

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DE SAÚDE
CURSO DE BIOMEDICINA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO EM BIOMEDICINA

**DETECÇÃO DA PRODUÇÃO DE MOLÉCULAS COM ATIVIDADE
ANTIBACTERIANA POR LARVAS DE *CHRYSOMYA MEGACEPHALA*
(DIPTERA: CALLIPHORIDAE)**

Káren Regina Silva de Souza

PORTO ALEGRE

2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DE SAÚDE
CURSO DE BIOMEDICINA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO EM BIOMEDICINA

**Detecção da produção de moléculas com atividade antibacteriana por larvas de
Chrysomya megacephala (Diptera: Calliphoridae)**

Káren Regina Silva de Souza

Local: Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia
Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Orientador: João Henrique Corrêa Kanan

Porto Alegre 2010

AGRADECIMENTOS

Agradeço profundamente a meu orientador, João Henrique Corrêa Kanan, que me recebeu, me guiou e dedicou a mim paciência infindável.

Ao meu co-orientador de estágio, Professor Carlos Eugênio Silva, que destinou a mim muito de seu tempo e sabedoria.

À minha família, principalmente aos meus pais, Nilton e Regina, e minha irmã Carla, por me apoiarem em todas as minhas decisões desde o princípio.

Ao André, por todo amor, carinho, companheirismo, paciência e confiança.

A Mariane Jaeger e Andressa Mondadori, por me acolherem e estarem sempre ao meu lado.

Ao Cícero Garcia, por todos os cafés, pelas bobagens e pela companhia.

A todos os colegas do curso de Biomedicina por todos os momentos agradáveis, principalmente aos amigos Cícero, Daniel, Carla, Mariane, Andressa, Susana, Gabriel, Conrado e Marina.

A todos os colegas e amigos do Laboratório de Parasitologia da UFRGS.

E por fim, a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE GERAL

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Biologia de <i>Chrysomya megacephala</i>	1
1.2 Importância do Controle e Relevância na Área da Saúde Pública	1
1.3 Mecanismos de Defesa Imune	3
1.3.1 Resposta Imune Celular	3
1.3.2 Resposta Imune Humoral	4
1.3.2.1 Espécies Reativas de Oxigênio	5
1.3.2.2 Sistema da Pró-Fenoloxidase	5
1.3.2.3 Peptídeos Antimicrobianos (PAMs)	5
2. OBJETIVOS	7
3. ARTIGO CIENTÍFICO	8
5. CONCLUSÕES	27
6. BIBLIOGRAFIA COMPLEMENTAR	29
7. ANEXOS	33

RESUMO

Chrysomya megacephala (Diptera: Calliphoridae), ou mosca oriental das latrinas, é um organismo de grande relevância em saúde pública por estar associado à veiculação de agentes patogênicos e miíase secundária. Pouco tem sido estudado em relação à sua fisiologia e mecanismos de imunidade; todavia, a exemplo de outros insetos, deve possuir uma resposta imune celular e humoral de baixa especificidade, porém capaz de responder às infecções por microrganismos de forma rápida e eficiente. Entre os prováveis mecanismos de defesa humoral de *C. megacephala* se encontra a produção de peptídeos com ação antimicrobiana. Com o crescente aparecimento de variantes de espécies bacterianas multi-resistentes aos antibióticos atualmente disponíveis, o uso de insetos como modelo para a procura por novos princípios ativos antimicrobianos tem se tornado mais frequente. O objetivo desse trabalho foi investigar a produção de moléculas com atividade antibacteriana em hemolinfa de larvas de 3º estágio de *C. megacephala* por meio de teste de inibição bacteriana. Os testes realizados demonstraram a presença de agente antimicrobiano, tanto para bactérias Gram-negativas como positivas, em hemolinfa das larvas de *C. megacephala*. Embora, na maioria dos casos testados, a produção do agente antibacteriano era dependente da inoculação de *Enterobacter faecalis*, observou-se que em alguns casos amostras controle também apresentavam atividade inibitória. Adicionalmente, em testes onde se variou a titulação do inóculo observamos que em todas as condições testadas houve indução da produção de agente antibacteriano sem, contudo, se observar uma associação dose-dependente entre a concentração do inóculo e o tamanho do halo de inibição. Os resultados obtidos demonstram que a espécie *Chrysomya megacephala* produz substância(s) com atividade inibitória de crescimento bacteriano. Entretanto, ainda é necessário determinar mais claramente o(s) fator(es) que controlam a expressão desta(s) molécula(s) antimicrobiana(s) bem como caracterizá-las molecularmente.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Biologia de *Chrysomya megacephala*

