. J. A blowfly strike vaccine requires an understanding of host–pathogen interactions. **Vaccine**, Guildford, v .25, n. 28, p. 5133–45, 2007.

ELVIN, C. M.; VUOCOLO, T.; PEARSON, R. D.; EAST, I. J.; RIDING, G. A.; EISEMANN, C. H.; TELLAM, R. L. Characterization of a major peritrophic membrane protein, peritrophin-44, from the larvae of *Lucilia cuprina*. **Journal of Biology and Chemistry**, Bethesda, v. 271, p. 8925–35, 1994.

FERNANDES, N. L. M.; THOMAZ-SOCCOL, V.; PINTO, S. B.; MINOZZO, J. C.; OLIVEIRA, C. A. L. Resposta imune-humoral e celular em bovinos da raça Nelore imunizados com extrato de larvas (L2 e L3) de *Dermatobia hominis* (Linnaeus Jr., 1781). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 3, p. 789-795, 2007.

GARCIA-GARCIA, J. C.; MONTERO, C.; REDONDO, M.; VARGAS, M.; CANALES, M.; BOUE, O.; RODRIGUEZ, M.; JOGLAR, M.; MACHADO, H.; GONZALEZ, I. L.; VALDES, M.; MENDEZ, L.; DE LA FUENTE, J. Control of ticks resistant to immunization with Bm86 in cattle vaccinated with the recombinant antigen Bm95 isolated from the cattle tick, *Boophilus microplus*. **Vaccine**, Guildford, v. 18, p. 2275–87, 2000.

GAUCI, C.; HEATH, D.; CHOW, C.; LIGHTOWLERS, M. W. Hydatid disease: vaccinology and development of the EG95 recombinant vaccine. **Expert Review of Vaccines**, London, v. 4, p. 103-12, 2005.

GINGRICH, R.E. Acquired resistente to *Hypoderma lineatum*: comparative immune response of resistant and susceptible cattle**. Veterinary Parasitology**, Madison, v. 9, p. 233-242, 1982.

GILMOUR, A.R.; GOGEL, B.J.; CULLIS, B.R.; WELHAM, S.J.;THOMPSON, R. **ASRemL User Guide Release 1.0**. Hemel Hempstead, United Kingdom, 2002. HP1 1ES, ISBN 1-904375-07-3

GOOD, M. F.; STANISIC, D.; XU, H.; ELLIOTT, S.; WYKES, M. The immunological challenge to developing a vaccine to the blood stages of malaria parasites. **Immunology Review**, Oxford, v. 201, p. 254-267, 2004.

HAGEL, I; DI PRISCO, M. C.; GOLDBLATT, J; LE SOUEF, P. N. The role of parasites in genetic susceptibility to allergy: IgE, helminthic infection and allergy, and the evolution of the human immune system. **Clinical Reviews in Allergy and Immunology**, New York, v. 26, n. 2, p. 75-83, 2004.

HEIN, W. R.; HARRISON, G. B. L. Vaccines against veterinary helminths. **Veterinary Parasitology**, Madison, v. 132, p. 217–22, 2005.

HOMMA, A; MARTINS, R. M.; JESSOUROUM, E.; OLIVA, O. Technological development: a weak link in vaccine innovation in Brazil. **História, Ciências, Saúde - Manguinhos**, Rio de Janeiro, v. 10, s. 2, p. 671-96, 2003.

HUNKAPILLER, M. W.; LUJAN, E.; OSTRANDER, F.; HOOD, L. E. Isolation of microgram quanties of proteins from polyacrylamide gels for amino acid sequence analysis. **Methods Enzymology**, Oxford, v. 91, p. 227-36, 1983.

JANEWAY Jr., C.A.; TRAVERS, P. **Imunobiologia: o sistema imunológico na saúde e na doença**, 2. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997.

JAMES, P. J. Sheep lice: changing control practices and wool industry implications. **International Journal of Sheep and Wool Science**, Armidale, v. 50, p. 567–73, 2002.

JOHNSON, M.; LABES, R. E.; TAYLOR, M. J.; MACKINTOSH, C. G., 2003. Efficacy trial of an irradiated cattle lungworm vaccine in red deer (Cervus elaphus). **Veterinary Parasitology**, Madison, v. 117, p. 131–37, 2003.

JOHNSTON, L. A.; EISEMANN, C. H.; DONALDSON, R. A.; PEARSON, R. D.; VUOCOLO, T. Retarded growth of *Lucilia cuprina* larvae on sheep and their sera following production of an immune response. **International Journal for Parasitology**, Amsterdam, v. 22, n. 2, p. 187–93, 1992.

KNOX, D. P.; REDMOND, D. L.; SKUCE, P. J.; NEWLANDS, G. F. J. The contribution of molecular biology to the development of vaccines against nematode and trematode parasites of domestic ruminants. **Veterinary Parasitology**, Madison, v.78 , p. , 2001.

LAMOREAUX, W. J.; NEEDHAM, G. R.; COONS, L. B. Evidence that dilation of isolated salivary ducts from the tick *Dermacentor variabilis* (Say) is mediated by nitric oxide. **Journal of Insect Physiology**, Amsterdam, v. 46, n. 6, p. 959-64, 2000.

LELLO, E.; BOULARD, C. Rabbit antibody responses to experimental infestation with *Dermatobia hominis*. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, 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**, Amsterdam, v. 47, p. 129-138, 1993.

LELLO, E.; PERAÇOLI, M.T.S.; OLIVEIRA-SEQUEIRA, T. C. G. Inflammatory response in *Dermatobia hominis* infested rabbits. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 8, p. 287-291, 1999.

LINTON, P. J.; DORSHKIND, K. Age-related changes in lymphocyte development and function. **Nature Immunology**, New York, v.5, p. 133–9, 2004.

MAIA, A. A. M.; GUIMARÃES, M. P. Berne: Susceptibilidade de bovinos, distribuição no hospedeiro, associação com outras miíases e abscesso. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 37, n. 5, p. 461-467, 1985.

MAIO, F. G.; SOUZA, W. M.; RAMALHO, L. D.; SANAVRIA, A.; FIGUEIREDO, M. A.; GRISI, L. Distribuição sazonal das larvas de *Dermatobia hominis* em bovinos leiteiros no município de Vassouras, Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, Niterói, v. 9, n. 1, p. 29-31, 2002.

MEJIA, J. S.; BISHOP, J. V.; TITUS, R. G. Is it possible to develop pan-arthropod vaccines? **Trends in Parasitology**, London, v. 22, n. 8, p. 367-370, 2006.

