



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**Exsudatos de sementes de soja (*Glycine max*) como controle potencial de  
*Haemonchus contortus***

HELEN SILVA RIBEIRO

**CHAPADINHA**

**2018**

HELEN SILVA RIBEIRO

**Exsudatos de sementes de soja (*Glycine max*) como controle potencial de  
*Haemonchus contortus***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Maranhão como requisito para a obtenção do título de mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Alexandra Martins dos Santos Soares

**CHAPADINHA**

**2018**

Ribeiro, Helen Silva.

Exsudatos de sementes de soja *Glycine max* como controle potencial de *Haemonchus contortus* / Helen Silva Ribeiro. - 2018.

56 f.

Orientador (a): Alexandra Martins dos Santos Soares.  
Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciência Animal (25.06) / CCAA, Universidade Federal do Maranhão, Chapadinha, 2018.

1. Nematóide. 2. Anti-helmíntico. 3. Inibidor. 4. Sementes. 5. Exsudatos. I. Soares, Alexandra Martins dos Santos. II. Título.

HELEN SILVA RIBEIRO

**Exsudatos de sementes de soja (*Glycine max*) como controle potencial de  
*Haemonchus contortus***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Maranhão, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

**Aprovada em:** / /

BANCA EXAMINADORA

---

**Prof<sup>a</sup>. Alexandra Martins dos Santos Soares (Orientadora)**

Universidade Federal do Maranhão

---

Prof Claudener Souza Teixeira

Universidade Federal do Maranhão

---

Prof Rafael Cardoso Carvalho

Universidade Federal do Maranhão

“Buscai a Deus e vivei.. “

(Amós 5:4)

Com o coração vibrando de boas palavras, aos meus pais,

Dedico.

## AGRADECIMENTOS

À Deus honra e glória;

À Professora Dra. Alexandra Martins dos Santos Soares pela orientação, dedicação, apoio e zelo nesta pesquisa;

Ao Professor Dr. Livio Martins Costa Junior e aluna Carolina Rocha e Silva do Laboratório de Controle de Parasitas da Universidade Federal do Maranhão;

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal (PPGCA) da Universidade Federal do Maranhão;

Aos colegas do Laboratório de Bioquímica Vegetal da Universidade Federal do Maranhão;

À FAPEMA pela concessão de bolsa e suporte financeiro.

Obrigada

## SUMÁRIO

	p.
<b>CAPÍTULO I – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....</b>	15
1. <b>INTRODUÇÃO.....</b>	15
2. <b>REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	17
2.1 <b>Hemoncose em pequenos ruminantes.....</b>	17
2.2 <b>Ciclo de vida de <i>Haemonchus contortus</i> e características das fases de desenvolvimento.....</b>	18
2.2.1 <b>Importância de proteases no ciclo de vida de <i>H. contortus</i>.....</b>	19
2.3 <b>Potencial anti-helmíntico de Inibidores de proteases.....</b>	21
2.4 <b><i>Glycine max</i>.....</b>	22
2.4.1 <b>Soja na produção animal.....</b>	22
2.4.2 <b>Perspectivas do uso de exsudatos das sementes de soja como anti-helmínticos.....</b>	23
3. <b>OBJETIVOS.....</b>	25
3.1 <b>Geral.....</b>	25
3.2 <b>Específicos.....</b>	25
 <b>CAPÍTULO II – Inhibition of protease and <i>Haemonchus contortus</i> egg hatching by Soybean seed exudate.....</b>	 27
1. <b>INTRODUCTION.....</b>	40
2. <b>MATERIALS E METHODS.....</b>	41
2.1 <b>Biological materials and reagents.....</b>	41
2.2 <b>Preparation of the Soybean seed exudates and Protein Content.....</b>	41
2.3 <b>Preparation of a protease-enriched fraction from <i>Haemonchus contortus</i> eggs.....</b>	42
2.4 <b>Protease inhibitor activity of the seed exudates and commercial protease inhibitors.....</b>	43
2.5 <b><i>In Vitro</i> Egg Hatching Test.....</b>	44
2.6 <b>Statistical Analysis.....</b>	45
3. <b>RESULTS.....</b>	45
3.1 <b>Protein Content .....</b>	45



<b>3.2</b>	<b>Protease Inhibitor activity and biological assay .....</b>	<b>46</b>
<b>3.3</b>	<b><i>In Vitro</i> Egg Hatching Test.....</b>	<b>46</b>
<b>4.</b>	<b>DISCUSSION.....</b>	<b>47</b>
<b>5.</b>	<b>CONCLUSION.....</b>	<b>49</b>
	<b>Competing interests.....</b>	<b>50</b>
	<b>Acknowledgments.....</b>	<b>50</b>
	<b>REFERENCES.....</b>	<b>50</b>
	<b>SUPPLEMENTAR MATERIAL.....</b>	<b>56</b>

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIACOES

BANA – Benzoyl-DL-arginina- $\beta$ -naphthylamida

BSA – Albumina s rica bovina (do ingl s, Bovine Serum Albumin)

DMACA - p-dimetilaminocinamalde do

DMSO - Dimetilsulf xido

DTT - Ditiotreitol

E-64- trans-Epoxy succinyl-L-leucylamido(4-guanidino)butane, L-trans-3-Carboxyoxiran-2-carbonyl-L-leucylagmatine, N-(trans-Epoxy succinyl)-L-leucine 4-guanidinobutylamide

EDTA -  cido etilenodiamino tetra-acético

EC<sub>50</sub> – Concentra o efetiva para 50% da popula o

IC – Intervalo de confiança

PBS – Tampão fosfato de sódio

TPCK - N-p-Tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone

UI – Unidade inibitória

UA – Unidade de atividade

## LISTA DE TABELAS

## CAPÍTULO II

	Pág.
<b>Table 1</b> - Inhibition of eggs hatch (%) and effective concentration (EC <sub>50</sub> ) of Total (T.SEX), Dialyzed (D.SEX) and Heat-treated (H.SEX) soybean seed exudates (mg mL <sup>-1</sup> ) required to achieve 50% inhibition of eggs hatching of <i>Haemonchus contortus</i> .....	47

## LISTA DE FIGURAS

## CAPÍTULO II

Pág

- Figure 1 -** Inhibition of proteolytic activity of *Haemonchus contortus* eggs proteases by Total (T.SEX), Dialyzed (D.SEX) and Heat-treated (H.SEX) soybean seed exudates. Values represent the means  $\pm$  standard deviation (SD) of triplicates..... 46

## RESUMO

Nematódeos gastrintestinais de pequenos ruminantes causam perdas na produtividade do rebanho, sendo um desafio ao desenvolvimento da pecuária. Compostos vegetais tem sido uma alternativa ao uso de anti-helmínticos comerciais, responsáveis pela seleção de parasitos resistentes. As sementes de soja (*Glycine max*) apresentam alto valor econômico e teor proteico. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade anti-helmíntica de exsudatos das sementes de *G. max*, e suas frações enriquecidas com inibidores de proteases, sobre *Haemonchus contortus*. O exsudato total (T.SEX) foi obtido após imersão das sementes em tampão acetato de sódio 100mM, pH 5,0, a 5 °C, por 24 horas. Após diálise exaustiva contra água destilada (*cut-off* 12 kDa), obteve-se o Exsudato Dialisado (D.SEX). Após tratamento térmico do D.SEX, a 100 °C por 10 min e centrifugação (12.000 x *g*, a 4 °C por 15 minutos), o sobrenadante obtido for denominado Exsudato Aquecido (H.SEX). Avaliou-se o teor de proteínas, a atividade inibitória de protease dos exsudatos e ação sobre inibição da eclodibilidade de ovos de *H. contortus*. Adicionalmente, avaliou-se a atividade inibitória dos exsudatos sobre as proteases isoladas dos ovos de *H. contortus*. A inibição da eclosão de ovos também foi avaliada utilizando-se diferentes classes de inibidores de protease comerciais [E-64 (10 µM), EDTA (1 mM), Pepstatina A (10 mM) e TPCK (10 mM)]. O conteúdo proteico obtido foi, respectivamente, 243,63, 226,88 e 121,67 miligramas de proteínas por quilo de semente (mg P/kg semente) para T.SEX, D.SEX e H.SEX. A inibição de proteases dos ovos de *H. contortus* foi de 31,1, 42,9 e 63,8% para T.SEX, D.SEX e H.SEX, respectivamente. A atividade inibitória de protease dos exsudatos, sobre papaína (protease comercial), foi de 41,6, 62,4 e 77,2 % para T.SEX, D.SEX e H.SEX, respectivamente. Todos os exsudatos obtidos inibiram a eclosão de ovos de *H. contortus*, com EC<sub>50</sub> 0,175, 0,175 e 0,241 mg mL<sup>-1</sup> para T.SEX, D.SEX e H.SEX, respectivamente. Dentre os inibidores de proteases comerciais testados, apenas EDTA e E-64 inibiram a eclosão de ovos de *H. contortus* (78,98 e 28,86%, respectivamente). Conclui-se que os exsudatos das sementes de soja apresentam atividade inibitória de protease e eficiência anti-helmíntica contra o *H. contortus*.

**Palavras-chave:** Parasitismo, nematoide, anti-helmíntico, inibidores.

## ABSTRACT

Gastrointestinal nematodes of small ruminants cause losses in herd productivity, being a challenge in livestock. Plant compounds have been an alternative to use of commercial anthelmintics, responsible for the selection of resistant parasites. Among the compounds presents in different plant parts, the seeds display a broad therapeutic potential. In this context, the *Glycine max* soybean seeds stand out, given their high production and protein content in the grains. The objective of this study was to evaluate the anthelmintic activity of *G.max* seed exudates and their fractions enriched with protease inhibitors on *Haemonchus contortus*. Total exudate (T.SEX) was obtained after immersion of the seeds in 100 mM sodium acetate buffer, pH 5.0, at 5° C for 24 hours. After exhaustive dialysis (*cut-off 12 kDa*), we obtained the Dialysed Exudate (D.SEX). Finally, after heat treatment of D.SEX, at 100 °C for 10 min, the heated exudate (H.SEX) was obtained. The protein content, the protease inhibitory activity of the exudates, and their action on inhibition of hatchability *H. contortus* eggs were evaluated. In addition, the inhibitory activity of the exudates on the proteases isolated from the eggs of *H. contortus* was evaluated. Inhibition of egg hatching was also evaluated using different classes of commercial protease inhibitors [E-64 (10 µM), EDTA (1 mM), Pepstatin A (10 mM) and TPCK (10 mM)]. It was obtained 243.63, 226.88 and 121.67 milligrams of protein per kilogram of seed (mg P/seed Kg) for T.SEX, D.SEX and H.SEX, respectively. The inhibition of the proteases of *H. contortus* eggs was 31.1, 42.9 and 63.8% for T.SEX, D.SEX and H.SEX, respectively. The protease inhibitor activity of the exudates, using papain as commercial protease, was 41.6, 62.4 and 77.2% for T.SEX, D.SEX and H.SEX, respectively, with EC<sub>50</sub> of 0.175, 0.175 and 0.241 mg / mL for T.SEX, D.SEX and H.SEX, respectively. Among commercial protease inhibitors tested, only EDTA and E-64 inhibited hatching of *H. contortus* eggs (78.98 and 28.86%, respectively). It is concluded that the exudates of *G. max* seeds have an anthelmintic action and that this action is related to the inhibition of metalloproteases and cysteine proteases of *H. contortus* eggs.

**Keywords:** Parasitism, Seeds, Exudate, Anthelmintic, Inhibitors.

## CAPÍTULO I - CONSIDERAÇÕES GERAIS

### 1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui o 22º rebanho mundial de caprinos com 8.851.879 animais e o 18º maior rebanho de ovinos com 17.614.454 animais (IBGE, 2016). No Nordeste brasileiro é a criação que mais se destaca (IBGE, 2016); contudo o modelo de produção apresenta baixos índices o que advém de uma precária nutrição e manejo sanitário ineficaz (Almeida et al., 2010), ocorrendo, principalmente em regime extensivo, onde os animais se alimentam em áreas com pouca ou nenhuma suplementação na dieta (Girão et al., 1998; Brito et al., 2010). Neste contexto, as doenças parasitárias ocupam lugar de destaque entre os fatores que limitam a produção de pequenos ruminantes (Pereira, 2011; Rodríguez et al., 2015).

Dos principais gêneros de nematodeos gastrointestinais de pequenos ruminantes, o *Haemonchus contortus* apresenta maior importância médico-veterinária por ser responsável por altas taxas de mortalidade dos animais (Climeni, 2008; Vilela et al., 2012; Minho, 2014), que sob a forma aguda levam rapidamente a óbito, ou, sob a forma crônica, causam prejuízos gradativos, como: perda de peso, queda no desempenho produtivo e reprodutivo, baixa na imunidade e menor desenvolvimento corporal (Krychak-Furtado et al., 2005; Sczesny-Moraes et al., 2010).