A mosca *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794), também conhecida como mosca oriental das latrinas, é originária do continente asiático, sendo observada na América do Sul desde 1975 (Guimarães et al., 1978) e, posteriormente, também na América do Norte (Greenberg, 1988). Para sua reprodução, esse inseto realiza a oviposição em massas de ovos colocadas sobre diferentes tipos de matéria orgânica em decomposição, como, por exemplo, cadáveres e fezes. Quando a temperatura encontra-se entre 24 e 28 °C, a embriogênese se completa normalmente em torno de oito horas, dando origem a larvas que se desenvolvem formando galerias no substrato onde se encontram. É um organismo holometábolo, sendo que no decorrer de três a cinco dias as larvas passam por três instares (L1, L2 e L3), deixando o substrato para empuparem. O período de pupa pode durar de 4 a 10 dias, dependendo das condições de temperatura ambiente, sendo que após essa fase emergem os insetos adultos, que vivem de três a quatro semanas. Durante este período alimentam-se de água, néctar e secreções vegetais açucaradas. Buscam, também, fontes de proteína em secreções de origem animal, fezes e lixo para completar a maturação dos ovos (Wijesundara, 1957).

Durante o período larval que precede a empupação, as larvas se alimentam de animais recentemente mortos ou carniça, substratos com grande concentração de microorganismos. Assim, quando a larva se prepara para empupar está sujeita a parasitismos e estresse físico (Faraldo et al., 2007), como consequência, esse inseto deve possuir um sistema imune eficaz.

1.2 Importância do Controle e Relevância na Área da Saúde Pública

Entre os dípteros califorídeos, *C. megacephala* tem grande importância médica e veterinária por servir como vetor de veiculação de agentes patogênicos e,

também, por ser causador de mífase secundária em seres humanos e outros animais (Greenberg, 1973; Furlanetto et al., 1994; Wells, 1991).

Os califorídeos, ou moscas varejeiras, são reconhecidamente potenciais vetores mecânicos e biológicos de doenças, particularmente aqueles que se desenvolvem mais próximos do homem ou do ambiente por ele criado. Há relatos identificando califorídeos como veiculadores de poliovírus tipos I, II e III (Hall, 1948; Williams, 1954; Greenberg, 1971 e 1973). Por sua vez, Greenberg (1971 e 1973), descreveu *C. megacephala* e *C. putoria* como veiculadores do vírus Coksakie, das enterobactérias *Salmonella* sp. e *Shigella* sp., de cistos de *Entamoeba histolytica* e de ovos de vários cestódeos. Kuhlhorn (1983) relacionou *C. megacephala* como veiculador de *Toxoplasma gondii*.

Nesse sentido, seria de grande importância um estudo mais aprofundado sobre califorídeos em virtude de sua sinantropia elevada e do aumento progressivo da temperatura média do planeta, favorecendo a dispersão das moscas em regiões mais frias.

No momento, o controle de *C. megacephala* no meio urbano segue o padrão aplicado à maioria das moscas, ou seja, através de tratamentos pelo uso de inseticidas em aterros sanitários.

Por outro lado, o uso dessa família de insetos com o propósito de desinfecção e cicatrização de feridas infectadas é realizado há vários séculos, tendo caído em desuso com a introdução dos antibióticos na década de 1940. Contudo, com o crescente aparecimento de variantes de espécies bacterianas multi-resistentes aos antibióticos disponíveis, o uso da terapia larval foi retomado (Mumcuoglu, 2001). Os mecanismos de ação da terapia larval podem ser amplamente categorizados em três áreas principais: remoção do tecido necrótico (Chambers et al., 2003), desinfecção e morte bacteriana (Erdmann & Khalil, 1986), e estimulação da cicatrização da ferida (Prete, 1997; Chambers et al., 2003). Essas ações irão resultar em um tecido limpo e saudável no local previamente ferido (Kerridge et al., 2005).

Há que se ressaltar que a medicina ocidental, assim como a tradicional medicina chinesa, utilizam uma larga gama de insetos para produção de medicamentos e tratamento de doenças, mas ainda há pouca literatura disponível (Jiang, 1999). Pemberton (1999) já sugeria que insetos e outros artrópodes “são uma enorme fonte, ainda inexplorada e inexplicada, de componentes potencialmente úteis para a medicina moderna”.