MOZZAQUATRO, F.D.; SANAVRIA, A. Estudo epidemiológico da *Dermatobia hominis* (Diptera: Cuterebridae) em bovinos de produção leiteira no Município de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. **Parasitologia Latinoamericana**, Santiago, v. 58, n. 1-2, p. 80-82, 2003.

MURASKO, D. M.; JIANG, J. Response of aged mice to primary virus infections. **Immunological Reviews**, Philadelphia, v. 205, p. 285–296, 2005.

OTRANTO D.; STEVENS J. R. Molecular approaches to the study of myiasis-causing larvae. **International Journal for Parasitology**, Amsterdam, v. 32, n. 11, p. 1345-1360. 2002.

PATARROYO, J. H.; PORTELA, R. W; DE CASTRO, R. O.; PIMENTEL, J. C.; GUZMAN, F.; PATARROYO, M. E.; VARGAS, M. I.; PRATES, A. A.; MENDES, M. A. Immunization of cattle with synthetic peptides derived from the *Boophilus microplus* gut protein (Bm86). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, New York, v. 88, p. 163-72, 2002.

PERAÇOLI, M. T. S.; LELLO, E.; MOTA, N. G. S. Comportamento da resposta imune-humoral em coelhos imunizados com antígenos de D*ermatobia hominis* Linnaeus, frente às larvas desse parasita (Díptera: Cuterebridae). **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 32, n. 11, p. 1537-42, 1980.

PINTO, S. B; THOMAZ-SOCCOL, V.; VENDRUSCULO, E.; ROCHADELLI, R.; RIBEIRO, P. B.; FREITAG, A.; HENEMANN, C.; UEMURA, M. Bioecologia de *Dermatobia hominis* (Linnaeus Jr., 1781) em Palotina, Paraná, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 5, p. 821-27, 2002

PINTO, S. B.; THOMAZ-SOCCOL, V.; MINOZZO, J. C.; ZABOTT, M. V.; VENDRUSCOLO, E. G.; ROCHADELLI, R.; FREITAG, A.; GUETNER, C. Resposta imune humoral de coelhos frente a extratos de larvas de *Dermatobia hominis*. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v. 8, n. 2, p. 19-25, 2003.

PIPANO, E.; ALEKCEEV E.; GALKER F; FISH, L.; SAMISH, M.; SHKAP, V. Immunity against Boophilus annulatus induced by the Bm86 (Tick-GARD) vaccine. **Experimental and Applied Acarology**, Dordrecht, v. 29, p. 141-49, 2003.

PRUETT, J. H. Immunological control of arthropod ectoparasites—a review **International Journal for Parasitology**, Amsterdam, v. 29, n.1, p.25-32, 1999

RIBEIRO, P. B.; OLIVEIRA, C. M. B.; COSTA, P. R. P.; BRUM, J. G. W.; BATISTA, Z. R. Flutuação populacional de *Dermatobia hominis* (L. Jr., 1781) sobre bovinos no Município de Pelotas, RS. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 41, n. 3, p. 223-231, 1989.

SCOTT, P. Immunologic memory in cutaneous leishmaniasis. **Cell Microbiology**, Oxford, v. 7, p. 1707-13, 2005.

SHAO, L.; DEVENPORT, M.; JACOBS-LORENA, M. The peritrophic matrix of hematophagous insects. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, Hoboken, v. 47, n. 2, p. 119-125, 2001.

SMITH, W. D.; ZARLENGA, D. S. Developments and hurdles in generating vaccines for controlling helminth parasites of grazing ruminants. **Veterinary Parasitology**, Madison, v. 139, p. 347-59, 2006.

STEVENS, J. R.; WALLMAN, J. F.; OTRANTO, D.; WALL, R.; PAPE, T. The evolution of myiasis in man and animals in the Old and New Worlds. **Trends in Parasitology**, London, v. 22, p. 181–88, 2006.

TELLAM, R. L.; BOWLES, V. M. Control of blowfly strike in sheep: Current strategies and future prospects**. International Journal for Parasitology**, Amsterdam, v.27, n. 3, p.261-273, 1997.

TRIMNELL, A. R.; HAILS, R. S.; NUTTALL P. A. Dual action ectoparasite vaccine targeting ‘exposed’ and ‘concealed’ antigens. **Vaccine**, Guildford, v. 20, p. 3560-68, 2002.

TRIMNELL, A. R.; DAVIES, G. M.; LISSINA, O.; HAILS, R. S.; NUTTALL, P. A. A cross-reactive tick cement antigen is a candidate broad-spectrum tick vaccine. **Vaccine**, Guildford, v. 23, n. 34, p. 4329–4341, 2005.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA. Centro de Processamento de Dados. UFV. **Sistema para Análises Estatísticas – SAEG 8.0**, Viçosa, 2002.

VAN DEN BROEK, A. H. M.; HUNTLEY, J. F.; HALLIWELL, R. E. W.; MACHELL, J.; TAYLOR, M.; MILLER, H. R. P. Cutaneous hypersensitivity reactions to *Psoroptes ovis* and Der p 1 in sheep previously infested with *P. ovis* - the sheep scab mite. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Oxford, v. 91, p. 105–117, 2003.

VERCRUYSSE, J.; KNOX, D. P.; SCHETTERS, T. P. M.; WILLADSEN, P. Veterinary parasitic vaccines: pitfalls and future directions. **Trends in Parasitology**, London, v. 20, n. 10, p. 488- 492, 2004.

WALL, R. D. Ectoparasites: Future challenges in a changing world. **Veterinary Parasitology**, Madison, v. 148, p. 62–74, 2007.

WILLADSEN, P.; BIRD, P.; COBON, G. S.; HUNGERFORD, J. Commercialisation of a recombinant vaccine against *Boophilus microplus*. **Veterinary Parasitology**, Madison, v.110, p. 43-50, 1995.

WILLADSEN, P.; KEMP, D. Challenges and opportunities in the integrated control of parasites: the example of ticks and tick-borne diseases. **Journal of Parasitology**, Amsterdam, v. 89, p. 245-49, 2003.

WOODLAND, D. L.; BLACKMAN, M. A. Immunity and age: living in the past? **Trends in Immunology**, London, v. 27, n. 7, p. 303-7, 2006.

ANEXOS

ANEXO 01:

Reativo de Bradford:

- 40mg azul de cromassie G250
- 20 mL Etanol absoluto
- 40 mL de ácido fosfórico 85%
- 100 mL água destilada q.s.p.

ANEXO 02:

Soluções utilizadas para a eletroforese:

1) TAMPÃO DE CORRIDA:

- 3,0g de tris.
- 14,4g de glicina.
- 1,0g de SDS.
- Corrigir o pH para 8,3.