O controle parasitário largamente utilizado é através do uso de produtos químicos sintéticos com atividades anti-helmínticas (Amarante, 2005). Porém o uso excessivo e inadequado colaborou para a seleção de cepas resistentes, resultando na ineficiência da maioria dos produtos disponíveis (Borges et al., 2013; Hoste et al., 2015). O aumento da resistência a anti-helmínticos tem ocasionado grandes impactos econômicos para a pecuária brasileira e mundial (Sindan, 2013; Costa-Junior e Amarante, 2015).

Alternativamente, o uso de produtos de origem vegetal tem crescido nos últimos anos (Githiori et al., 2006) por ser uma importante aliada no controle estratégico de nematodeos gastrointestinais, prolongando a vida útil dos anti-helmínticos (Ferreira et al., 2013; Macedo et al., 2015; Kumarasingha et al., 2016),

além uma possibilidade de tratamento simples, reduzindo custos, e apresentarem como vantagem o desenvolvimento mais lento da resistência (Nogueira et al., 2006; Chagas et al., 2011).

Diversos compostos relacionados ao mecanismo de defesa vegetal, entre eles proteínas e compostos fenólicos, têm demonstrado propriedades biológicas (Klongsiriwet et al., 2015; Rocha et al., 2015; Araújo et al., 2017), entre elas, nematicidas, tornando-se potenciais no desenvolvimento de novos produtos para o controle de *H. contortus* (Junwei et al., 2013; Soares et al., 2015). Várias proteínas vegetais, incluindo os inibidores de proteases (IPs) estão entre os compostos com atividade anti-helmíntica (Zhao et al. 2012; Soares et al. 2015; Rocha et al. 2015), por inibirem a atividade catalítica de proteases através da formação de complexos com enzimas alvo, alterando ou bloqueando o sítio ativo (Volpicella et al., 2011). Esse mecanismo de inibição tem sido observado com proteases de nematoídeos que são essenciais no crescimento e desenvolvimento (Santos et al., 2012; Page et al., 2014; Li et al., 2017). Os IPs de plantas estão presentes em sementes, tubérculos, folhas, raízes e flores (Padul, Tak e Kachole, 2012; Krishnan e Murugan, 2015), onde funcionam como proteínas de armazenamento e/ou reguladores endógenos de atividade proteolítica (Grosse-Holz e Van der Hoorn, 2016) e outros eventos relacionados à proteção de plantas contra pragas e patógenos (Sharma e Sharma, 2011).

Assim, nesse contexto, e visando contribuir para o desenvolvimento de métodos de controle alternativos para *H. contortus*, esse trabalho foi conduzido com base nos seguintes fatos: (a) a soja tem elevado valor econômico (CONAB, 2018) e o Brasil é um dos maiores produtores mundiais (Junior et al., 2017); (b) a ação do exsudato de sementes de soja foi previamente relatada contra um fitonematóide e inibidores de protease estão entre as proteínas exsudatas (Rocha et al., 2015); (c) inibidores de proteases possuem ação antihelmíntica (Izuhara et al., 2008); (d) A soja é uma planta de genoma completo descrito (Melo, 2016). Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a ação de exsudatos de sementes de soja, enriquecidos com inibidores de proteases, sobre *H. contortus*.



## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Hemoncose em pequenos ruminantes

Com a extensão territorial brasileira e clima favorável, a ovinocultura e caprinocultura apresenta alto potencial (Poli, et al, 2008; IBGE, 2016) por ser uma prática econômica no setor agropecuário de fácil manejo (Aquino et al., 2016). Mas um dos principais problemas encontrados são as parasitoses gastrointestinais (Costa et al, 2009; Andriola et al., 2011).

No Brasil, a maioria dos rebanhos de pequenos ruminantes é criada de forma semiextensiva (Costa et al., 2010) com ineficiente repasse de tecnologias ou de informações quanto a utilização correta de drogas antiparasitárias, o que torna a criação exposta à infecção (Torres-Acosta e Hoste, 2008). Este fato se agrava quando os animais estão em áreas com alta lotação, o que gera maior contaminação ambiental, com elevada densidade populacional do parasito (Amarante e Sales, 2007; Coêlho et al., 2017).

*Haemonchus contortus* é uma das principais espécies que acomete pequenos ruminantes em todo o mundo, e com elevada prevalência na América do Sul (Bordin et al., 2004; Almeida et al., 2010). Isso se deve a sua resistência comprovada a alguns anti-helmínticos de largo espectro (Fortes e Molento, 2013; Coêlho et al., 2017), como benzimidazóis (albendazol, fenbendazol) (Barrère et al., 2013; Garcia et al., 2016), imidazóis (levamisol) (Garcia et al., 2016), lactonas macrocíclicas (ivermectina, moxidectina) (Chagasa et al., 2013; Garcia et al., 2016), closantel e monepantel (Mederos et al., 2014; Van Den Brom et al., 2015).

A sintomatologia provocada no hospedeiro, pelo parasito *H. contortus*, está relacionada ao seu hábito hematófago (Taylor et al., 2002), em que os sinais da hemoncose comumente observados são: edema submandibular, progressiva perda de peso, fraqueza, desidratação e anemia severa, caracterizada pela queda do volume globular, palidez das mucosas, dificuldade respiratória e redução da eficiência reprodutiva (Carvalho, 2011; Yuki, 2012; Endo et al., 2014). Em casos mais graves de intensa infestação pode levar à morte súbita dos animais (Climeni et al., 2008).

## 2.2 Ciclo de vida de *Haemonchus contortus* e características das fases de desenvolvimento

O *H. contortus* tem ciclo de vida direto, não precisando de hospedeiro intermediário. Com o desenvolvimento a partir de ovos que são lançados no ambiente junto às fezes passando por transformações e eclodindo entre um ou dias, surgindo uma larva de primeiro estágio (L1). Em seguida, ocorre a primeira muda, passando para larva de segundo estágio (L2), as quais são de vida livre e se alimentam de microrganismos. Posteriormente ocorre então a segunda muda, a qual retém a bainha ou cutícula da fase anterior e tornando-se larva infectante de terceiro estágio (L3). A L3 mantém a cutícula da fase larval anterior, esta por sua vez, servirá de proteção contra a dissecação. Desta forma, agora uma larva infectante, pode migrar para fora da massa fecal e, posteriormente para a vegetação, principalmente quando encontra lâmina d'água adequada, ficando a espera de um hospedeiro susceptível. A fase compreendida desde ovo a L3 é chamada de fase de vida livre. Quando a L3 é ingerida por este hospedeiro, até a fase adulta é conhecida como fase de vida parasitária, esta perde a cutícula no abomaso e passa para o quarto estágio (L4) e para a fase adulta (L5), em que ocorre cópula do macho com a fêmea com consequente liberação dos ovos ao ambiente juntamente com as fezes, ou as larvas adultas podem entrar em hipobiose (Climeni et al., 2008) (Figura 1).

O ovo do *H. contortus* é uma etapa importante no ciclo do parasita, tanto da perspectiva de desenvolvimento do parasita como alvo para estratégias de controle (Mansfield et al., 1992). A cutícula do ovo do *H. contortus* é formada por três camadas básicas: uma vitelínica; uma quitinosa e uma formada por lipídios e algumas proteínas (Mansfield et al., 1992). O estudo das características estruturais do ovo é uma importante ferramenta para o entendimento da penetração de substâncias antiparasitárias, bem como seu modo de ação e mecanismos de desenvolvimento da resistência.

A eclosão do ovo com consequente liberação da larva do primeiro estágio é resultante de uma combinação de mecânica de estímulos ambientais e eventos enzimáticos (Rogers e Brooks, 1977; Ford et al., 2009). Estas enzimas presentes no

fluido de eclosão de *H. contortus* estão incluídas nos grupos das proteases, lipases, quitinases,  $\alpha$  e  $\beta$ - glicosidases e leucinas aminopeptidases (Rogers e Brooks, 1977). A inibição destas enzimas causa redução ou inibição total do processo de eclosão (Rogers e Sommerville, 1962).

Já as larvas possuem uma cutícula que forma o exoesqueleto (Page e Johnstone, 2007), que é um revestimento externo essencial para o crescimento, locomoção e sobrevivência dos nematoides. Essa estrutura pode diferir entre espécies ou mesmo entre as fases de vida de uma mesma espécie, no entanto, apresenta uma forma estrutural básica constituída de proteínas com pequena quantidade de lipídios e carboidratos (Bird e Bird, 1991; Fettere e Rhoads, 1993), Gadahi e colaboradores (2016) identificaram um grupo de peptidases a partir de fluidos excretórios e secretórios de *H. contortus*. Estas desempenham um papel crucial no catabolismo da globina através da clivagem da hemoglobina e penetração no tecido do hospedeiro (Hartman et al., 2001; Nikolau e Gasser, 2006).

Os adultos deste nematóide possuem tamanhos que variam entre 1 a 3 cm de comprimento e podem ser facilmente identificados devido a sua localização específica no abomaso (Amarante, 2007). Possuem uma cavidade bucal permite perfurar e fixar-se no intestino do animal, e os machos apresentam um raio dorsal assimétrico em sua bolsa copuladora com espículos curtos e cuneiformes. As fêmeas têm útero longo e branco, repleto de ovos (Vasconcelos, 2014).

### **2.2.1 Importância de proteases no ciclo de vida de *H. contortus***

Proteases são enzimas proteolíticas que clivam ligações peptídicas de outras proteínas (Soisson et al, 2010; Rakashanda et al., 2012). São classificadas em grupos de acordo com resíduos de aminoácidos funcionais e sítio catalítico: protease serínica, cinstínica, metaloprotease e aspártica (Felix, Noronha, Marco, 2004). Essas enzimas possuem uma ampla distribuição, podendo ser encontradas em todos os seres vivos, animais, vegetais, microrganismos e nematoides (Tremacoldi et al., 2007; Liang et al., 2010; Junwei et al., 2013).

No ciclo biológico dos helmintos, incluindo *Brugia pahangi* (Hong et al., 1993), *Dirofilaria immitis* (Richer et al., 1992), *Trichuris suis* (Hill et al., 1993), *Trichinella*

*spiralis* (Lun et al., 2003), *Hysterothylacium aduncum* (Malagon et al., 2010), *Ancylostoma caninum*, *Ancylostoma duodenale* (Hotez et al., 1990; Hawdon et al., 1995) e o nematoide de filariose bovina, *Setaria cervi* (Pokharel et al., 2006), as proteases são fundamentais uma vez que estão envolvidas na eclosão de ovos (Rogers e Brooks, 1977; Mansfield et al., 1992), desembainhamento (Davis et al., 2004; Stepek et al., 2011; Page et al., 2014) e degradação do tecido alvo no momento da penetração no hospedeiro.

Proteases cisteínicas, serínicas, metaloproteases e aspárticas têm papéis fundamentais na digestão da cutícula antiga, degradação de proteínas cuticulares e ativação de enzimas de muda processando suas pró-enzimas (Page et al., 2014).

Em uma análise proteômica de proteínas excretórias e secretórias de *H. contortus* realizado por Gadahi et al. (2016), foi observado a presença de 47 proteínas comuns em todos os estágios de desenvolvimento. Entre elas as peptidases cisteínicas, serínicas, e metaloproteases, sendo estas mais expressivas nos estágios L4 e adulto (Knox, 2007). A identificação de proteínas secretadas relacionadas à família das peptidases indicaram que essas proteínas desempenham um papel crucial no catabolismo da globina pela clivagem da hemoglobina (Nikolaou et al., 2006). O desenvolvimento de L3 para L4 *in vitro* leva à liberação de uma metaloprotease que inibe a coagulação do sangue (Hartman et al., 2001; Nikolaou et al., 2006). Também estão envolvidas no processo de ecdise e permitem o desembainhamento do nematoide parasita *H. contortus* (Davis et al., 2004; Stepek et al., 2011).

No trabalho realizado por Page e colaboradores (2014), verificaram que o *C. elegans* codifica uma protease cisteínica de catepsina-L (CE-CPL-1) que está presente na faringe, gônadas, hipoderme, intestino, casca do ovo e cutícula (Page et al., 2014), e é semelhante às proteases em *Onchocerca volvulus*, *Brugi pahangi*, *Haemonchus contortus*, *Dictyocaulus viviparus*, *Toxocara canis*, *Ancylostoma caninum*, *Ascaris suum* e nematódeos parasitas de plantas, como *Heteodera glycines* (Britton e Murray, 2002), e acredita-se que esteja envolvido no desenvolvimento do embrião através da degradação da casca do ovo e proteínas da cutícula (Hashmi et al., 2002).

### 2.3 Potencial anti-helmíntico de Inibidores de proteases

Levando-se em consideração a ação de proteínas vegetais sobre diferentes organismos, incluindo nematoides, fungos, bactérias e outros (Steppek et al., 2007; Costa et al., 2010; Arulpandi e Sangeetha, 2012), algumas proteínas vegetais se destacam com relação ao seu potencial anti-helmíntico, entre elas, os inibidores de proteases (Izuhara et al., 2008; Palavalli et al., 2012; Rocha et al., 2015).