1.3 Mecanismos de Defesa Imune

A imunidade dos insetos está baseada em mecanismos celulares de defesa, tais como a fagocitose, nodulação e encapsulamento, e mecanismos humorais, que incluem a coagulação da hemolinfa, a ativação da fenoloxidase, o que leva à melanização, e à produção sistêmica de peptídeos antimicrobianos (Jiravanichpaisal et al., 2006; Lemaître & Hoffmann, 2007). Os mecanismos de defesa celular e humoral ocorrem em conjunto (Dunn, 1986).

1.3.1 Resposta Imune Celular

O estudo do sistema imune nestes insetos é uma área promissora para o desenvolvimento de estratégias que se direcionem ao seu controle. Entretanto, somente nos últimos vinte anos é que as pesquisas sobre os mecanismos de defesa em invertebrados se tornaram mais intensos. Os hemócitos, componentes celulares da imunidade dos insetos, são capazes de fagocitar, promover a formação de nódulos (nodulação) e encapsulamento de patógenos, além de participar da eliminação de toxinas e tecidos anormais ou mortos. Os hemócitos circulam livremente na hemolinfa; mas, após a invasão de bactérias, fungos, vírus ou protozoários, rapidamente migram para o local da infecção e, eventualmente, fagocitam e destroem os invasores (Silva et al., 2000; Russo et al., 2001). Atualmente, *Drosophila melanogaster* é o inseto mais profundamente estudado com relação a este tema (Lemaître & Hoffmann, 2007).

A fagocitose pode ser considerada como a primeira barreira da defesa contra corpos estranhos presentes dentro do organismo do inseto, e já foi descrita na hemolinfa de diversas espécies de insetos contra agentes biológicos (Ratcliffe & Rowley, 1979; Ratcliffe et al., 1985; Götz & Boman, 1985; Ratcliffe, 1986; Da Silva et al., 2000) e não biológicos (Wiesner, 1991, 1992; Slovák et al., 1991; Faraldo & Lello, 2003). Se um grande número de patógenos invade a hemocele, eles são isolados pela agregação hemocitária, formando nódulos melanizados ou não (Lackie, 1980), a fim de remover os organismos invasores da circulação.

A encapsulação por hemócitos ocorre quando os corpos estranhos são grandes demais para serem fagocitados (Faraldo et al., 2007). Por exemplo, contra larvas e ovos de endoparasitóides que são depositados na hemocele e não podem ser fagocitados e nem isolados em nódulos, os insetos se defendem formando cápsulas (Strand & Pech, 1995).

Nos insetos, as moléculas de reconhecimento de corpos estranhos ainda não estão bem estabelecidas. Existem alguns receptores associados à membrana das células do sistema imune e outros solúveis na hemolinfa, os quais são capazes de reconhecer e aglutinar diretamente os patógenos, enquanto outros podem induzir a ativação de cascatas proteolíticas. As lectinas, classe de glicoproteínas, têm sido detectadas na hemolinfa de insetos agindo como opsoninas (proteínas que se fixam à superfície de patógenos facilitando a sua fagocitose), aglutinando microorganismos e como receptores nas membranas dos hemócitos (Da Silva, 2002).

1.3.2 Resposta Imune Humoral

A resposta de defesa humoral dos insetos, em geral, inclui diferentes mecanismos, podendo-se citar a produção de espécies reativas do oxigênio; a ativação de complexas cascatas enzimáticas, como a via da pró-fenoloxidase (proPO), bem como cascatas de coagulação e melanização; e a ativação de vias de sinalização intracelulares que irão produzir proteínas solúveis na hemolinfa (como os peptídeos antimicrobianos).

1.3.2.1 Espécies Reativas de Oxigênio

Espécies reativas do oxigênio são produzidas a partir da redução do oxigênio molecular ao ânion superóxido pela enzima NADPH oxidase. Vários trabalhos já demonstraram que a geração destas espécies reativas de oxigênio por células fagocitárias de mamíferos constitui-se em importante mecanismo de defesa contra bactérias, protozoários e helmintos (Bogdan et al., 2000). Por outro lado, esta noção não é tão clara para insetos, embora alguns trabalhos sugiram que este seja um mecanismo de defesa utilizado em infecções (Hoffmann, 1995; Gillespie et al., 1997).