2) TAMPÃO DE AMOSTRA:

- 2,5 mL de solução D.
- 5,0 mL de solução C.
- 2,0 mL de glicerol.
- 0,1 mL de EDTA 0,1 M.
- 0,2 mg de azul de bromofenol.
- H_2O deionizada q.s.p 20 mL.

3) PREPARO DO GEL:

a) Solução A:
- 30 g acrilamida.
- 0,8 g bis-acrilamida.
- H_2O destilada 100 mL.

b) Solução B:
- 18,15 g de Tris.
- H_2O destilada q.s.p 100 mL.
- Corrigir o pH para 8,8.

c) Solução C: - 5 g de SDS.
- H_2O destilada q.s.p 50 mL.

d) Solução D: - 3,0 g de Tris.
- H_2O destilada q.s.p 60 mL.
- Corrigir o pH para 6,8.

e) Persulfato de amônia 10%:
- 0,5 g de persulfato
- H_2O destilada q.s.p 5 mL.

ANEXO 03:

Composição do gel de acrilamida com concentração de 12%:

- 6,6 mL água destilada
- 8,0 mL acrilamida 30%
- 5,0 mL Tris 1,5M pH 8,8
- 0,2 mL SDS 10%
- 0,2 mL persulfato de amônio 10%
- 0,2 mL TEMED (tetraetilmetilenediamina)

ANEXO 04:

Para a obtenção do gel de empilhamento foram utilizados:

- 2,1 mL de água destilada
- 0,5 mL acrilamida 30%
- 0,38 mL tris 1,0M pH 6,8
- 30 µL SDS 10%
- 8 µL TEMED (tetraetilmetilenediamina)

Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA)

CERTIFICADO N.º 251

O Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA N.º 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEEA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO N.º 01/03-BL, de 09 de maio de 2003, e considerando o contido no Regimento Interno do CEEA, **CERTIFICA** que os procedimentos que utilizam animais no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em *"Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)"*.

APROVADO.

PROCESSO: 23075.029314/2007-09 — RO 07/2007- 28/08/2007

TÍTULO: Caracterização molecular do extrato antigênico obtido a partir de larvas de *Dermatobia hominis* (Linnaeus Jr., 1781) (Díptera: Cuterebridae)

AUTORES:
Vanete Thomaz Soccol, Nelson Luis Mello Fernandes

DEPARTAMENTO: Patologia Básica

Curitiba, 30 de agosto de 2007.

Profª. Ana Maria Caliman Filadelfi
Coordenadora do CEEA

ANEXO 06

Protocolo para a prova enzimoimunoensaio - ELISA.

Para a realização do teste ELISA foram seguidas as seguintes etapas:

a) Adsorção da placa:

- 100µL/pocinho, da solução de antígeno diluído em tampão carbonato 0,05M, pH 9,6.

b) Armazenar a placa a 4ºC “overnight”:

- incubação durante 14 horas.

c) Lavar a placa com a solução de lavagem:

- repetir por 3 vezes.

d) Bloquear a placa:

- usar 100µL/pocinho.

e) Incubar a placa em estufa a 37ºC por 60 min.

f) Lavar a placa com a sol. de lavagem:

- repetir por 3 vezes.

g) Diluir as amostras de soro:

- diluir em tampão de incubação e adicionar 100µL/pocinho.

h) Incubar a placa em estufa a 37ºC por 60 min

i) Lavar com solução de lavagem

- repetir por 6 vezes.

j) Adicionar o conjugado:

- diluir o conjugado em tampão de incubação e distribuir 100µL/pocinho.

k) Incubar a placa por 60 min. em estufa a 37ºC

l) Lavar a placa com solução de lavagem:

- repetir por 6 vezes.

m) Adicionar o substrato:

- diluir 4 mg do substrato em tampão citrato pH 5,0 e acrescentar 4µL de H_2O_2.

n) Incubar a placa em estufa a 22ºC, por 20 min.

o) Parar a reação com o ácido sulfúrico:

- usar 50 µL/pocinho de solução de H_2SO_4 a 5%.

p) Leitura da absorbância com o filtro de 492nm de comprimento de onda.

Soluções utilizadas para a execução técnica:

1) TAMPÃO CARBONATO:

- Solução A, 1,1g de Na_2CO_3 para 200 mL de H_2O deionizada.
- Solução B, 4,2g de $NaHCO_3$ para 1 L de H_2O deionizada.
- Corrigir o pH para 9,6, adicionando a solução A em B.

2)SOLUÇÃO DE LAVAGEM:

- 9,0g deNaCl.
- 0,5g de Tween 20.
- H_2O deionizada q.s.p 1000 mL.

3) SOLUÇÃO DE BLOQUEIO:

- caseína 2%
- 0,05% de Tween 20, diluídos em PBS.

4) PBS (0,05M com 0,15 M de NaCl, pH7,4), obtido a partir de:

- Solução A: - 7,1g Na_2HPO_4.
  - 8,8g NaCl.
  - H_2O deionizada q.s.p 1000 mL.

- Solução B: - 1,4g NaH_2PO_4.
  - 1,88g NaCl.
  - H_2O deionizada q.s.p 200 mL.

- Corrigir o pH para 7,4, adicionando a solução B em A.

5) TAMPÃO DE INCUBAÇÃO:

- Solução A, 0,25% caseína; 0,05% de Tween 20, diluída em PBS.

- Solução B: - 62,5 mL de solução de bloqueio;
  - 0,25 mL Tween 20;
  - 500 mL PBS pH 7,4.

6) TAMPÃO CITRATO:

- 7,10g Na_2HPO_4
- 5,19g ácido cítrico.
- H_2O deionizada q.s.p 1000 mL.
- Corrigir o pH para 5,0.

ANEXO 07:

Absorbâncias obtidas através da densidade ótica pela técnica de imunoensaio - ELISA, realizados nos quatro grupos de animais imunizados.