Os inibidores de protease são moléculas que possuem a capacidade de inibir a atividade catalítica de enzimas proteolíticas (Lingaraju e Gowda, 2008; Tremacoldi, 2009), através da formação de um complexo estável com proteases alvos, bloqueando ou alterando o acesso ao sítio ativo da proteína (Tremacoldi, 2009), e classificados em famílias conforme sua especificidade por proteases, ou seja, podem ser do tipo cisteínica, serínica, metalo ou aspártica (Lawrence e Koundal, 2002). Alguns inibidores de proteases têm a capacidade de inibir apenas uma ou duas proteases, especificamente relacionadas, enquanto outros são ativos contra diferentes enzimas dentro de uma mesma classe (Weder, 1986).

Estudos têm apontado que inibidores possuem potencial biotecnológico com aplicações na agricultura (Kim et al., 2009; Rahimi e Abdollahi, 2012; Rakashanda e Amin, 2013), por serem promissores no controle de fitonematoides. Exemplificando, os inibidores da soja afetaram o crescimento, desenvolvimento, locomoção, frequência e fecundidade no ciclo de vida do *M. incognita* (Atkinson et al., 2003; Rocha et al., 2015). Assim como nos ensaios fitoquímicos que demonstraram inibição da atividade da protease serínica pelo inibidor de tripsina do feijão-de corda em *Heterodera glycines* (Urwin et al., 1997). Adicionalmente, o inibidor de protease serínica expresso em plantas da batata transgênica suprimiu o crescimento e desenvolvimento inicial da *Globodera palida* (Atkinson, 2003). Também o crescimento de *H. schachtii* e *M. incognita* foi suprimido tendo dois efeitos distintos: As fêmeas produziram menos ovos e os ovos produzidos eram menores. Esses resultados foram correlacionados com redução da protease cisteínica intestinal produzida após uso de linhas transgênicas dos inibidores de proteases das plantas (Urwin et al., 1997).

Esses estudos corroboram com o fato de que inibidores de proteases podem ser utilizados no controle de nematoides.

## **2.4 Soja (*Glycine max*)**

### **2.4.1 Soja na produção animal**

A soja pertence ao Reino Plantae, Classe Magnoliopsida, Ordem Fabales, Família Fabaceae (conhecida também como Leguminosae), subfamília Faboidae (Papilionoidae), gênero *Glycine*, espécie *Glycine max* (Sedyama et al., 2009).

Sua semente é nativa da China e Japão que foi introduzida à cultura agrícola brasileira no século XIX, crescendo nos últimos anos correspondendo a 49% da área plantada no país, especialmente no Centro-Oeste e Sul do Brasil (IBGE, 2016). O Brasil é responsável por 31,04% da produção mundial de soja, ocupando o segundo lugar entre os países produtores, atrás apenas dos Estados Unidos (CONAB, 2017). Segundo o levantamento realizado pela Companhia Nacional de Abastecimento (2017), o consumo mundial de grãos de soja no ano agrícola 2015/16 foi de 315,7 milhões de toneladas e a produtividade mundial do grão saltou de 2.113 kg ha<sup>-1</sup> de 1995/1996 para 2.601 kg ha<sup>-1</sup> em 2015/2016, e apresentou uma taxa geométrica de crescimento anual de 0,9% no período. Em outros termos, a produtividade tem sido aspecto fundamental para que o crescimento constante no consumo mundial do grão seja atendido pelos países produtores.

No Brasil, a taxa média anual de aumento de produção foi superior a três milhões de toneladas (Junior et al., 2017). O Maranhão produziu 2.099.507 toneladas, com área colhida de 761.225 hectares, (PAM, 2016). Vale ressaltar que o Maranhão é um dos dois estados produtores de soja no país com previsão de aumento de produção (5,1%, ou 127 mil toneladas) em relação à última safra, pelos bons resultados alcançados na safra anterior e pelas boas condições meteorológicas (CONAB, 2017).

O preço médio da saca de 60 kg, até novembro de 2017, variou de 1,59 % a 2,25 % na última semana do mês, encerrando o período cotada entre R\$ 60,00 e 62,50 a saca em diferentes regiões brasileiras (CONAB, 2017). Dentre os fatores

que corroboram para essa diferença, pode-se destacar: a perspectiva de clima adverso na América do Sul e novas compras por parte da China, maior importador mundial de grãos (FAMASUL, 2017).

A ampla utilização da soja na alimentação humana e animal (na forma de farelo ou pellets na ração) (Cruz et al., 2016), bem como na fabricação de fertilizantes e do biodiesel se justifica pelo elevado teor nutricional de seus grãos, constituídos, principalmente por 38-40% de proteínas, 30% de carboidratos e 18% de óleo (Burton, 1997). A semente de soja é de cultivo anual, autógama e possui porte ereto com altura variando de 30 a 200 cm. O ciclo da cultura pode ser de 75 até 200 dias (Miyasaka e Medina, 1981; Gassen e Borges, 2004). A temperatura do ar ideal para o crescimento e o desenvolvimento da soja está entre 20 e 30°C (Gassen e Borges, 2004).

Nas últimas décadas, há um grande interesse em particular nos potenciais benefícios que uma dieta rica nos compostos presentes nas sementes de soja que podem contribuir no controle de doenças crônicas (Peixoto, 2000; Cunha et al., 2015). O maior interesse dos pesquisadores é na farmacologia e fisiologia em que estes compostos possuem diversas propriedades biológicas (atividade antioxidante, inibição da atividade enzimática e outras) que podem influenciar muitos processos bioquímicos e fisiológicos (Setchell, 1998; Cho et al., 2010). Os relatos vão desde prevenção da perda óssea pós-menopausa e a osteoporose (Mandarino et al., 2002; Zhang et al., 2005), efeitos da genisteína na regulação da secreção de insulina também tem sido demonstrados, índices reduzidos de doenças coronárias, câncer de próstata e o de mama na população chinesa que mais consome soja (Goetzl et al., 2007; Cho et al., 2010), auxílio no combate a diabetes mellitus, doenças cardiovasculares e osteoporose (Zhang et al., 2005; Goetzl et al., 2007; Kurahashi et al., 2008).

#### **2.4.2 Perspectivas do uso de exsudatos das sementes de soja como anti-helmínticos**

Durante a fase de germinação, a semente quiescente inicia o acúmulo de água por embebição (Scarafoni et al., 2013). O rápido acúmulo de água leva à quebra do revestimento da semente e a liberação de compostos internos (Simões, 2008). Essa

capacidade de liberação de compostos durante a embebição e germinação das sementes é conhecida como exsudação (Nelson, 2004). Muitos desses compostos são capazes de atuar de forma direta ou indireta nos próprios processos germinativos ou de desenvolvimento de uma plântula saudável (Barbour; Hattermann; Stacey, 1991).

Adicionalmente, a exsudação de sementes é capaz de interferir no desenvolvimento de organismo dispostos na região do solo que envolve a semente (Nobrega et al., 2005). Essa interferência representa uma das maiores influências sobre o crescimento de microrganismos, pragas e patógenos (Mel'nikova; Omel'chuk, 2009; Scarafoni et al., 2013), podendo levar a exercer efeitos quimioatrativos à microrganismos presentes no solo ou, ainda, a impedir o crescimento de patógenos e a consequente colonização da semente e da plântula (Barbour et al., 1991).

Uma série de estudos foi realizada para desenvolver potencial anti-helmíntico dos exsudatos de sementes (Gifone et al., 2012; Rocha et al., 2015; Licá et al., 2018). Esses exsudatos contêm substâncias nematicidas levando a morte ou redução na mobilidade (Rocha et al., 2015). Um exemplo é a mortalidade dos fitonematoides *Heterodera schachtii*, *Meloidogyne hapla* and *Pratylenchus penetrans* causada por exsudatos de sementes de *Tagetes erecta* cv. crackerjack e *T. patula* var. polynema (Riga; Hooper; Potter, 2004).

Recentemente, foi demonstrado que o exsudato das sementes de *G. max* apresenta ação contra fitonematoide *Meloidogyne incognita* (Rocha et al., 2015). Relatou-se a presença de diversas proteínas no exsudato, dentre elas, inibidores de proteases. Entretanto é importante salientar que não há estudos que avaliam as propriedades biológicas de compostos exsudatos de sementes de *G. max* sobre nematoides gastrointestinais.



### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Geral

Avaliar o potencial anti-helmíntico dos exsudatos obtidos das sementes de *Glycine max*, enriquecidos com inibidores de proteases.

#### 3.2 Específicos

- Avaliar a ação anti-helmíntica *in vitro* de exsudatos de *Glycine max* sobre o nematoide *H. contortus*;
- Investigar a possível relação de inibidores de proteases presentes nos exsudatos com inibição da eclosão de ovos de *Haemonchus contortus*

## REFERÊNCIAS

- Almeida F.A., Garcia K.C., Torgerson P.R., 2010. Multiple resistance to anthelmintics by *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* in sheep in Brazil. *Parasitology International*, 59: 622-625.
- Amarante, A.F.T., 2005. Controle de verminose. *Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária*. Brasília: DF, 34: 19-30.
- Amarante, A.F.T., Sales, R.O., 2007. Controle de endoparasitoses dos ovinos: uma revisão. *Ver. Bras. de Hig. e San Animal*, 1 (2): 14-36.
- Andriola, L.C., Oliveira, S.V.F.B., Pereira, J.S., Coelho, W.A.C., Ahid, S.M.M., 2011. Diagnóstico de Principais Helminthos em Caprinos no Município de Grossos-RN. *Rev. Cient. Prod. Anim.*, 13 (1): 141-144.
- Araújo, S.A., Soares, A.M.S., Silva, C.R., Junior, E.B.A., Rocha, C.Q., Ferreira, A.T.S., Perales, J., Costa-Junior, L.M., 2017. *In vitro* anthelmintic effects of *Spigelia anthelmia* protein fractions against *Haemonchus contortus*. *PLoS ONE* 12 (12).
- Arulpandi, I., Sangeetha, R., 2012. Antibacterial Activity of Fistulin: A Protease Inhibitor Purified from the Leaves of *Cassia fistula*. *ISRN: Pharmaceutics Volume*, p. 4.
- Aquino, R.S., Lemos, C.G., Alencar, C.A., Silva, E.G., Lima, R.S., Gomes, J.A.F., Silva, A.F., 2016. A realidade da caprinocultura e ovinocultura no semiárido brasileiro: um retrato do sertão do Araripe, Pernambuco. *Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia – PUBVET*, 10 (4): 271-281.
- Atkinson, H.J., Urwin, P.E., McPherson, M.J., 2003. Engineering plants for nematode resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 41: 615–639.
- Barrere, V.; Falzon, L.C.; Shakya, K.P., 2013. Assessment of benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* in sheep flocks in Ontario, Canada: Comparison of detection methods for drug resistance. *Veterinary Parasitology*. 198 (1–2): 159–165.
- Barbour, W. M., Hatterman, D. R., Stacey, G., 1991. Chemotaxis of *Bradyrhizobium japonicum* to soybean exudates. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 57, p. 2625–2639.
- Bird, A.F., 1971. *The Structure of Nematodes*, 114-137. Academic Press, New York.
- Bird, A.F., Bird, J., 1991. *The structure of nematodes* (S. Diego, CA, Academic Press).

Bordin, E.I. Algumas considerações sobre a resistência de nematodas gstrintestinais de ruminantes aos anti-helmínticos. In: Congresso Brasileiro De Parasitologia Veterinária, N.13; Simpósio Latino-Americano de Ricketisioses, n.1,2004, Ouro Preto. Anais...Ouro Preto, MG, 2004.

Borges, F.A., Almeida, G.D., Heckler, R.P., Lemes, Onizuka, M.K.V., Borges, D.G.L., 2013. Anthelmintic resistance impact on tropical beef cattle productivity: effect on weight gain of weaned calves. *Trop. Anim. Health Prod.* 45, 723-727.

Brito, D. L., 2010. Efeito do pastejo alternado e simultâneo de ovinos e bovinos sobre a infecção endoparasitária e suas consequências no sistema sanguíneo. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília. 56p. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais).

Britton, C., Murray, L., 2002. A cathepsin L protease essential for *Caenorhabditis elegans* embryogenesis is functionally conserved in parasitic nematodes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 122, 21–33.

Burton, J. W., 1997. Soyabean (*Glycine max* (L.) Merr.). *Field Crops Research*, 53: 171-186.

Carvalho, C.O., 2011. Eficácia de extratos vegetais em nematódeos parasitas: avaliação *in vitro* em *Haemonchus contortus* e avaliação *in vivo* em *Strongyloides venezuelensis*. Dissertação (Mestrato em Biologia Geral e Aplicada) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo.

Chagas, A.C.S., Bizzo, H.R., Ferreira, J.F.S., Amarante, A.F.T., 2011. Anthelmintic activity of *Cymbopogon martinii*, *Cymbopogon schoenanthus* and *Mentha piperita* essential oils evaluated in four different *in vitro* tests. *Veterinary Parasitology*, 183: 103-108.

Chagasa, A.C.S.; Katiki, L.M.; Silva, I.C., 2013. *Haemonchus contortus*: A multiple-resistant Brazilian isolate and the costs for its characterization and maintenance for research use. *Parasitology International*, 62 (1): 1–6.