1.3.2.2 Sistema da Pró-Fenoloxidase

A pró-fenoloxidase está presente na hemolinfa dos insetos na forma de zimogênio, sendo ativada à fenoloxidase em resposta a uma agressão ao organismo, como por exemplo, infecções por fungos ou bactérias, reconhecimento de peptídeos, lipopolissacarídeos ou outras substâncias provenientes de contato com organismo agressor. Esta enzima catalisa a oxidação de compostos fenólicos contidos na hemolinfa e na cutícula dos insetos. Como resultado da oxidação, ocorre produção de quinonas, as quais se polimerizam para formar melanina (Cerenius & Söderhäll, 2004).

A melanina formada se deposita em nódulos, compostos de agregados de hemócitos e microorganismos, que se formam na hemocele de insetos altamente infectados (Koizumi et al., 1999; Ratcliffe & Gagen, 1977; Ratcliffe et al., 1991; Stanley et al., 1998). A formação dos nódulos de melanina culmina na cicatrização de feridas e na defesa imunológica, por encapsular microorganismos invasores.

1.3.2.3 Peptídeos Antimicrobianos (PAMs)

Uma das principais formas de proteção utilizadas por insetos é a produção de peptídeos antimicrobianos, os quais são produzidos pelo corpo gorduroso, ou por

hemócitos, em resposta à infecção microbiana, ou outro tipo de injúria, sendo então secretados rapidamente na hemolinfa. Dessa forma, são capazes de chegar a qualquer parte do corpo do inseto. Normalmente, decorrem algumas horas ou dias para a completa expressão das proteínas solúveis de defesa, e é sabido que muitas dessas proteínas têm ação inibitória sobre fungos e bactérias (Da Silva, 2002).

Estes peptídeos são fatores chave na defesa imune contra bactérias e fungos tanto em vertebrados como em invertebrados (Jenssen et al., 2006). Nos insetos, que carecem de um sistema imune adaptativo, os peptídeos antimicrobianos desempenham um papel fundamental na luta contra organismos invasores. Na presença dos PAMs, algumas espécies de bactérias perdem a integridade da parede celular. Tais peptídeos são moléculas cilíndricas, anfipáticas, com um pólo hidrofóbico em uma das terminações. Eles atuam rompendo bicamadas lipídicas da membrana celular de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Da Silva, 2002).

As proteínas cecropinas, e as tipo cecropinas (peptídeos que não fazem parte da família das cecropinas, mas atuam como tal), são peptídeos de aproximadamente 4 kDa e constituem uma família de PAMs que possuem grande ação bactericida. Tais proteínas foram, pela primeira vez, descritas em estudo com a hemolinfa da pupa *Hyalophora cecropia* (Brey et al., 1993). Esses peptídeos estão presentes em *Lepidopteras* (ordem de insetos que inclui mariposas e borboletas) e *Dipteras* (ordem de insetos que contém moscas com um par de asas) (Hoffmann, 1995). Outra grande família de peptídeos antimicrobianos é composta pelas defensinas (sapecinas), também com aproximadamente 4 kDa. As defensinas são amplamente distribuídas entre os insetos, e atuam apenas contra bactérias Gram-positivas (Boman et al., 1991), diferentemente das cecropinas, que atuam contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de investigar a presença de moléculas com atividade antimicrobiana em hemolinfa de larvas de terceiro estágio de *Chrysomya megacephala*.

3. ARTIGO CIENTÍFICO

Detecção da produção de moléculas com atividade antibacteriana por larvas de *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae)

Káren Regina Silva de Souza, Carlos Eugênio Silva, João Henrique Corrêa Kanan*

Setor de Parasitologia; Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia; Instituto de Ciências Básicas de Saúde; Universidade Federal do Rio Grande do Sul; Rua Sarmiento Leite 500 - sala 206, Porto Alegre, RS, 90050-170, Brasil.

*Autor correspondente

João Henrique Corrêa Kanan

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, ICBS

Rua Sarmiento Leite, 500 - sala 206, 90050-170, Porto Alegre, RS Brasil

Fone: 55 51 33084545

Fax: 55 51 33083445

kananjhc@ufrgs.br

Detecção da produção de moléculas com atividade antibacteriana por larvas de *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae)

Resumo

Chrysomya megacephala (Fabricius, 1794) (Diptera: Calliphoridae) é um organismo de grande relevância em saúde pública por estar associado à veiculação de agentes patogênicos e produzir miíase secundária. Pouco tem sido estudado em relação à sua fisiologia e mecanismos de imunidade. Entretanto, a exemplo de outros insetos, deve possuir uma resposta imune celular e humoral de baixa especificidade, porém capaz de responder às infecções por microrganismos de forma rápida e eficiente. Entre os prováveis mecanismos de defesa humoral de *C. megacephala* se encontra a produção de peptídeos com ação antimicrobiana. Neste estudo foi investigada a produção de moléculas com atividade antimicrobiana em hemolinfa de larvas de terceiro estágio de *C. megacephala* frente a desafio antigênico com *Enterobacter faecalis*. Testes de inibição de crescimento bacteriano indicaram que as larvas respondem à infecção produzindo substância(s) antimicrobiana(s) do tipo cecropina; contudo, em alguns casos amostras controle também apresentaram atividade inibitória. O(s) fator(es) antimicrobiano(s) produzido(s) tem efeito tanto em bactérias Gram-positivas como Gram-negativas.