		Períodos de Colheita (em dias)					
Antígenos	Animais	"zero"	15	30	45	60	75
L_1	1	0,038	0,097	0,349	0,394	0,567	0,367
	2	0,021	0,118	0,218	0,435	0,489	0,402
L_2	3	0,066	0,105	0,206	0,272	0,304	0,274
	4	0,040	0,259	0,649	0,548	0,487	0,304
L_3	5	0,034	0,130	0,373	0,311	0,289	0,174
	6	0,016	0,236	0,301	0,278	0,282	0,156
L_2 e L_3	7	0,020	0,137	0,221	0,187	0,173	0,117
	8	0,022	0,162	0,225	0,183	0,169	0,132

ANEXO 08:

1) Tampão de transferência:

- 3,0 g de TRIS
- 14,4 g de Glicina
- 1,0 g de SDS
- H_2O q.s.p. 1000 mL

(corrigir pH p/ 8,3 c/ HCl)

ANEXO 09:

Corante de Ponceau

- 0,2% Ponceau M/v
- ácido acético 3%

ANEXO 10:

Aminoetilcarbazole (AEC)

- solução estoque: - 0,4 g de 3-amino 9-etilcarbazole
  - 100 mL de dimetilformamida
- 0,67 mL da sol. estoque
- 10 mL de acetato de sódio 0,1 M pH (5,2)
- 10 µL de H_2O_2 30%

ANEXO 11:

Tampão de lise (Imunoprecipitação)

- 100 mL PBS pH 7,2
- 1,0 mL triton X-100 (ou NP-40)

ANEXO 12:

Tampão de amostra (eluição)

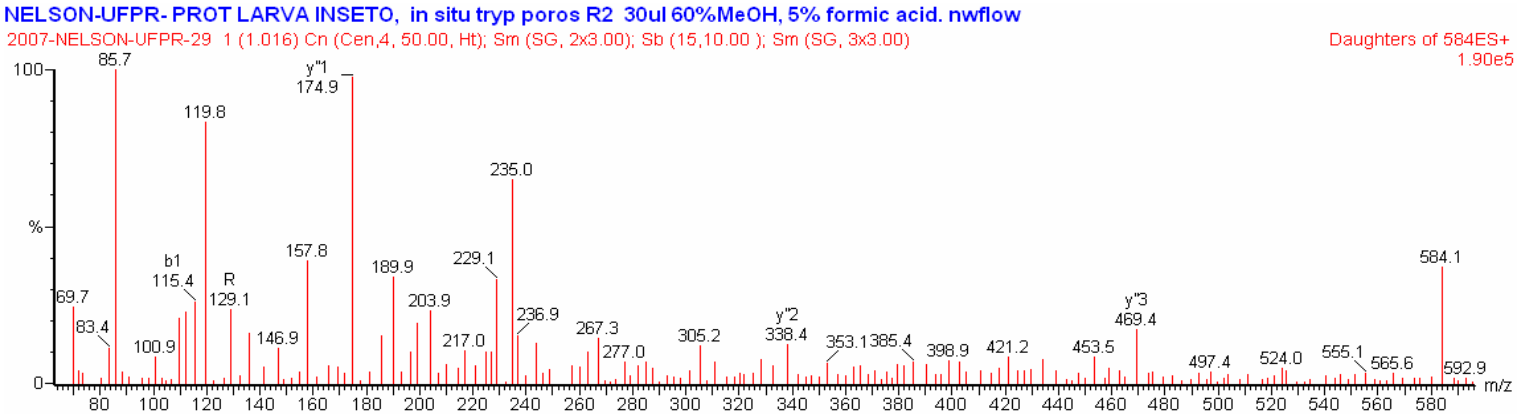
- 0,45 g TRIS
- 0,5 g SDS
- 2,0 mL glicerol
- 0,1 mL EDTA 0,1 M
- 0,2 mg azul de bromofenol
- H_2O q.s.p. 20 mL
- 240 µL 2-mercaptoetanol (no momento do uso)

ANEXO 13:

Coomassie

- 0,25 g Coomassie Brilhante R250
- 50 mL de metanol
- 10 mL ácido acético
- H_2O q.s.p. 100 mL

ANEXO 14: Mapeamentos dos peptídeos obtidos por CID-MS/MS

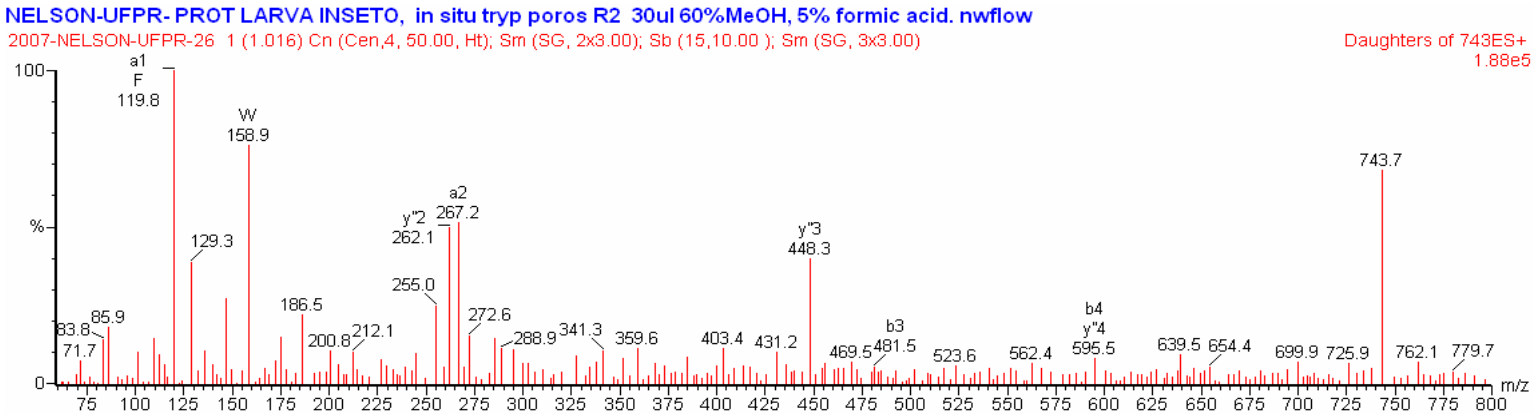


Associated Spectrum Datafile: 2007-NELSON-UFPR-29
Mass Window = 0.80 amu, Threshold = 2.00%
Average Mass = 582.6662, Monoisotopic Mass = 582.2479
Residues: 1-4 proposed
N-Terminus = H, C-Terminus = OH
Fragment ions: Monoisotopic/Average (1750) m/z ratios with 1 positive charge(s).

a	87.0	218.1	381.2	-
b	115.0	246.1	409.1	-
c"	132.1	263.1	426.2	-
i	87.1	104.1	136.1	129.1

	1	2	3	4
	Asn	**Met**	**Tyr**	**Arg**
	4	3	2	1
x	-	495.2	364.2	201.1
y"	-	469.2	338.2	175.1
z	-	452.2	321.2	158.1