Cho, Y., Kim, J., Park, K-S., Lim, S-Y., Shim, A., Sung, M-K., Ro, J., 2010. Effect of dietary soy intake on breast cancer risk according to menopause and hormone receptor status. *European Journal of Clinical Nutrition*, 64: 924–932.

Climeni, B.S.O., Monteiro, M.V., Cicoti, C.A., Neves, M.F., 2008. Hemoncose ovina. Editora FAEF. São Paulo, 11 (11).

Coêlho, M.D.G., Ribeiro, J.C., Almeida, K.S., Franco, T.F., Maciel, L.T.R., Pereira, F.B.S., Bozo, L.S.O., Coêlho, F.A.S., 2017. Eimeriose em bovinos leiteiros do município de Silveiras – SP. *PUBVET*, 11 (3): 267-271.

CONAB. Séries históricas de safras. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1252&t=>>. Acesso em: 07 de janeiro. 2018.

Costa, M.D., Lovato, P.E., Sete, P.B., 2010. Micorrização e indução de quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanases e resistência à fusariose em porta-enxerto de videira. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, 45 (4): 376-383.

Costa, V.M.M., Simões, S.V.D., Riet-Correa, F., 2009. Doenças parasitárias em ruminantes no semi-árido brasileiro. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 29 (7): 563-568.

Costa-Junior, L.M., Amarante, A.F.T., 2015. Controle de helmintos de ruminantes no Brasil. Paco Editorial. 1ed., 316 p.

Croll, N.A., 1976. *Necator americanus*: activity patterns in the egg and mechanism of hatching. *Experimental Parasitology*, 35, 80-85.

Cruz, S.C.S., Sena-Junior, D.G., Santos, D.M.A., Lunezzo, L.O., Machado, C.G., 2016. Cultivo de soja sob diferentes densidades de semeadura e arranjos espaciais. *Revista de Agricultura Neotropical, Cassilândia-MS*, 3 (1): 1–6.

Cunha, D.S., Viana, J.S., Silva, W.M., Silva, J.M., 2015. Soja Para Consumo Humano: Breve Abordagem. Agrarian Academy, Centro Científico Conhecer - Goiânia, 2 (3), 101 p.

Davis, M.W., Birnie, A.J., Chan, A.C., Page, A.P., Jorgensen, E.M., 2004. A conserved metalloprotease mediates ecdysis in *Caenorhabditis elegans*. *Development*, 131, 6001–6008.

EMBRAPA SOJA. Tecnologias de produção da soja – Região Central do Brasil - 2013. Londrina: 2013. 265 p. (Sistema de produção/Embrapa Soja, n.16).

Endo, V.T., Oliveira, T.C., Cabral, A.P.M., Sakamoto, C.A.M., Ferraro, G.C., Pereira, V., Lopes, W.D.Z., Mazzucatto, B. C., 2014. Prevalência dos helmintos *Haemonchus contortus* e *Oesophagostomum columbianum* em pequenos ruminantes atendidos no setor de Anatomia Patológica – UEM. *Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública*, 1 (2): 112-118.

FAMASUL – Fundação da Agricultura e Pecuária do Mato Grosso do Sul. Boletim Rural, Casa Rural, Sistema Famasul. Acompanhamento de safra soja 2017/2018 – Circular 232/2017.

Felix, C.R., Noronha, E.F., Marco, J.L., 2004. Protease: características e aplicações industriais. In: S. Said; R.C.L.R Pietro. *Enzimas como agents biotecnológicos*, Ribeirão Preto: Legis Summa, 115-129.

Ferreira, L.E., Castro, P.M.N., Chagas, A.C.S., França, S.C., Belebony, R.O. 2013. *In vitro* anthelmintic activity of aqueous leaf extract of *Annona muricata* L.

(Annonaceae) against *Haemonchus contortus* from sheep. *Experimental Parasitology*, 134, 327–332.

Fetterer, R.H., Urban, J.F., Miller, Jr.R.W., 1989. Effects of the chitin synthesis inhibitor diflubenzuron on development of *Ascaris suum* and *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*, 32, 181-192.

Ford, L., Zhang, J., Liu, J., Hashmi, S., Fuhrman, J.A., Oksov, Y., Lustigman, S., 2009. Functional analysis of the cathepsin-like cysteine protease genes in adult *Brugia malayi* using RNA interference. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 3, 377.

Fortes, F.S., Molento, M.B., 2013. Resistência anti-helmíntica em nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes: avanços e limitações para seu diagnóstico. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 33 (12): 1391-1402.

Gadahi, J.A., Wang, S., Bo, G., Ehsan, M., Yan, R., Song, X., Xu, L., Xiang Rui L., 2016. Proteomic Analysis of the Excretory and Secretory Proteins of *Haemonchus contortus* (HcESP) Binding to Goat PBMCs *In Vivo* Revealed Stage-Specific Binding Profiles. *PLoS ONE* 11(7): e0159796.

Garcia, C.M., Sprenger, L.K., Ortiz, E.B., Molento, M.B., 2016. First report of multiple anthelmintic resistance in nematodes of sheep in Colombia. *An Acad Bras Cienc.*, 88 (1): 397-402

Gassen, F., Borges, L.D., 2004. Importância Econômica Da Soja. In: Forcelini, C.A.; Reis, E.M.; Gassen, F.; Yorinori, J.T.; Hoffman, L.; Constamilan, L.; Silva, O.C. Da.; Balardin, R.; Casa, R.T. Doenças na cultura da soja. Passo Fundo: Aldeia Norte, p. 11-13.

Gifoni, J. M., Oliveira, J. T., Oliveira, H. D., Batista, A. B., Pereira, M. L., Gomes, A. S., Vasconcelos, I. M., 2012. A novel chitin-binding protein from *Moringa oleifera* seed with potential for plant disease control. *Biopolymers*, 98(4), 406–415.

Girão, E.S., Girão, R.N., Medeiros, L.P., 1998. Verminose em ovinos e seu controle. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 19 p. (Embrapa Meio-Norte, Circular Técnica, 19).

Githiori, J.B., Athanasiadou, S., Thamsborg, S. M., 2006. Use of plants in novel approaches for control of gastrointestinal helminths in livestock with emphasis on small ruminants. *Veterinary Parasitology*, 139 (4): 308-320.

Goetzl, M.A., Van Veldhuizen, P.J., Thrasher, J.B., 2007. Effects of soy phytoestrogens on the prostate. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, 10: 216–223.

Grosse-Holz F.M., Van der Hoorn, R.A., 2016. Juggling jobs: roles and mechanisms of multifunctional protease inhibitors in plants. *New Phytol.* 210 (3): 794-807.

Hartman, D., Donald, D.R., Nikolaou, S., Savin, K.W., Hasse, D., Presidente, P.J., 2001. Analysis of developmentally regulated genes of the parasite *Haemonchus contortus*. *Int. J. Parasitol.*, 31 (11): 1236 – 1245.

Hashmi, S., Britton, C., Liu, J., Guiliano, D.B., Oksov, Y., Lustigman, S., 2002. Cathepsin L is essential for embryogenesis and development of *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.*, 277 3477–3486.

Hawdon, J.M., Jones, B.F., Perregaux, M.A., Hotez, P.J., 1995. *Ancylostoma caninum*: metalloprotease release coincides with activation of infective larvae *in vitro*. *Exp. Parasitol.*, 80, 205–211.

Hill, D.E., Gamble, H.R., Rhoads, M.L., Fetterer, R.H., Urban Jr., J.F., 1993. *Trichuris suis*: a zinc metalloprotease from culture fluids of adult parasites. *Exp. Parasitol.*, 77: 170–178.

Hong, X., Bouvier, J., Wong, M.M., Yamagata, G.Y., McKerrow, J.H., 1993. *Brugia pahangi*: identification and characterization of an aminopeptidase associated with larval molting. *Exp. Parasitol.* 76, 127–133.

Hoste, H., Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C.A., Mueller-Harvey, I., Sotiraki, S., Louvandini, H., Thamsborg, S.M., Terrill, T.H., 2015. Tannin containing legumes as a model for nutraceuticals against digestive parasites in livestock. *Vet. Parasitol.*, 212: 5-17.

Hotez, P., Haggerty, J., Hawdon, J., Milstone, L., Gamble, H.R., Schad, G., Richards, F., 1990. Metalloproteases of infective *Ancylostoma hookworm* larvae and their possible functions in tissue invasion and ecdysis. *Infect. Immun.* 58, 3883–3892.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Anuário Estatístico 2016. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em 23 de fevereiro de 2016.

IMEA. Instituto Mato-grossense de Economia Agropecuária. Informe de comercialização de soja: safra 2016/17, novembro 2017. Cuiabá, 2018.

Izuhara, K., Kanaji, S., Arima, K., Ohta, S., Shiraishi, H., 2008. Involvement of cysteine protease inhibitors in the defense mechanism against parasites. *Med Chem*, 4(4): 322-327.

Junior, A.A.B., Hirakuri, M.H., Franchini, J.C., Debiasi, H., Ribeiro, R.H., 2017. Análise da área, produção e produtividade da soja no Brasil em duas décadas (1997-2016). *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento* 11. Embrapa – Soja.

Junwei, W., Qingling, M., Jun, Q., Weisheng, W., Shuangqing, C., Jianxun, L., Chunguang, Z., Chuangfu, C., 2013. The recombinant serine protease XAoz1 of *Arthrobotrys oligospora* exhibits potent nematicidal activity against *Caenorhabditis elegans* and *Haemonchus contortus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 344, 53-59.

- Kim, J.Y., Park, S. C., Hwang, I., Cheong, H., Nah, J. W., Hahm, K. S., Park, Y., 2009. Protease Inhibitors from Plants with Antimicrobial Activity. *Int. J. Mol. Sci.*, 10: 2860-2872.
- Klongsiriwet, C., Quijada, J., Williams, A.R., Mueller-Harvey, I., Williamson, E. M., Hoste, H., 2015. Synergistic inhibition of *Haemonchus contortus* exsheathment by flavonoid monomers and condensed tannins. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance* 5: 127-134.
- Knox, D.P., 2007. Proteinase inhibitors and helminth parasite infection. *Parasite Immunology*, 29, 57–71.
- Krishnan, V.G.M., Murugan K., Manoj G.S., 2015. Antihaemolytic, anti-lipid peroxidative potential by purified protease inhibitors from the fruits of *Solanum aculeatissimum* Jacq. In human erythrocytes against hydrogen peroxide. *J. Pharm. and Phytoch.*, 4(3): 203-208.
- Krychak-Furtado, S., Negrelle, R.B., Miguel, O.G., Zaniolo, S.R., Kapronezai, J., Ramos, S.J., Sotello, A., 2005. Efeito de *carica papaya l.* (caricaceae) e *musa paradisiaca* linn. (musaceae) sobre o desenvolvimento de ovos de Nematodeos gastrintestinais de ovinos. *Arquivos do Instituto Biológico*, 72 (2): 191-97.
- Kumarasingha, R., Preston, S., Yeo, T.C., Lim, D.S.L. , Tu, C.L., Palombo, E.A., Shaw, J.M., Gasser, R.B., Boag, P.R., 2016. Anthelmintic activity of selected ethno-medicinal plant extracts on parasitic stages of *Haemonchus contortus*. *Parasites & Vectors* 9:187.
- Kurahashi, N., Iwasaki, M., Inoue, M., Sasazuki, S., Tsugane, S., 2008. Plasma isoflavones and subsequent risk of prostate cancer in a nested case-control study: the japan public health center. *Journal of clinical oncology*, 26 (36): 5923- 5929.
- Lawrence, P.K., Kowndal, K.R., 2002. Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. *Electron J Biotechn.*, 5 (1): 93-109.
- Li, B., Gadahi, J.A., Gao, W., Zhang, Z., Ehsan, M., Xu, L., Song, X., Li, X., Yan, R., 2017. Characterization of a novel aspartyl protease inhibitor from *Haemonchus contortus*. *Parasites & Vectors*, 10:191.
- Liang, L., Meng, Z., Ye, F., Yang, J., Liu, S., Sun, Y., Guo, Y., Mi, Q., Huang, X., Zou, C., Rao, Z., Lou, Z., Zhang, K.Q., 2010. The crystal structures of two cuticle-degrading proteases from nematophagous fungi and their contribution to infection against nematodes. *FASEB J.* 24, 1391-1400.
- Lingaraju, M.H., Gowda, L.R., 2008. A Kunitz trypsin inhibitor of *Entada scandens* seeds: Another member with single disulfite bridge. *Biochimical et Biophysical Acta*, 1784: 850-855

Lun, H.M., Mak, C.H., Ko, R.C., 2003. Characterization and cloning of metalloproteinase in the excretory/secretory products of the infective-stage larva of *Trichinella spiralis*. Parasitol. Res. 90, 27–37.

Macedo, I.T.F., Oliveira, L.M.B., Ribeiro, W.L.C., Santos, J.M.L., Silva, K.C., Filho, J.V.A., Camurça-Vasconcelos, A.L.F., Bevilaqua, C.M.L., 2015. Anthelmintic activity of *Cymbopogon citratus* against *Haemonchus contortus*. Braz. J. Vet. Parasitol., Jaboticabal, 24 (3): 268-275.