Palavras-chave. *Chrysomya megacephala*, califorídeo, hemolinfa, peptídeos antimicrobianos, tipo cecropina

Introdução

Entre os dípteros califorídeos, *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) é um importante veiculador de agentes patogênicos e agente de miíase secundária (Greenberg, 1973). Embora o estudo do sistema imune nestes insetos seja uma área promissora para o desenvolvimento de estratégias que se direcionem ao seu controle, pouco tem sido estudado em relação à sua fisiologia e mecanismos de imunidade. Somente nos últimos vinte anos é que pesquisas sobre os mecanismos de defesa

em invertebrados têm se tornado mais intensas. Contudo, pouco se sabe especificamente a respeito do sistema imune de *C. megacephala*. Atualmente, *Drosophila melanogaster* é o inseto mais profundamente estudado com relação a este tema (Lemaitre & Hoffmann, 2007).

A imunidade dos insetos está baseada em mecanismos celulares de defesa (fagocitose, nodulação e encapsulamento), e mecanismos humorais, que incluem a coagulação da hemolinfa, a ativação da fenoloxidase, o que leva à melanização, e a produção sistêmica de peptídeos antimicrobianos (Jiravanichpaisal et al., 2006; Lemaitre & Hoffmann, 2007). Os mecanismos de defesa celular e humoral ocorrem conjuntamente (Dunn, 1986).

Uma das principais formas de proteção utilizadas por insetos é a produção de peptídeos antimicrobianos, os quais são produzidos pelo corpo gorduroso ou por hemócitos, sendo então secretados rapidamente na hemolinfa. Dessa forma, são capazes de chegar a qualquer parte do corpo do inseto. Normalmente, decorrem algumas horas ou dias para a completa expressão das proteínas solúveis de defesa, e é sabido que muitas dessas proteínas têm ação inibitória sobre vírus, bactérias, protozoários e fungos (Da Silva, 2002; Jenssen et al., 2006).

Nos insetos, que carecem de um sistema imune adaptativo, os peptídeos antimicrobianos desempenham um papel fundamental na luta contra organismos invasores (Cytrynska et al, 2007). Tais peptídeos são moléculas cilíndricas, anfipáticas, com um pólo hidrofóbico em uma das terminações. A maioria dos peptídeos já identificados se mostrou induzível, catiônico e de baixo peso molecular (Bulet et al, 1999). Eles atuam rompendo bicamadas lipídicas da membrana celular de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Da Silva, 2002; Jenssen et al., 2006).

O objetivo deste trabalho foi investigar a produção de moléculas com atividade antimicrobiana em hemolinfa de larvas de terceiro estágio de *Chrysomya megacephala*.

Materiais e Métodos

Manutenção das Colônias

As colônias de *C. megacephala* eram oriundas de espécimes capturados em Porto Alegre e posteriormente gerados e mantidos em laboratório. Os insetos adultos foram mantidos em gaiolas de 25x25x30 cm de dimensão, em ambiente com fotofase de 12 horas, temperatura ambiente variando de 20-28 °C, umidade relativa de aproximadamente 55%, recebendo água e solução açucarada *ad libitum*. Para obtenção de novos adultos, com o intuito de manter a colônia, eram feitas periodicamente induções de ovipostura nas gaiolas. No processo de indução era utilizado como substrato carne moída decomposta, sob a qual as fêmeas depositavam seus ovos. A ovipostura era então retirada da gaiola e recolocada em dieta à base de músculo bovino moído (carne moída), no qual as larvas se desenvolviam passando pelos devidos instares até alcançar o terceiro estágio larval (L3). O desenvolvimento larval era realizado a 28 °C, se estendendo em torno de 120 horas, quando as larvas deixavam o substrato de desenvolvimento e eram recolhidas em uma bandeja contendo areia própria para a empupação.