CID-MS/MS do íon m/z 584[M+H$^+$] – Mw 582.6

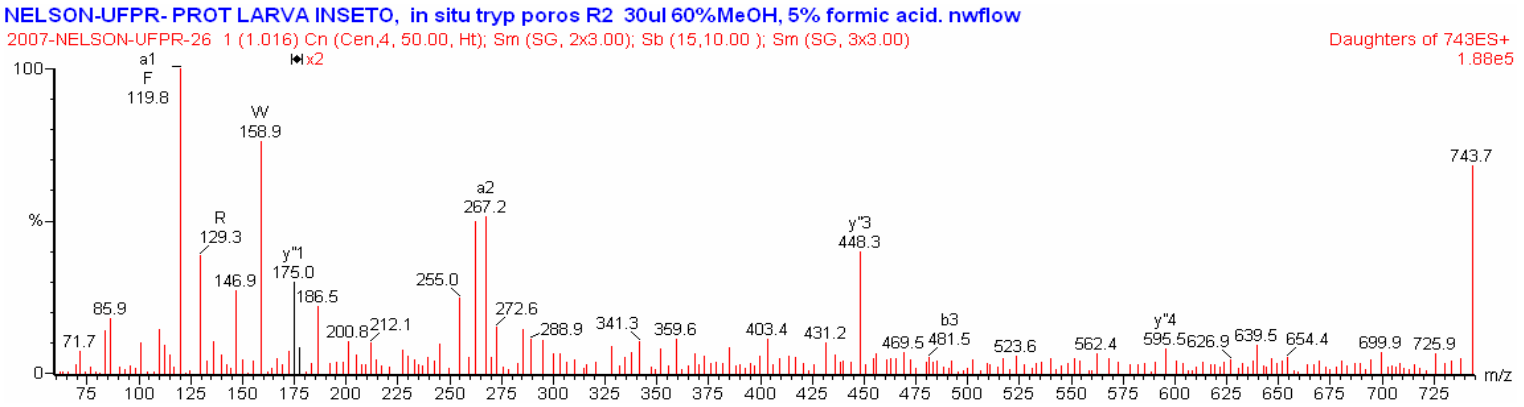


Associated Spectrum Datafile: 2007-NELSON-UFPR-26
Mass Window = 0.80 amu, Threshold = 2.00%
Average Mass = 741.8293, Monoisotopic Mass = 741.3380
Residues: 1-5 proposed
N-Terminus = H, C-Terminus = OH
Fragment ions: Monoisotopic/Average (1750) m/z ratios with 1 positive charge(s).

a	120.1	267.1	453.2	568.2	-
b	148.1	295.1	481.2	596.2	-
c"	165.1	312.2	498.2	613.3	-
i	120.1	120.1	159.1	88.0	101.1

	1	2	3	4	5
	Phe	**Phe**	**Trp**	**Asp**	**Lys**
	5	4	3	2	1
x	-	621.3	474.2	288.1	173.1
y"	-	595.3	448.2	262.1	147.1
z	-	578.3	431.2	245.1	130.1

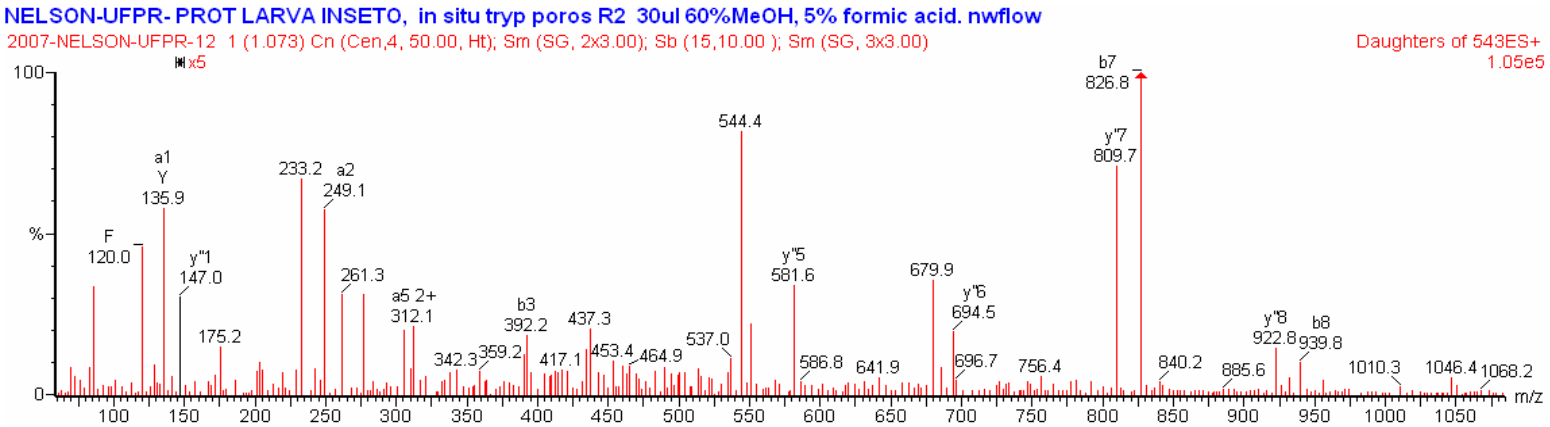
CID-MS/MS do íon m/z 743[M+H$^+$] – Mw 741.8



Associated Spectrum Datafile: 2007-NELSON-UFPR-26
Mass Window = 0.80 amu, Threshold = 2.00%
Average Mass = 741.8324, Monoisotopic Mass = 741.3493
Residues: 1-5 proposed
N-Terminus = H, C-Terminus = OH
Fragment ions: Monoisotopic/Average (1750) m/z ratios with 1 positive charge(s).

a	120.1	267.1	453.2	540.3	-
b	148.1	295.1	481.2	568.2	-
c"	165.1	312.2	498.2	585.3	-
i	120.1	120.1	159.1	60.0	129.1
	1	2	3	4	5
	Phe	**Phe**	**Trp**	**Ser**	**Arg**
	5	4	3	2	1
x	-	621.3	474.2	288.1	201.1
y"	-	595.3	448.2	262.1	175.1
z	-	578.3	431.2	245.1	158.1