Malagon, D., Adroher, F.J., Diaz-Lopez, M., Benitez, R., 2010. Collagenolytic activity related to metalloproteases (and serine proteases) in the fish parasite *Hysterothylacium aduncum* (Nematoda: Anisakidae). Dis. Aquat. Organ. 90, 129–134.

Mandarino, J.M.G., Bordignon, J.R., Carrão-Panizzi, M.C., 2002. A soja e a saúde humana. Londrinha: Embrapa Soja, 16 p. (Documentos, n. 178)

Mansfield, L.S., Gamble, H.R., Fetterer, R.H., 1992. Characterization of the egg shell of *Haemonchus contortus* - I. Structural components. Comp Biochem. Physiol B.; 103 (3): 681-686.

Marie-Magdeleine, C., Mahieu, M., D'alexis, S., 2010. *In vitro* effects of *Tabernaemontana citrifolia* extracts on *Haemonchus contortus*. Res. Vet. Sci., 89: 88-92.

Mederos, A.E., Ramos, Z., Banchemo, G.E., 2014. First report of monepantel *Haemonchus contortus* resistance on sheep farms in Uruguay. Parasites & Vectors, 7: 598.

Mel'nikova, N. N.; Omel'chuk, S. V., 2009 Effect of legume seed exudates on the formation of Rhizobium-legume symbiosis. Applied Biochemistry and Microbiology. v. 45, p. 297-302.

Melo, Bruno Paes de, 2016 M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Julho de 2016. Revisitando a superfamília NAC no genoma da soja: identificação e caracterização de novos membros. Orientadora: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Coorientadores: Juliana Rocha Lopes Soares Ramos e Pedro Augusto Braga dos Reis.

Minho, A.P., 2014 Endoparasitoses de ovinos: Conhecer para Combater. Bagé: Embrapa. 19p. (Embrapa, Circular Técnica, 45).

Miyasaka, S., Medina, J. C., 1981. A Soja no Brasil. Portal EMBRAPA. Campinas, ITAL - 1062 p.

Nelson, E.B., 2004. Microbial dynamics and interactions in the spermosphere. Annual Review of Phytopathology. v. 42, p. 271-309.



Nikolaou S, Gasser R.B., Prospects for exploring molecular developmental processes in *Haemonchus contortus*., 2006. International journal for parasitology, 36 (8): 859–868.

Nobrega, F.M., Santos, I.S., Da Cunha, M., Carvalho, A.O., Gomes, V. M., 2005. Antimicrobial proteins from cowpea root exudates: inhibitory activity against *Fusarium oxysporum* and purification of a chitinase-like protein. Plant Soil. v. 272, p. 223-232.

Nogueira, D.M., Moreira, J.N., Carlos, J.F., 2006. Avaliação de Plantas Mediciniais no Controle de Nematódeos Gastrintestinais de Caprinos Criados em Sistema de Base Agroecológica. Rev. Cient. Prod. Anim., 8 (2).

Padul, M.V., Tak. R.D., Kachole, M.S., 2012. Protease inhibitor (PI) mediated defense in leaves and flowers of pigeonpea (protease inhibitor mediated defense in pigeonpea). Plant Physiol Biochem., 52: 77-82.

Page, A.P., Johnstone, I.J., 2007. The cuticle. In: Wormbook. The *C. elegans* Research Community. Enlighten – Research publications by members of the University of Glasgow.

Page, A.P., Stepek, G., Winter, A.D., Pertab D., 2014. Enzymology of the nematode cuticle: A potential drug target? International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance, 4: 133–141.

Palavalli, M.H., Natarajan, S.S., Wang, T.T.Y., Krishnan, H.B., 2012. Inhibition of Soybean Seeds in Warm Water Results in the Release of Copious Amounts of Bowman–Birk Protease Inhibitor, a Putative Anticarcinogenic Agent. J. Agric. Food Chem., 60: 3135–3143.

Perfil da Agricultura Maranhense – PAM, 2016. Perfil da Agricultura na economia do Maranhão. Acesso em 12 Abr 2018.

Peixoto, C.P., 2000. Épocas de semeadura e densidade de plantas de soja: I. Componentes da produção e rendimentos de grãos. Piracicaba: Sci. Agrícola, 57 (1): 89 – 96.

Pereira, C. S., 2011. Avaliação da presença de resistência anti-helmíntica em um rebanho de ovino I no município de Porto Velho. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária. Universidade de Brasília. 60p. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais).

Perry, R.N., 1989. Dormancy and hatching of nematode eggs. Parasitol. Today 5 (12): 377-383.

Pokharel, D.R., Rai, R., Kumar, P., Chaturvedi, C.M., Rathaur, S., 2006. Tissue localization of collagenase and leucine aminopeptidase in the bovine filarial parasite *Setaria cervi*. *Filaria J.* 5, 7.

Poli, C.H.E, Monteiro, A.L.G., Barros, C.S., Moraes, A., Fernandes, M.A.M., Piazzetta, H.V.L., 2008. Produção de ovinos de corte em quatro sistemas de produção. *R. Bras. Zootec.*, 37 (4): 666-673.

Rahimi, R., Abdollahi, M., 2012. An update on the ability of St. John's wort to affect the metabolism of other drugs. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 8, 691-708.

Rakashanda, S., Amin, S., 2013. Proteases as Targets in Anticancer Therapy Using their Inhibitors. *J Life Sci*, 5 (2): 133-138.

Riga, E., Hooper, C.; Potter, J., 2005. In vitro effect of marigold seed exudates on plant parasitic nematodes. *Phytoprotection*. v. 86, p. 31-35.

Richer, J.K., Sakanari, J.A., Frank, G.R., Grieve, R.B., 1992. *Dirofilaria immitis*: proteases produced by third- and fourth-stage larvae. *Exp. Parasitol.* 75, 213–222.

Rocha, R.O., Morais, J.K.S., Oliveira, J.T.A., Oliveira, H.D., Sousa, D.O.B., Souza, C.E.A., Moreno, F.B., Monteiro-Moreira, A.C.O., Júnior, J.D.A.S., Sá, M.F.G., Vasconcelos, I.M., 2015. Proteome of Soybean Seed Exudates Contains Plant Defense-Related Proteins Active against the Root-Knot Nematode *Meloidogyne Incógnita*. *J. Agric. Food Chem.* 63, 5335–5343.

Rodríguez, A.V., Goldberg, V., Viotti, H., Ciappesoni, G., 2015. Early detection of *Haemonchus contortus* infection in sheep using three different faecal occult blood tests. *Open Veterinary Journal*, Vol., 5(2): 90-97.

Rogers, W.P., Brooks, F., 1977. The mechanism of hatching of eggs of *Haemonchus contortus*. *International Journal of Parasitology*, 7, 61-65.

Rogers, W.P., Sommerville, R.I., 1962. The physiology of the second ecdysis of parasitic nematodes. *Parasitology*, 50: 329-348.

Rose, T.L., Conceição, A.S., Xavier-Filho, J., Okorov, L.A., Fernandes, K.V.S., Marty, F., Marty-Mazars, D., Carvalho, A.O., Gomes, V.M., 2006. Defense proteins from *Vigna unguiculata* seed exudates: characterization and inhibitory activity against *Fusarium oxysporum*. *Plant Soil*, v. 286, p. 181-191.

Saddiqi, H.A., Jabbar, A., Sarwar, M., Iqbal, Z., Muhammad, G., Nisa, M., Shahzad, A., 2011. Small ruminant resistance against gastrointestinal nematodes: a case of *Haemonchus contortus*. *Parasitology Research*, 109, 1483–1500.

Salles HO, Braga ACL, Nascimento MTSC, Sousa AMP, Lima AR, Vieira LS, et al. Lectin, hemolysin and protease inhibitors in seed fractions with ovicidal activity against *Haemonchus contortus*. *Braz J Vet Parasitol* 2014; 23(2): 136-143.

Santos, S.C.O., Lopez, J.A., Meira, M., Guedes, M.T.B., David, J.M., Zacharias, F. David, J.P., Lima, F.W.M., 2012. *Haemonchus contortus* protease inhibition by n-alkyl ferulates from *Maprounea guianensis*. *Research in Veterinary Science*, 92: 492–493.

Sczesny-Moraes, E.A., Bianchin, I., Silva, K.F., Catto, J.B., Honer, M.R., Paiva, F., 2010. Resistência anti-helmíntica de nematoides gastrintestinais em ovinos, Mato Grosso do Sul. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 30 (3): 229-236.

Scarafoni, A.; Ronchi, A.; Prinsi, B.; Espen, L., Assante, G.; Venturini, G.; Duranti, M. The proteome of exudates from germinating *Lupinus albus* seeds is secreted through a selective dual-step process and contains proteins involved in plant defence. *FEBS J.* v. 280, p. 1443-1459, 2013.

Sediyama, T., 2009. *Tecnologias de produção e usos da soja*. Londrina: Ed. Mecenias, 314 p.

Setchell, K.D., 1998. Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. *American Journal Clinical of Nutrition*, Bethesda, 134 (6): 1333-1343.

Sharma, N., Sharma, K.P., Gaur, R.K., Grupta, V.K., 2011. Role of chitinase in plant defense. *Asian J Chem*, 6 (1): 29-37.

Simões, K., 2008. *Substâncias fitotóxicas e antifúngicas em sementes de leguminosas que acumulam galactomanano e xiloglucano como carboidratos de reservas de parede celular*. 220 f. Tese – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo.

SINDICATO DAS INDÚSTRIAS DE PRODUTOS PARA SAÚDE ANIMAL. Mercado Veterinário, 2014. Acesso em: 30 mar. 2018.

Soisson, S.M., Patel, S.B., Abeywickrema, P.D., Byrne, N.J., Diehl, R.E., Hall, D.L., Ford, R.E., Reid, J.C., Rickert, K.W., Shipman, J.M., Sharma, S., Lumb, K.J., 2010. Structural definition and substrate specificity of the S28 protease family: the crystal structure of human prolylcarboxypeptidase. *BMC Structural Biology*, 10:16.

Soares, A.M.S., Araújo, S.A., Lopes, S.G., Costa-Junior, L.M., 2015. Anthelmintic activity of *Leucaena leucocephala* protein extracts on *Haemonchus contortus*. *Braz. J. Vet. Parasitol.* 24: 396-401.

Steppek, G., McCormack, G., Birnie, A.J., Page, A.P., 2011. The astacin metalloprotease moulting enzyme NAS-36 is required for normal cuticle ecdysis in free-living and parasitic nematodes. *Parasitology* 138: 237–248.

Taylor, M.A., Hunt, K.R., Goodyear, K.L., 2002. Anthelmintic resistance detection methods. *Veterinary Parasitology*, 103: 183-194.

Tremacoldi, C.R., 2009. Proteases e inibidores de proteases na defesa de plantas contra pragas. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 44p.

Torres-Acosta, J.F.J.; Hoste, H., 2008. Alternative or improved methods to limit gastro-intestinal parasitism in grazing sheep and goats. *Small Rum. Res.*, v.77, p.159-173.

Urwin, P.E., Lilley, C.J., Mcpherson, M.J., Atkinson, H. J., 1997. Resistance to both cyst and root-knot nematodes conferred by transgenic *Arabidopsis* expressing a modified plant cystatin. *The Plant Journal*, 12 (2): 455-461.

Van Den Brom, R., Moll, L., Kappert, C., 2015. *Haemonchus contortus* resistance to monepantel in sheep. *Veterinary Parasitology*, 209 (3–4): 278–280.

Vasconcelos, C.C., 2014. Efeito da suplementação com pó da casca de acácia (*Acacia mangium* Willd – Mimosaceae) sobre a resposta imunológica e infecções por *Haemonchus contortus* e *Trichostrongylus colubriformis* em caprinos. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

Vilela, V.L.R., Feitosa, T.F., Linhares, E.F., Athayde, A.C., Molento, M.B., Azevedo, S.S., 2012. FAMACHA method as an auxiliary strategy control of gastrointestinal helminthiasis of dairy goats under semiarid conditions of Brazil northeastern. *Vet Parasitol*, 190: 281-284.

Volpicella, A., Leoni, C., Costanza, A., Ceci, L., 2011. Cystatins, serpins and other families of protease inhibitors in plants. *Curr. Protein Pept. Sci.*, 12: 386-398.

Weder, J.K.P., 1986. Nutritional and toxicological significance of enzyme inhibitors in plant foods. Friedman, M. (Ed.). Plenum Press, New York, 299-347.

Yuki, C.C., 2012. Caracterização fenotípica de ovinos para a resistência aos nematoides e expressão gênica de congulinina no abomaso. Salvador, Bahia. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal nos Trópicos) – Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal da Bahia, 79 p.

Zhang, X., Shu, X.O., Li, H., Yang, G., Li, Q., Gao, Y.T., Zheng, W., 2005. Prospective cohort study of soy food consumption and risk of bone fracture among postmenopausal women. *Archives Internal Medicine*, 165 (16): 1890–1895.

Zhao, Y., Shao, S., Li, X., Zhai, Y., Zhang, Q., Qian, D., Wang, Q., 2012. Isolation and Activity Analysis of a Seed-Abundant soyAP1 Gene Promoter from Soybean. *Plant Mol Biol Rep.*, 30: 1400–1407.

## CAPÍTULO II

---

Neste capítulo consta o artigo "**Inhibition of protease and *Haemonchus contortus* egg hatching by Soybean seed exudate**" que foi escrito de acordo com as normas para publicação no periódico Veterinary Parasitology.

**Inhibition of protease and *Haemonchus contortus* egg hatching by Soybean seed exudate**

H. S. Ribeiro<sup>1,2</sup>, L. M. Costa-Junior<sup>2\*</sup>, A. M. S. Soares<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Animal Science Post Graduation Program, Center of Agrarian and Environmental Sciences, Federal University of Maranhao, Chapadinha, MA, Brazil

<sup>2</sup>Laboratory of Control Parasitic, Biological and Health Sciences Center, Federal University of Maranhao, Sao Luis, MA, Brazil

<sup>3</sup>Laboratory of Plant Biochemistry, Chemical Engineering Program, Exact Sciences Center and Technology, Federal University of Maranhao, Sao Luis, MA, Brazil

\*Corresponding authors:

Tel.: +55 98 32729255

Email addresses: livioslz@yahoo.com; alexandra.ufma@gmail.com

## ABSTRACT

Gastrointestinal nematodes of small ruminants cause losses in herd productivity, being a challenge in livestock. Plant compounds have been an alternative to use of commercial anthelmintics, responsible for the selection of resistant parasites. The soybean (*Glycine max*) display high economic value and protein content. In this context, the objective of this study was to evaluate the anthelmintic activity of *G.max* seed exudates and their fractions enriched with protease inhibitors on *Haemonchus contortus*. Total exudate (T.SEX) was obtained after immersion of the seeds in 100 mM sodium acetate buffer, pH 5.0, at 10° C for 24 hours. After exhaustive dialysis (*cut-off 12 kDa*) against distilled water, it was obtained the Dialysed Exudate (D.SEX). Finally, after heat treatment of D.SEX, at 100 °C for 10 min and centrifugation (12,000 x *g*, at 4 °C for 15 minutes), the supernatant was named heat-treated exudate (H.SEX). The protein content, the protease inhibitory activity of the exudates, and their action on inhibition of hatchability *H. contortus* eggs were evaluated. In addition, the inhibitory activity of the exudates on the proteases isolated from the eggs of *H. contortus* was evaluated. Inhibition of egg hatching was also evaluated using different classes of commercial protease inhibitors [E-64 (10 µM), EDTA (1 mM), Pepstatin A (10 mM) and TPCK (10 mM)]. It was obtained 243.63, 226.88 and 121.67 milligrams of protein per kilogram of seed (mg P/seed Kg) for T.SEX, D.SEX and H.SEX, respectively. The inhibition of the proteases of *H. contortus* eggs was 31.1, 42.9 and 63.8% for T.SEX, D.SEX and H.SEX, respectively. The exudates inhibited the eggs hatching with EC<sub>50</sub> of 0.175, 0.175 and 0.241 mg / mL for T.SEX, D.SEX and H.SEX, respectively. Among commercial protease inhibitors tested, only EDTA and E-64 inhibited hatching of *H. contortus* eggs (78.98 and 28.86%, respectively). It is concluded that soybean seed exudates display protease inhibitor activity and have anthelmintic action against *H. contortus* eggs.

**Keywords:** Nematode, Anthelmintic, Inhibitors.

## INTRODUCTION

*Haemonchus contortus* is a gastrointestinal nematode responsible for large losses in livestock (Araujo and Rodrigues, 2002; Brito et al., 2009; Amarante, 2011) and high mortality rates in small ruminants (Climeni, 2008). The increased resistance of this parasite to anthelmintics has large economic impacts on livestock around the world (Nieuwhof and Bishop, 2005; Grisi et al., 2014). Currently, many studies are conducted to develop non-chemical and eco-friendly compounds, including the use of plant products (Andrade et al., 2010). Additionally, the use of plants may prolong the shelf-life of synthetic anthelmintics (Macedo et al., 2015; Kumarasingha et al., 2016).

Proteins are among the plant compounds with different biological potential that have been studied. For instance, plant protease inhibitors display anthelmintic activity (Zhao et al., 2012; Rocha et al., 2015). Protease inhibitors are proteins or peptides that inhibit the catalytic activity of proteases by forming complexes with target enzymes, altering or blocking the active site (Volpicella et al., 2011). This mechanism of inhibition has been observed with nematode proteases that are essential in growth and development (Santos et al., 2012; Page et al., 2014). Plant protease inhibitors are present in seeds, tubers, leaves, roots and flowers (Padul, Tak, Kachole, 2012; Krishnan et al., 2015), where they function as storage proteins and/or endogenous regulators of proteolytic activity (Grosse-Holz and Van der Hoorn, 2016) and other events related to plant protection against pests and pathogens (Sharma and Sharma, 2011).

Exudates released from plants, consist of complex mixtures of organic and inorganic molecules with anthelmintic potential, including protease inhibitors (Rocha et al., 2015; Licá et al., 2018). Although the inhibitory effects of seed exuded compounds against phytopathogens have been demonstrated (Adams, 2004; Rose et al., 2006; Scarafoni et al., 2013), to the best of our knowledge, this activity was not demonstrated for gastrointestinal nematodes.

The soybean (*Glycine max*) is produced from the south to north of Brazil, one the most important soybean producing countries, with 82.2 million tonnes in 2013 (Sentelhas et al., 2015). The soybean seed exudates represent a useful source of



defense molecules, which are mainly composed of peptides/proteins and secondary metabolites with the ability to inhibit pathogens (Johnston, Gatehouse, Anstee, 1993; Rocha et al., 2015).

Taken into account that protease inhibitors are thermostable proteins and were previously described in the soybean seed exudates (Palavalli et al., 2012) and the nematicidal activity of protease inhibitors was previously reported (Rocha et al., 2015) we hypothesize that soybean seed exudates and its dialyzed and heat treated fractions, display anthelmintic activity toward the gastrointestinal nematode *H. contortus* and that protease inhibitors could be related to this action.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Biological materials and Reagentes**

Mature soybean seeds cv. BRS Pala were supplied by the (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). The protease inhibitors: Ethylenedinitrilotetraacetic acid (EDTA, 431788), Trans-Epoxy succinyl-L-leucylamido(4-guanidino)butane (E-64, E3132), Pepstatin A (PEPS-RO) and (S)-1-Chloro-3-tosylamido-4-phenyl-2-butanone (TPCK, T4376) were commercially obtained by Sigma-Aldrich. All chemicals used were of analytical grade.

### **Preparation of the Soybean Seed Exudates and Protein Content**

Seed exudates were obtained as described by Rocha et al. (2015) with modifications. Briefly, 400 whole soybean seeds with no cracks or other injuries separated in 20 groups. The seeds were surface-sterilized with 30% (v/v) ethanol for 5 min and after extensive washes in running distilled water, intact seeds were transferred to 50 mL flasks. Total exudate (T.SEX) was obtained after immersion of each group of 20 seeds in 120 mL of 100 mM sodium acetate buffer, pH 5.0, at 10°C for 24 hours. After exhaustive dialysis of T.SEX (*cut-off 12kDa*) against distilled water, it was obtained the dialyzed exudate (D.SEX). Finally, after heat treatment of D.SEX, at 100 °C for 10 min and centrifugation (12,000 x *g*, at 4 °C for 15 minutes),

the supernatant was named heat-treated exudate (H.SEX). The volumes obtained were recorded and the protein content was determined (Bradford, 1976) and expressed as milligram of protein per kilogram of seed.

Solutions containing 8 milligram of protein of each exudate were freeze-dried and each resulting powder was resuspended in 4 mL of 0.25 M sodium phosphate buffer, pH 7.0 for the protease inhibitor assays or 0.01 M sodium potassium phosphate buffer, pH 7.2, containing 0.125 M NaCl for the egg hatching Test. The final pH of each sample was confirmed to be 7.0 or 7.2, respectively, after these procedures.

### **Preparation of a protease-enriched fraction from *Haemonchus contortus* eggs**

Eggs were obtained from a donor sheep, with a monospecific infection of *H. contortus* isolated from a naturally infected animal. Experimental procedures were performed according to the guidelines of the Animal Ethics Committee (CEUA) of the Federal University of Maranhão and were approved by this committee under protocol number 23115.014307/201671.

Fresh faeces were collected and mixed with warm water (37 °C). The eggs were then recovered from solution in 25 µm sieves. Recovered eggs were added to a saturated NaCl solution and centrifuged (2,540 x *g*) for 3 min; floating eggs were recovered using a 25 µm sieve (Coles et al., 1992). Eggs were washed three times with distilled water to eliminate the remaining salt and were re-suspended in sodium phosphate buffer (0.25 M, pH 7.0).

Soluble proteases were extracted from approximately 196,000 *H. contortus* eggs with sodium phosphate buffer (0.25 M, pH 7.0) (13,000 eggs/mL), under moderate maceration on ice bath, for 1 h. After extraction, the slurry was centrifuged at 12,000 x *g* for 30 min at 4°C, and the supernatant was centrifuged under the same conditions. The resulting supernatant, named total extract, was saturated to 90% with ammonium sulfate. After standing for 12 h, at 5 °C, the sample was centrifuged at 15,000 x *g*, 4°C, for 30 min and the precipitate was resuspended in 7,5 mL of sodium phosphate buffer (0.25 M, pH 6.0). After exhaustive dialysis (*cut-off* 12kDa)

against distilled water, this protein fraction was used as *H. contortus* protease source, named proteolytic fraction (PF).

## **Protease inhibitory activity of the seed exudates and commercial protease inhibitors**

### *Seed exudates*

The protease inhibitor activity was determined by measuring the inhibition of the papain activity using N-benzoyl-DL-arginine p-nitroanilide (BANA) as substrate (Abe et al., 1992). Prior to the inhibition assays, a standard curve of PF as a function of time versus absorbance (540nm) was carried out using BANA at 37 °C for 20 min (Figure 1 SA). The protein content of PF (1.2 µgP) that provided an absorbance between 0.2 and 0.35 was defined as the appropriate volume to be used in the protease inhibition assays.

For the assay of protease activity, the reaction mixture consisted of 30 µL of the PF solution + 40 µL of the activation solution + 430 µL of 250 mM sodium phosphate buffer, pH 6.0 + 200 µL of 1 mM BANA. For the detection of inhibitor activity, 100 µL of the inhibitor solution (T.SEX; D.SEX or H.SEX) were added to the above reaction mixture at the expense of 100 µL of the Na-phosphate buffer. The PF solution (0.04 mg mL<sup>-1</sup>) was prepared in the Na-phosphate and the activation solution consisted 3 mM dithiothreitol (DTT), pH 6.0. The mixture was pre-incubated for 10 min at 37 °C. The reaction was initiated by addition of BANA prepared in 1% (v/v) dimethylsulfoxide (DMSO) and 250 mM sodium phosphate buffer, pH 6.0. After 20 min at 37 °C, the reaction was stopped by the addition of 500 µL of 2% HCl in 95% ethanol. The color product was developed by adding 500 µL of 0.06% DMACA in ethanol (95%). One unit of inhibitory activity (IU) was taken as the decrease of 0.01 absorbance unit at 540 nm/mL/min compared to control (PF activity in the absence of the inhibitor), and expressed as specific inhibitory activity (IU/mgP).

### *Commercial inhibitors*

The protease inhibition of PF was also evaluated using different classes of commercial protease inhibitors [diluted in 0.25 M sodium phosphate buffer, pH 6.0] with pre-standardized concentrations: EDTA (1 mM) for metalloproteases, E-64 (10  $\mu$ M) for cysteine proteases, Pepstatin A (10 mM) for serine proteases and TPCK (10 mM) for aspartic proteases (Gamble and Mansfield, 1996; Lufrano et al., 2012; Santos et al., 2012). The assay was carried out as described above, using PF at 1.2  $\mu$ g of protein ( $\mu$ gP).

### ***In Vitro* Egg Hatching Test**

#### *Seed exudates*

The egg hatching assay was carried out following Coles et al. (1992). The T.SEX, D.SEX and H.SEX were tested at different protein concentrations (1.0, 0.5, 0.25, 0.13 and 0.06 mg mL<sup>-1</sup>) in quadruplicate. The concentrations were established after preliminary screening assays. Briefly, 250  $\mu$ L of egg suspension, containing approximately 100 fresh eggs, were incubated for 48 h at 27°C and  $\geq$  80% relative humidity (RH), with 100  $\mu$ L of each exudate. After this period, lugol (50  $\mu$ L) was added to stop eggs hatching. The eggs and first stage larvae (L1) were quantified to calculate the percent of egg hatch inhibition. The experiments were carried out in triplicate. A solution with 0.01 M sodium potassium phosphate buffer, pH 7.2, containing 0.125 M NaCl was used as negative control.