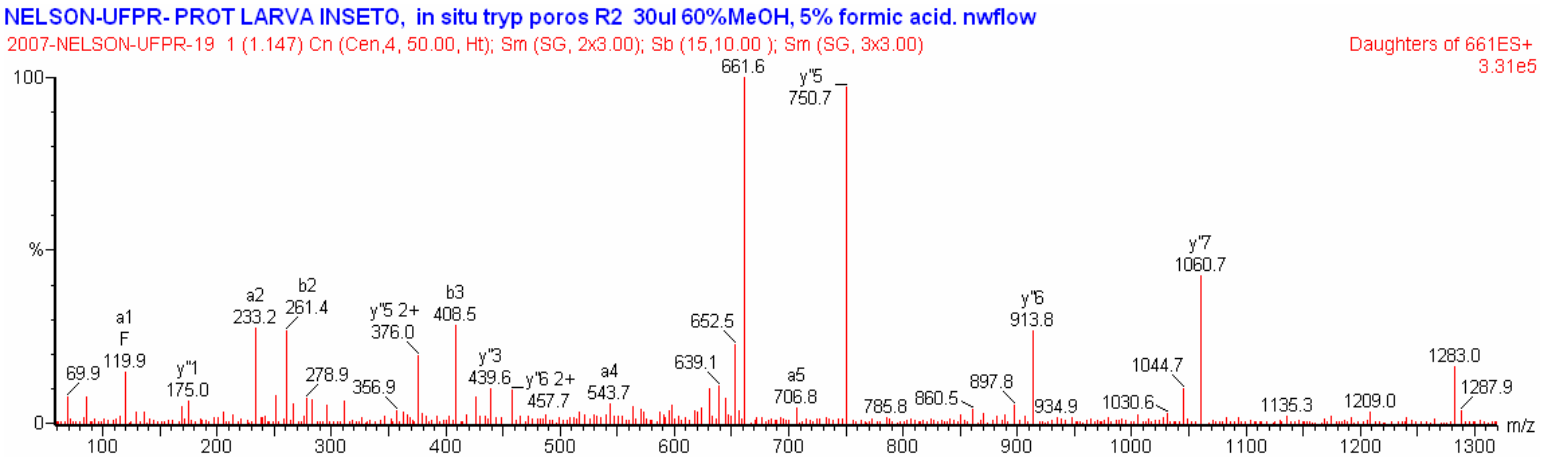
CID-MS/MS do íon m/z 743[M+H$^+$] – Mw 741.8



Associated Spectrum Datafile: 2007-NELSON-UFPR-12
Mass Window = 0.80 amu, Threshold = 2.00%
Average Mass = 1085.3175, Monoisotopic Mass = 1084.5521
Residues: 1-9 proposed
N-Terminus = H, C-Terminus = OH
Fragment ions: Monoisotopic/Average (1750) m/z ratios with 1 positive charge(s).

a	136.1	249.2	364.2	477.3	624.3	695.4	798.4	911.5	-
b	164.1	277.1	392.2	505.3	652.3	723.4	826.4	939.5	-
c"	181.1	294.2	409.2	522.3	669.4	740.4	843.4	956.5	-
i	136.1	86.1	88.0	86.1	120.1	44.1	76.0	86.1	101.1
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	Tyr	**Leu**	**Asp**	**Leu**	**Phe**	**Ala**	**Cys**	**Leu**	**Lys**
	9	8	7	6	5	4	3	2	1
x	-	948.5	835.4	720.4	607.3	460.2	389.2	286.2	173.1
y"	-	922.5	809.4	694.4	581.3	434.2	363.2	260.2	147.1
z	-	905.5	792.4	677.4	564.3	417.2	346.2	243.2	130.1

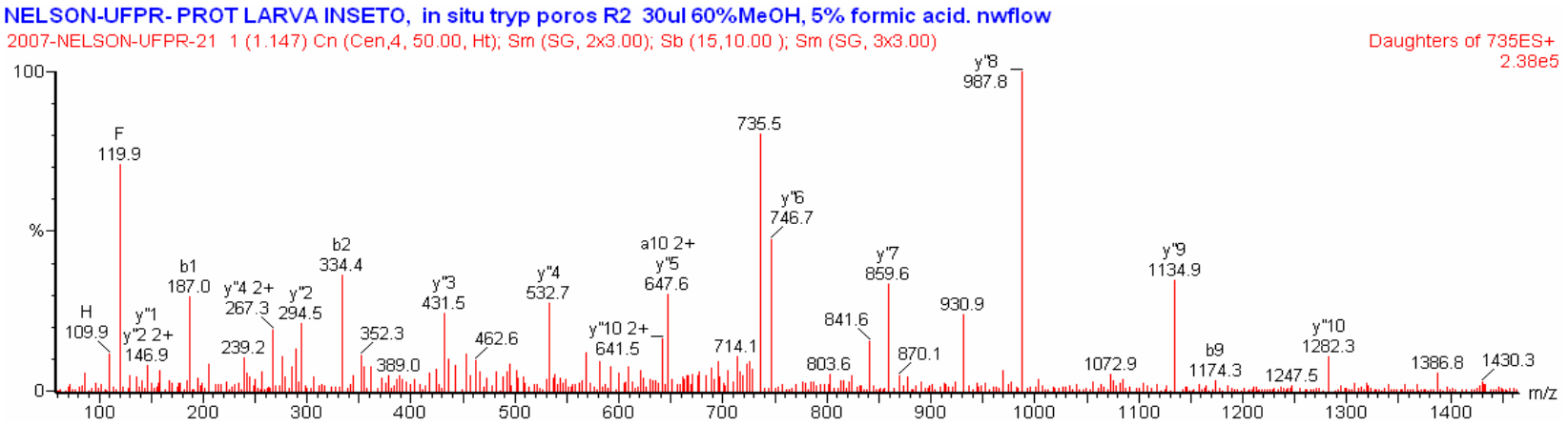
CID-MS/MS do íon m/z 543[M+2H$^+$] – Mw 1085.3



Associated Spectrum Datafile: 2007-NELSON-UFPR-19
Mass Window = 0.80 amu, Threshold = 2.00%
Average Mass = 1320.5009, Monoisotopic Mass = 1319.6346
Residues: 1-9 proposed
N-Terminus = H, C-Terminus = OH
Fragment ions: Monoisotopic/Average (1750) m/z ratios with 1 positive charge(s).

a	120.1	233.2	380.2	543.3	706.4	853.4	981.5	1118.5	-
b	148.1	261.2	408.2	571.3	734.3	881.4	1009.5	1146.5	-
c"	165.1	278.2	425.2	588.3	751.4	898.4	1026.5	1163.6	-
i	120.1	86.1	120.1	136.1	136.1	120.1	101.1	110.1	129.1
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	Phe	**Ile**	**Phe**	**Tyr**	**Tyr**	**Phe**	**Gln**	**His**	**Arg**
	9	8	7	6	5	4	3	2	1
x	-	1199.6	1086.5	939.4	776.3	613.3	466.2	338.2	201.1
y"	-	1173.6	1060.5	913.4	750.4	587.3	440.2	312.2	175.1
z	-	1156.6	1043.5	896.4	733.3	570.3	423.2	295.1	158.1

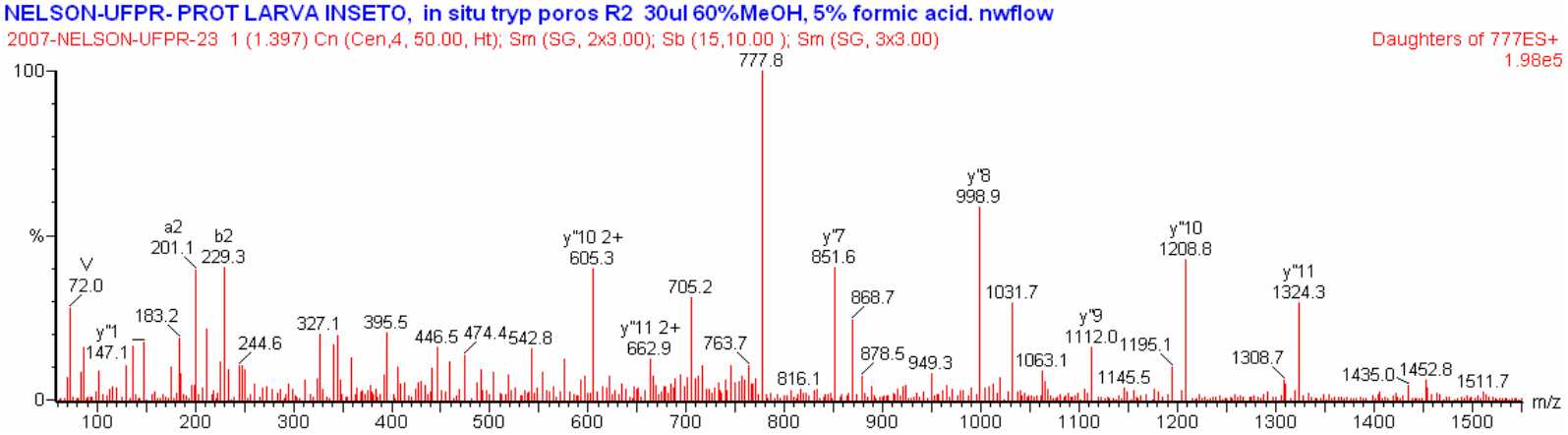
CID-MS/MS do íon m/z 661[M+2H$^+$] – Mw 1320.5



Associated Spectrum Datafile: 2007-NELSON-UFPR-21
Mass Window = 0.80 amu, Threshold = 2.00%
Average Mass = 1467.6751, Monoisotopic Mass = 1466.7241
Residues: 1-11 proposed
N-Terminus = H, C-Terminus = OH
Fragment ions: Monoisotopic/Average (1750) m/z ratios with 1 positive charge(s).

a	159.1	306.2	453.2	581.3	694.4	793.4	908.5	1009.5	1146.6	1293.6	-
b	187.1	334.1	481.2	609.3	722.4	821.4	936.5	1037.5	1174.6	1321.6	-
c"	204.1	351.2	498.2	626.3	739.4	838.5	953.5	1054.5	1191.6	1338.7	-
i	159.1	120.1	120.1	101.1	86.1	72.1	88.0	74.1	110.1	120.1	101.1
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
	Trp	**Phe**	**Phe**	**Gln**	**Leu**	**Val**	**Asp**	**Thr**	**His**	**Phe**	**Lys**
	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1
x	-	1307.6	1160.6	1013.5	885.4	772.4	673.3	558.3	457.2	320.2	173.1
y"	-	1281.7	1134.6	987.5	859.5	746.4	647.3	532.3	431.2	294.2	147.1
z	-	1264.6	1117.6	970.5	842.4	729.4	630.3	515.3	414.2	277.2	130.1

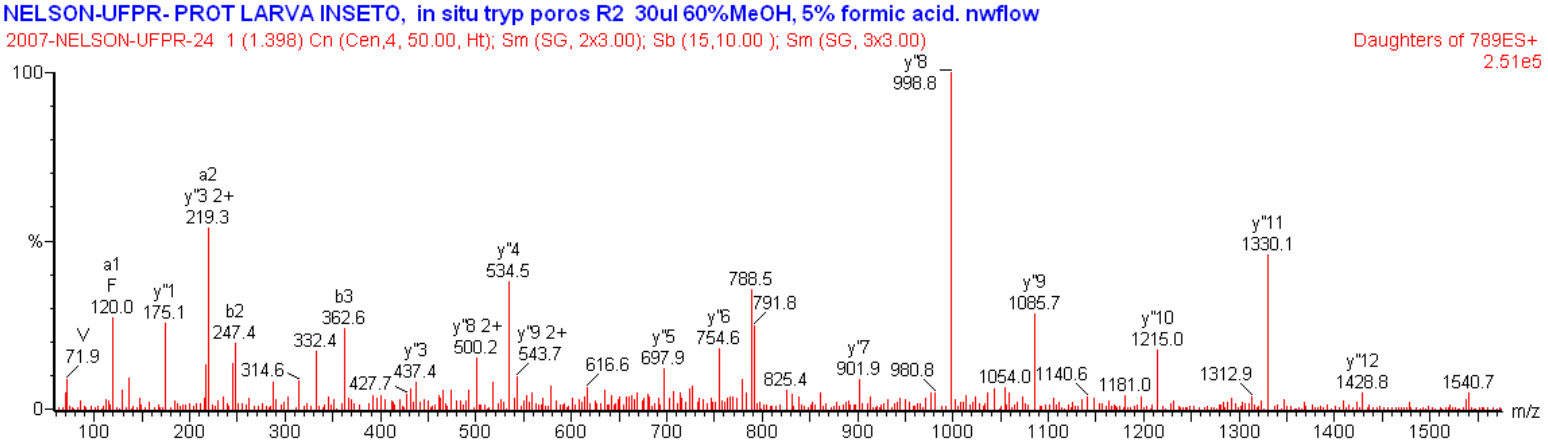
CID-MS/MS do íon m/z 735[M+2H$^+$] – Mw 1467.6



Associated Spectrum Datafile: 2007-NELSON-UFPR-23
Mass Window = 0.80 amu, Threshold = 2.00%
Average Mass = 1551.7014, Monoisotopic Mass = 1550.7511
Residues: 1-13 proposed
N-Terminus = H, C-Terminus = OH
Fragment ions: Monoisotopic/Average (1750) m/z ratios with 1 positive charge(s).