#### *Commercial inhibitors*

Inhibition of *H. contortus* eggs hatching was also evaluated, as describe above, using different classes of commercial protease inhibitors [diluted in 0.25 M sodium phosphate buffer, pH 6.0] in quadruplicate: EDTA (1 mM), E-64 (10  $\mu$ M), Pepstatin A (10 mM) and TPCK (10 mM).

## Statistical Analysis

Biochemical data were obtained in triplicate, and the results were expressed as means  $\pm$  standard deviations. For the eggs hatch assay, the mean of each treatment was compared to its respective control. The data were initially transformed to Log (X), normalized and then nonlinear regression were calculated get effective concentration (EC) to inhibited 50% of the eggs hatch using GraphPad Prism 7.0 software (GraphPad Inc., San Diego, CA, USA). One protein fraction was considered to be significantly ( $p < 0.05$ ) more (or less) efficient than another if there was no overlap between the 95% confidence intervals of the  $EC_{50}$  values (Roditakis et al., 2005).

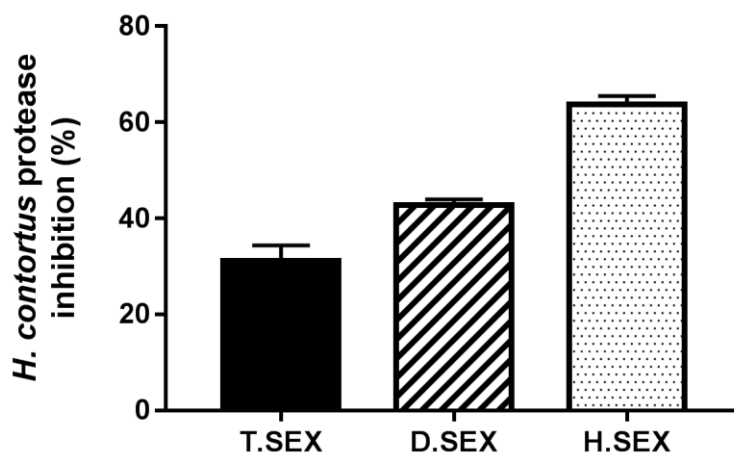
## RESULTS

### Protein Content

The soybean total seed exudate (T.SEX) presented  $243.63 \pm 7.8$  milligram of protein per seed Kilogram (mg P/seed Kg), 24 h after exudation. The amount of protein did not changed in dialyzed seed exudate (D.SEX), which presented  $226.88 \pm 6.7$  mg P/seed Kg. The heat-treated seed exudate (H.SEX) showed statistically low protein content ( $p < 0.05$ ) with  $121.67 \pm 8.5$  mg P/seed Kg.

### Protease inhibitory activity of the seed exudates and commercial protease inhibitors

All the exudates presented protease inhibitors. T.SEX, D.SEX and H.SEX inhibited 31.1, 42.7 and 63.6%, respectively, the protease activity from the *H. contortus* PF (Figure 1). The commercial inhibitors EDTA, pepstatin A, E-64 and TPCK were able to inhibit the protease activity of PF in 94.06; 99.47; 97.55; 96.72, respectively.



**Figure 1.** Inhibition of proteolytic activity of *Haemonchus contortus* eggs proteases by Total (T.SEX), Dialyzed (D.SEX) and Heat-treated (H.SEX) soybean seed exudates. Values represent the means  $\pm$  standard deviation (SD) of triplicates.

### ***In Vitro* Egg Hatching Test**

All exudates of soybean seed inhibited *H. contortus* egg hatching, with  $EC_{50}$  values of 0.175, 0.175 and 0.241 mg mL<sup>-1</sup> for T. SEX, D.SEX and H.SEX, respectively (Table 1). Among the commercial protease inhibitors used, only EDTA and E-64 inhibited the *H. contortus* egg hatching (78.98 and 28.86%, respectively).

**Table 1.** Inhibition of eggs hatch (%) and effective concentration (EC<sub>50</sub>) of Total (T.SEX), Dialyzed (D.SEX) and Heat-treated (H.SEX) soybean seed exudates (mg mL<sup>-1</sup>) required to achieve 50% inhibition of eggs hatching of *Haemonchus contortus*

Ptn (mg mL <sup>-1</sup> )	SAMPLES		
	T.SEX	D.SEX	H.SEX
1.00	95.64 ± 4.35	96.67 ± 3.89	79.17 ± 6.22
0.50	95.11 ± 9,21	96.81 ± 4.10	79.96 ± 8.66
0.25	88.6 ± 9.69	86.58 ± 11.63	60.6 ± 6.29
0.13	6.69 ± 15.47	14.98 ± 11.4	17.29 ± 10.7
0.06	2.01 ± 6.06	1.14 ± 5.8	1.01 ± 4.26
EC <sub>50</sub> (mg mL <sup>-1</sup> )	0.175	0.175	0.241
95% CI	(0.158-0.194) <sup>a</sup>	(0.161-0.190) <sup>a</sup>	(0.206–0.285) <sup>b</sup>

Values represent the means ± standard deviation (SD) of triplicates. Different letters in the same line represent significant differences among samples ( $p > 0.05$ ). EC<sub>50</sub> – Effective Concentration; 95% CI: 95% Confidence Interval

## DISCUSSION

The present work describes the anthelmintic activity of soybean seed exudates, containing protease inhibitors, against the gastrointestinal nematode *H. contortus*.

Protease inhibitors have been reported in a variety of plant sources (Kim et al., 2009; Rahimi et al, 2012; Rakashanda and Amin, 2013). Different classes of these inhibitors have been studied: serine protease (Christeller and Laing, 2005; Silva-Lopez et al., 2007), cysteine protease (Carlini and Grossi de Sá, 2002; Machon et al., 2009), metalloprotease (Kerkelã et al., 2003; Li et al., 2005) and aspartic inhibitors (Chen et al., 2009; Aoki et al., 2011). The relationship of protease inhibitors with defense potential against parasites have been previously reported (Izuhara et al, 2008).

The protein exuded in T.SEX amounted 243.63 mg P/seed Kg. From T.SEX, it was obtained D.SEX in which low molecular weight proteins and peptides (below 12 kDa) were discarded. D.SEX presented (226.88 mg P/seed Kg). The protein content of T.SEX and D.SEX was not statistically different, suggesting that most of the protein exuded has molecular weight above 12 kDa.

Additionally, part of the proteins from D.SEX were denatured by the heat treatment that was carried out to obtain H.SEX with remained thermostable proteins. This fraction showed 121.67 mg P/seed Kg. The heat treatment of plant extracts often reduces the total amount of soluble proteins (Kim et al., 2009; Palavalli et al., 2012).

To obtain a source of different classes of *H. contortus* proteases, we obtained a total extract of the eggs. It was not possible to detect the proteolytic activity of the total extract (data not shown). So, we precipitated the proteins of the total extract and used the resulting fraction as protease source in the protease inhibition activity assay by the exudates. To the best of our knowledge, this is the first report using a protease fraction from *H. contortus* eggs. All the exudates inhibited protease activity of the *H. contortus* PF (Figure 1), but H.SEX presented the highest inhibition values. Plant protease inhibitors are generally thermostable proteins (Hana Im et al., 2004; Kansal et al., 2008) and were enriched in H.SEX.

Among the 407 proteins detected by mass spectrometry at different stages of *H. contortus*, 47 proteins were present in all stages, including cysteine peptidase, serine peptidases and metalloprotease (Gadahi et al., 2016). Proteases have potential roles in the cuticular protein degradation (Rhoads et al., 1998; Tian et al., 2009), digestion of the old cuticle (Stepek et al., 2006 e 2007) and activation of moulting enzymes (Lustigman et al., 1996). For instance, *C. elegans* encodes a cysteine protease that is similar to the proteases in *Onchocerca volvulus*, *Brugi pahangi*, *Haemonchus contortus*, *Dictyocaulus viviparus*, *Toxocara canis*, *Ancylostoma caninum*, *Ascaris suum*, and plant parasitic nematodes such as *Heteodera glycines* (Britton and Murray, 2002), that is believed to be involved in post-embryonic development through degradation of the eggshell and cuticular proteins (Page et al., 2014). Therefore, as proteases play important roles for de *H. contortus* development, being required for



eggs hatching (Mansfield et al., 1992; Gadahi et al., 2016), the protease inhibitors of the seed exudates could be considered potential anthelmintic natural products.

Although the four different commercial protease inhibitors were able to inhibit proteases of PF, only EDTA and E-64 inhibited the egg hatching, suggesting the anthelmintic potential of the metalloprotease and cysteine protease inhibitors. It was demonstrated that 10 mM EDTA cause a thinning of *H. contortus* eggs shells (Rogers and Brooks, 1977). To avoid this action, EDTA was used in a low concentration (1 mM) in this work, but further studies are required for the assessment of the anthelmintic efficacy of metalloproteases. A mixture of n-alkyl ferulates isolated from plant specie *Maprounea guianensis* are able to inhibit the protease activity of *H. contortus* larvae lysate, suggesting that cysteine proteases are vital enzymes, and its inhibitors may be a novel treatment against helminths (Santos et al., 2012). The role of metalloproteases in the eggs hatch, molting, exsheathment and other physiological process was studied in *H. contortus* and other nematodes (Gamble et al., 1989; Gamble et al., 1990; Mansfield and Gamble, 1995; Davis et al., 2004), serving as potential targets for immune or chemical control of helminthic infections.

All the exudates inhibited the *H. contortus* eggs hatching in a dose dependent way (Table 1). T.SEX and D.SEX displayed the same efficacy, suggesting that small proteins or peptides, if present, may not be correlated to the anthelmintic action. Although, H.SEX showed the highest protease inhibition activity (Figure 1), its anthelmintic activity was lower than T.SEX and D.SEX (Table 1). Probably, other bioactive proteins, were denatured with the heat treatment.

Thus, exudates may be a potential drug for hemonchosis treatment, and their bioactivities can be related to protease inhibitors. However, further studies are required to evaluate the potential therapeutic uses of exudates, in order to contribute with the knowledge regarding the use of proteins as part of gastrointestinal nematodes control programs.

## CONCLUSION

It is concluded that the seed exudates of soybean display protease inhibitor activity and anthelmintic efficiency against *H. contortus*.

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

## Acknowledgments

This research was financially supported through grants from FAPEMA (Maranhao State Research Foundation, Brazil), CAPES (Coordination for the Improvement of High Higher Education Personnel, Brazil) and CNPq (National Council for Scientific and Technological Development). H.S. Ribeiro received a postgraduate scholarship from FAPEMA. The authors would also like to thank the CNPq for a fellowship to L.M. Costa-Júnior.

## References

- Abe, M., Abe, K., Kuroda, M., Arai, S.C.K., 1992. Corn Kernel cysteine proteinase inhibitor as a novel cystatin superfamily member of plant origin. *Eur. J. Biochem.* 209, 933-937.
- Adams, D.J., 2004. Fungal cell wall chitinases and glucanases. *Microbiology.* 150, 2029–2035.
- Amarante, A.F.T.L.M.; Chagas, A.C.S.; Bizzo, H.R.; Ferreira, J.F.S., 2011. Anthelmintic activity of *Cymbopogon martinii*, *Cymbopogon schoenanthus* and *Mentha piperita* essential oils evaluated in four different *in vitro* tests. *Veterinary Parasitology*, 183, 103-108.
- Andrade, F.M.C.; Casali, V.W.D.; Cupertino, M.C., 2010. Seleção de indicadores, monitoramento e sistematização de experiências com homeopatia em unidades agrícolas familiares. *Revista Brasileira de Agroecologia*, 5 (1): 61-73.
- Aoki, W., Kitahara, N., Miura, N., Morisaka, H., Yamamoto, Y., Kuroda, K., Ueda, M., 2011. Comprehensive characterization of secreted aspartic proteases encoded by a virulence gene family in *Candida albicans*. *J Biochem.*, 150 (4): 431-438.
- Araujo, M.M., Rodrigues, M.L.A., 2002. Estudo morfométrico e variação do apêndice vulvar de *Haemonchus contortus* (Nematoda: trichostrongyloidea) de caprinos e ovinos da região semi-árida da Paraíba – Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 11 (2): 61-64.
- Bradford, M.M., 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.

Brito, D.R.B., Santos, A.C.G., Teixeira, W.C., Guerra, R.M.S.N.C., 2009. Parasitos gastrintestinais em caprinos e ovinos da microrregião do Alto Mearim e Grajaú, no estado do Maranhão, Brasil. *Ciência Animal Brasileira*, 10 (3): 967-974.

Britton, C., Murray, L., 2002. A cathepsin-L protease essential for *Caenorhabditis elegans* embryogenesis is functionally conserved in parasitic nematodes. *Mol Biochem Parasitol.*, 122, 21–33.

Carlini, C.R., Grossi-de-Sá, M.F., 2002. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon*, 40 (11):1515-1539.

Chen, J., Ouyang, Y., Wang, L., Xie, W., Zhang, Q., 2009. Aspartic proteases gene family in rice: gene structure and expression, predicted protein features and phylogenetic relation. *Gene*, 442: 108–118.

Christeller, J.T., Laing, W., 2005. Plant serine proteinase inhibitors. *Protein Peptide Letter*, 12: 439-447.