a	88.0	201.1	316.1	413.2	526.3	673.3	820.4	934.5	1048.5	1149.6	1278.6	1377.7	-
b	116.0	229.1	344.1	441.2	554.3	701.3	848.4	962.5	1076.5	1177.5	1306.6	1405.7	-
c"	133.1	246.1	361.2	458.2	571.3	718.4	865.4	979.5	1093.5	1194.6	1323.6	1422.7	-
i	88.0	86.1	88.0	70.1	86.1	120.1	120.1	87.1	87.1	74.1	102.1	72.1	101.1
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
	Asp	**Leu**	**Asp**	**Pro**	**Leu**	**Phe**	**Phe**	**Asn**	**Asn**	**Thr**	**Glu**	**Val**	**Lys**
	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1
x	-	1462.7	1349.6	1234.6	1137.6	1024.5	877.4	730.3	616.3	502.2	401.2	272.2	173.1
y"	-	1436.7	1323.7	1208.6	1111.6	998.5	851.4	704.4	590.3	476.3	375.2	246.2	147.1
z	-	1419.7	1306.6	1191.6	1094.5	981.5	834.4	687.3	573.3	459.2	358.2	229.2	130.1

CID-MS/MS do íon m/z 777[M+2H$^+$] – Mw 1551.7



Associated Spectrum Datafile: 2007-NELSON-UFPR-24
Mass Window = 0.80 amu, Threshold = 2.00%
Average Mass = 1575.6825, Monoisotopic Mass = 1574.6936
Residues: 1-13 proposed
N-Terminus = H, C-Terminus = OH
Fragment ions: Monoisotopic/Average (1750) m/z ratios with 1 positive charge(s).

a	120.1	219.1	334.2	463.2	550.2	647.3	794.4	851.4	1014.4	1111.5	1258.6	1373.6	-
b	148.1	247.1	362.2	491.2	578.2	675.3	822.4	879.4	1042.4	1139.5	1286.6	1401.6	-
c"	165.1	264.2	379.2	508.2	595.3	692.3	839.4	896.4	1059.5	1156.5	1303.6	1418.6	-
i	120.1	72.1	88.0	102.1	60.0	70.1	120.1	30.0	136.1	70.1	120.1	88.0	129.1
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
	Phe	**Val**	**Asp**	**Glu**	**Ser**	**Pro**	**Phe**	**Gly**	**Tyr**	**Pro**	**Phe**	**Asp**	**Arg**
	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1
x	-	1454.6	1355.6	1240.5	1111.5	1024.5	927.4	780.3	723.3	560.2	463.2	316.1	201.1
y"	-	1428.6	1329.6	1214.5	1085.5	998.5	901.4	754.3	697.3	534.3	437.2	290.1	175.1
z	-	1411.6	1312.5	1197.5	1068.5	981.4	884.4	737.3	680.3	517.2	420.2	273.1	158.1

CID-MS/MS do íon m/z 789[M+2H$^+$] – Mw 1575.6

ANEXO 15:

Solução de *BOUIN*

- Solução saturada aquosa de ácido pícrico: 750 mL
- Formol 36-40%: 250 mL
- Ácido Acético Glacial: 50 mL

Técnica de fixação:

Fixar pedaços de até 0,5 cm de espessura em Bouin durante 14 horas (5 horas no mínimo). Deixar as amostras fixadas *over nigth* em água dentro do próprio frasco onde foi fixado. Lavar em água corrente e armazenar em álcool 70%, até sua utilização.

ANEXO 16:

Solução neutra fosfato tamponada de formol

- Formaldeído 37-40%: 100 mL
- Água destilada: 900 mL
- Fosfato de Na monobásico ($NaH_2PO_4.H_2O$): 4,0 g
- Fosfato de Na dibásico anidro (Na_2HPO_4): 6,5 g

Técnica de Fixação:

Fixar durante 6 a 24 horas, dependendo do tamanho da peça e manter em álcool 70% até sua utilização.

ANEXO 17:

ALBUMINA

- Clara de ovo: 50 mL
- Glicerina: 50 ml

Misturar bem. Filtrar em uma gaze. Colocar uma pequena gota em uma das extremidades da lâmina e espalhar de uma só vez com o dedo.

ANEXO 18:

DAB (Diaminobenzidina)

- 1 comprimido de 10mg de diaminobenzidina, Sigma (C-5637)
- 15 mL de TBS, pH7,6
- 12 µL de H_2O_2 30%

Dissolver o comprimido de DAB em solução de TBS (0,01M Tris HCl, 0,15M Na Cl, pH7,6), ao abrigo da luz. Adicionar a água oxigenada no momento do uso.

ANEXO 19:

EOSINA

- 0,25 g de eosina amarela em pó (solúvel em água)
- 100 ml de água destilada

HEMATOXILINA DE HARRIS

- 1 g de hematoxilina cristalizada
- 10 ml de álcool absoluto
- 20 g de alúmen de potássio ou de amônio
- 200 ml de água destilada
- 0,5 g de óxido de mercúrio (vermelho)
- 8 ml de ácido acético glacial (optativo)

Preparo do corante:

Dissolver a hematoxilina no álcool ligeiramente aquecido, dissolver o alúmen em água aquecida. Misturar as soluções e aquecer até ferver. Tirar do fogo e adicionar imediatamente e aos poucos o óxido de mercúrio (agitando para não explodir). Resfriar a solução o mais rapidamente possível, mergulhando o frasco num vasilhame (ou na pia) contendo água fria. Acrescentar o ácido acético e filtrar. Estocar em vidro escuro. Dura cerca de 3 meses. Deve-se filtrar a solução toda vez que for usar.

Coloração HEMATOXILINA-EOSINA

Desparafinar e hidratar os cortes. Corar com hematoxilina, por 2 a 10 minutos. Lavar em água corrente por 10 minutos. Caso necessário, proceder à diferenciação em álcool-ácido: solução alcoólica de HCl a 1% (1 ml de HCl em 99 ml de álcool 70°). Controlar a diferenciação ao microscópio até chegar à intensidade desejada. Lavar rapidamente em água corrente, após a diferenciação. Corar pela eosina por 2 minutos. Lavar em água corrente (até que a água esteja limpa). Passar pela bateria de desidratação: álcool 70°, álcool 95°, álcool 100°, xilol e montar.

Observações:

a) A hematoxilina cora os núcleos primariamente em vermelho e a posterior lavagem em água corrente converte a coloração para o azul.

b) O procedimento de diferenciação da hematoxilina em álcool-ácido raramente é necessário e deve ser feito nos casos em que ocorre uma supercoloração.

d) A eosina sofre diferenciação com o álcool 70°; por isso esta passagem deve ser rápida. Se, por acaso, o corte ficar muito descorado ao ser passado pelo álcool 70°, passá-lo novamente pela água e recolocá-lo na eosina.