Climeni, B.S.O. ; Monteiro, M.V.; Cicoti, C.A.; Neves, M.F., 2008. Hemoncose ovina. Editora FAEF. São Paulo, ano 11, n. 11, julho.

Coles, G.C., Bauer, C., Botgsteede, F.H.M., Geerts, S., Klei, T.R., Taylor, M.A., Waller, P.J., 1992. World association for the advancement of veterinary parasitology (W.A.A.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 44, (1-2): 35-44.

Davis, M.W., Birnie, A.J., Chan, A.C., Page, A.P., Jorgensen, E.M., 2004. A conserved metalloprotease mediates ecdysis in *Caenorhabditis elegans*. *Development* 131, 6001-6008.

Gadahi, J.A., Wang, S., Bo, G., Ehsan, M., Yan, R., Song, X., Xu, L., Xiang Rui L., 2016. Proteomic Analysis of the Excretory and Secretory Proteins of *Haemonchus contortus* (HcESP) Binding to Goat PBMCs *In Vivo* Revealed Stage-Specific Binding Profiles. *PLoS ONE* 11(7): e0159796.

Gamble, H.R., Lichtenfels, J.R. and Purcell, J.P., 1989. Scanning electron microscopy of the ecdysis of *Haemonchus contortus* infective larvae. *J. Parasitol.*, 75: 303-307.

Gamble, H.R., Purcell, J.P. and Fetterer, R.H., 1990. Biochemical characterization of cuticle polypeptides from the infective larvae of *Haemonchus contortus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 96: 421-429.

Gamble, H.R., Mansfield, L.S., 1996. Characterization of excretory-secretory products from larval stages of *Haemonchus contortus* cultured in vitro. *Veterinary Parasitology* 62: 291-305.

GraphPad Software, Inc. 2007. Prism (data analysis software system), version 5. Disponível em: <<http://www.graphpad.com>>.

Grisi, L., Leite, R.C., Martins, J.R.S., Barros, A.T.M.B., Andreotti, R., Cançado, P.H.D., León, A.A.P., Pereira, J.B.P., Vilella, H.S.V., 2014. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. *Braz. J. Vet. Parasitol. Jaboticabal*, 23 (2): 150-156.

Grosse-Holz F.M., Van der Hoorn, R.A., 2016. Juggling jobs: roles and mechanisms of multifunctional protease inhibitors in plants. *New Phytol.* 210 (3): 794-807.

Hana Im, I., Ryu, M.J., Yu, M.H., 2004. Engineering thermostability in serine protease inhibitors. *Protein Engineering, Design & Selection*, 17 (4): 325–331.

Izuhara, K., Kanaji, S., Arima, K., Ohta, S., Shiraishi, H., 2008. Involvement of cysteine protease inhibitors in the defense mechanism against parasites. *Med Chem*, 4(4): 322-327.

Johnston, K.A., Gatehouse, J.A., Anstee, J.H., 1993. Effects of soybean protease inhibitors on the growth and development of larval *Helicoverpa armigera*. *J. Insect Physiol.*, 39 (8): 657-664.

Kansal, R., Kumar, M., Kuhar, K., Gupta, R.N., Subrahmanyam, B., Koundal, K.R., Gupta, V., 2008. Purification and characterization of trypsin inhibitor from *Cicer arietinum* L. and its efficacy against *Helicoverpa armigera*. *Braz. J. Plant. Physiol.*, 20 (4): 313-322.

Kerkelä, E., Saarialho-Kere, U., 2003. Matrix metalloproteinases in tumor progression: focus on basal and squamous cell skin cancer. *Exp. Dermatol.*, 12: 109-125.

Kim, J.Y., Park, S. C., Hwang, I., Cheong, H., Nah, J. W., Hahm, K. S., Park, Y., 2009. Protease Inhibitors from Plants with Antimicrobial Activity. *Int. J. Mol. Sci.* 10, 2860-2872.

Krishnan, V.G.M., Murugan K., Manoj G.S., 2015. Antihaemolytic, anti-lipid peroxidative potential by purified protease inhibitors from the fruits of *Solanum aculeatissimum* Jacq. In human erythrocytes against hydrogen peroxide. *J. Pharm. and Phytoch.*, 4(3): 203-208.

Kumarasingha, R., Preston, S., Yeo, T.-C., Lim, D.S.L., Tu, C.-L., Palombo, E.A., Shaw, J.M., Gasser, R.B., Boag, P.R., 2016. Anthelmintic activity of selected ethno-medicinal plant extracts on parasitic stages of *Haemonchus contortus*. *Parasites Vectors* 9, 187.

Li, W., Challis, JR., 2005. Corticotropin-releasing hormone and urocortin induce secretion of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) without change in tissue inhibitors of

MMP-1 by cultured cells from human placenta and fetal membranes. *J Clin Endocrinol Metab.*, 90(12):6569-6574.

Licá, I.C.L., Soares, A.M.S.S., Mesquita, L.S.S., Malik., S., 2018. Biological properties and pharmacological potential of plant exudates. *Food Research International*, 105:1039–1053.

Lufrano, D., Faro, R., Castanheira, P., Parisi, G., Veríssimo, P., Vairo-Cavalli, S., Simões, I., Faro, C., 2012. Molecular cloning and characterization of procirsin, an active aspartic protease precursor from *Cirsium vulgare* (Asteraceae). *Phytochemistry* 81: 7–18.

Lustigman, S., McKerrow, J.H., Sha, K., Lui, J., Huima, T., Hough, M., Brotman, B., 1996. Cloning of a cysteine protease required for the molting of *Onchocerca volvulus* third stage larvae. *J Biol Chem*, 271 (47): 30181-30189.

Macedo, K.M., Morais-Costa, F., Vasconcelos, V.O., Costa, M.X., Costa, E.G.L., Duarte, E.R., 2015. Controle *in vitro* e *in vivo* de *Haemonchus contortus* com extrato aquoso das folhas de *Mangífera indica* L.. *Caderno de Ciências Agrárias*, 7 (1).

Mansfield, L.S., Gamble, H.R., Fetterer, R.H., 1992. Characterization of the egg shell of *Haemonchus contortus* - I. Structural components. *Comp Biochem. Physiol B.*; 103 (3): 681-686.

Machon, U., Büchold, C., Stempka, M., Schirmeister, T., Gelhaus, C., Leippe, M., Gut, J., Rosenthal, P.J., Kisker, C., Leyh, M., Schmuck, C., 2009. On-bead screening of a combinatorial fumaric acid derived peptide library yields antiplasmodial cysteine protease inhibitors with unusual peptide sequences. *J Med Chem.* 52 (18): 5662-72.

Nieuwhof, G.J., Bishop, S.C., 2005. Costs of the major endemic diseases of sheep in Great Britain and the potential benefits of reduction in disease impact. *Anim. Sci.* 81, 23–29.

Padul, M.V., Tak, R.D., Kachole, M.S., 2012. Protease inhibitor (PI) mediated defense in leaves and flowers of *Pigeonpea* (protease inhibitor mediated defense in pigeonpea). *Plant Physiol Biochem.*, 52: 77-82.

Page, A.P., Stepek, G., Winter, A.D., Pertab D., 2014. Enzymology of the nematode cuticle: A potential drug target? *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 4, 133–141.

Palavalli, M.H., Natarajan, S.S., Wang, T.T.Y., Krishnan, H.B., 2012. Inhibition of Soybean Seeds in Warm Water Results in the Release of Copious Amounts of Bowman–Birk Protease Inhibitor, a Putative Anticarcinogenic Agent. *J. Agric. Food Chem.*, 60, 3135–3143.

Rahimi, R., Abdollahi, M., 2012. An update on the ability of St. John's wort to affect the metabolism of other drugs. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 8, 691-708.

Rakashanda, S., Amin, S., 2013. Proteases as Targets in Anticancer Therapy Using their Inhibitors. *J Life Sci*, 5(2): 133-138.

Rhoads, M.L., Fetterer, R.H., Urban Jr., J.F., 1998. Effect of protease class-specific inhibitors on in vitro development of the third- to fourth-stage larvae of *Ascaris suum*. *J. Parasitol.* 84, 686–690.

Rocha, R.O., Morais, J.K.S., Oliveira, J.T.A., Oliveira, H.D., Sousa, D.O.B., Souza, C.E.A., Moreno, F.B., Monteiro-Moreira, A.C.O., Júnior, J.D.A.S., Sá, M.F.G., Vasconcelos, I.M., 2015. Proteome of Soybean Seed Exudates Contains Plant Defense-Related Proteins Active against the Root-Knot Nematode *Meloidogyne Incógnita*. *J. Agric. Food Chem.* 63, 5335–5343.

Roditakis, E., Roditake, N.E., Tsagkarakou, A., 2005. Insecticide resistance in *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) populations from Crete. *Prest Maneg. Sci.* 61, 577-582.

Rogers, W.P., Brooks, F., 1977. The mechanism of hatching of eggs of *Haemonchus contortus*. *International Journal of Parasitology*, 7, 61-65.

Rose, T.L., Conceição, A.S., Xavier-Filho, J., Okorov, L.A., Fernandes, K.V.S., Marty, F., Marty-Mazars, D., Carvalho, A.O., Gomes, V.M., 2006. Defense proteins from *Vigna unguiculata* seed exudates: characterization and inhibitory activity against *Fusarium oxysporum*. *Plant Soil*, 286, 181-191.

Santos, S.C.O., Lopez, J.A., Meira, M., Guedes, M.T.B., David, J.M., Zacharias, F. David, J.P., Lima, F.W.M., 2012. *Haemonchus contortus* protease inhibition by n-alkyl ferulates from *Maprounea guianensis*. *Research in Veterinary Science*, 92: 492–493.

Scarafoni, A., Ronchi, A., Prinsi, B., Espen, L., Assante, G., Venturini, G., Duranti, M., 2013. The proteome of exudates from germinating *Lupinus albus* seeds is secreted through a selective dual-step process and contains proteins involved in plant defence. *FEBS J.*, 280, 1443-1459.

Sentelhas, P.C., Battisti, R., Câmara, G.M.S., Farias, J.R.B., Hampf, A.C., Nendel, C., 2015. The soybean yield gap in Brazil – magnitude, causes and possible solutions for sustainable production. *Journal of Agricultural Science*, 153: 1394-1411.

Sharma, N., Sharma, K.P., Gaur, R.K., Gupta, V.K., 2011. Role of chitinase in plant defense. *Asian J Chem*, 6 (1): 29-37.

Silva-Lopez, R.E., Morgado-Díaz, J.A., Chávez, M.A., Giovanni-de-Simone, S., 2007. Effects of serine protease inhibitors on viability and morphology of *Leishmania*

(*Leishmania*) amazonensis promastigotes. Parasitology Research, v.101, p.1627–1635.

Steppek, G., Lowe, A.E., Buttle, D.J., Duce, I.R., Behnke, J.M., 2006. *In vitro* and *in vivo* anthelmintic efficacy of plant cysteine proteinases against the rodent gastrointestinal nematode, *Trichuris muris*. Parasitology 132, 681–689.

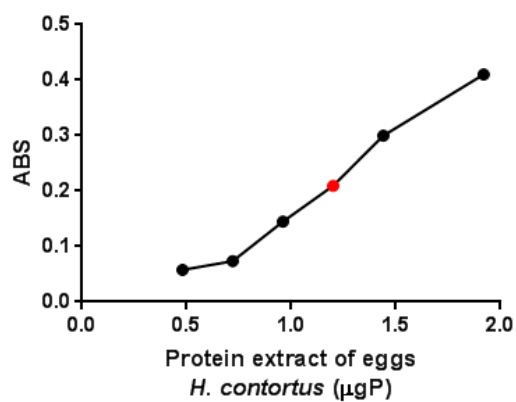
Steppek, G., Lowe, A.E., Buttle, D.J., Duce, I.R., Behnke, J.M., 2007. The anthelmintic efficacy of plant-derived cysteine proteinases against the rodent gastrointestinal nematode, *Heligmosomoides polygyrus*, *in vivo*. Parasitology 134, 1409–1419.

Tian, B., Huang, W., Huang, J., Jiang, X., Qin, L., 2009. Investigation of proteasemediated cuticle-degradation of nematodes by using an improved immunofluorescence-localization method. J. Invertebr. Pathol. 101, 143–146.

Volpicella, A., Leoni, C., Costanza, A., Ceci, L., 2011. Cystatins, serpins and other families of protease inhibitors in plants. Curr. Protein Pept. Sci., 12: 386-398.

Zhao, Y., Shao, S., Li, X., Zhai, Y., Zhang, Q., Qian, D., Wang, Q., 2012. Isolation and Activity Analysis of a Seed-Abundant soyAP1 Gene Promoter from Soybean. Plant Mol Biol Rep., 30: 1400–1407.

## SUPPLEMENTAR MATERIAL



**Figure 1S.** Standard curve for protease-enriched fraction of *H. contortus* as a function of time using N-benzoyl-DL-arginine p-nitroanilide as a substrate at 37 °C for 20 minutes. In red, the amount of protein, expressed as microgram of protein (µg P), selected for the protease inhibitor assay.