Coleta e Conservação da Hemolinfa

Antes de proceder à coleta, era feita a anti-sepsia das larvas, já em estágio L3 maduras, da seguinte maneira: primeiramente as larvas eram retiradas do substrato de desenvolvimento com auxílio de pinça e colocadas em um reservatório; logo após eram passadas para uma peneira e enxaguadas com água corrente; em seguida, eram mergulhadas em solução contendo 500 mL de água para 20 mL de hipoclorito (água sanitária) por 1 minuto, sendo então recolocadas na peneira para novo enxágüe.

Para a coleta de hemolinfa as larvas eram imobilizadas em placa de Petri gelada por cerca de vinte minutos, e em seguida mergulhadas em solução de etanol 70%. Após secagem, em lenço de papel, cada larva era decapitada com tesoura oftálmica, a hemolinfa era coletada com micropipeta (cerca de 10 µL por larva) e

diluída em água deionizada estéril na proporção de 1:1 (v/v). Todo material coletado era submetido a uma sequência de duas centrifugações, sendo a primeira por 20 minutos a 500 x g, após a qual o sobrenadante era transferido para outro tubo e submetido à segunda centrifugação por 5 minutos a 9.000 x g. Após a segunda centrifugação o sobrenadante era transferido para um novo tubo e as amostras utilizadas imediatamente ou mantidas a -20 °C para uso posterior.

Bactérias

As seguintes espécies de bactérias, oriundas do acervo do Setor de Microbiologia do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, e gentilmente cedidas pela Dra. Gertrudes Corção, foram utilizadas: *Escherichia coli*, *Burkholderia cepacia*, *Enterobacter faecalis*, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecium*, sendo as três primeiras Gram-negativas e as duas últimas Gram-positivas. A partir de estoques em meio de cultivo-glicerol na proporção de 1:1 (v/v) e mantidos à -20 °C as bactérias eram crescidas em meio líquido contendo extrato de carne 0,5% (m/v).

Teste de Atividade Antimicrobiana

Para verificar a possível atividade antimicrobiana de moléculas produzidas por *C. megacephala* foi realizado teste de zona de inibição de crescimento em placas de meio de cultivo extrato de carne acrescido de Agar a 1% (m/v) conforme técnica descrita por Hultmark (1998), com modificações.

Por esta técnica, uma colônia isolada de meio de cultivo sólido era transferida para meio de cultivo líquido e incubada na temperatura apropriada por 18 horas, sem agitação. Logo após, 6 µL deste crescimento era adicionado à 6 mL do meio de cultivo Agar 1%, ainda em estado líquido (aproximadamente 40 °C), o qual era despejado em uma placa de Petri de 85 mm de diâmetro. Após o meio solidificar, eram feitos poços de aproximadamente 4 mm de diâmetro aos quais se adicionava 6 µL de cada amostra de hemolinfa a ser testada. As placas eram, então, incubadas na

temperatura adequada de crescimento bacteriano por 18 a 24 horas e o diâmetro dos halos de inibição de crescimento medidos. Foram utilizados como controles uma solução de estreptomicina-penicilina (0,01 mg ml⁻¹ e 10 U ml⁻¹, respectivamente) e água deionizada estéril.

O material utilizado para teste foi hemolinfa retirada de larvas em estágio L3 tratadas como controle (sem sofrer punção), larvas puncionadas e larvas puncionadas e inoculadas (utilizando pipeta Hamilton LT de 25 µL de capacidade total) com 2 µL de meio de cultivo extrato de carne líquido contendo *Enterobacter faecalis* em diferentes concentrações. As amostras de hemolinfa foram coletadas conforme descrito em *Coleta e Conservação da Hemolinfa* em intervalos de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 24h após a inoculação e, antes de serem utilizadas, eram diluídas em água destilada estéril nas seguintes proporções: 1:2, 1:4, 1:8 e 1:16 (v/v).

Resultados

*Indução da expressão de moléculas com atividade antibacteriana em *Chrysomya megacephala**

Experimentos preliminares de inibição de crescimento bacteriano, realizados em nosso laboratório, indicaram que a hemolinfa de larvas de 3º estágio de *Chrysomya megacephala* não contém agentes antimicrobianos do tipo cecropina, em níveis detectáveis, em condições normais de crescimento larval. Estes testes foram feitos tanto com bactérias Gram-negativas (*Escheriachia coli*) como Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*). Decidimos investigar, então, se após serem submetidas a desafio antigênico com espécie bacteriana, as larvas L3 produziriam peptídeos de ação antimicrobiana. Optamos pela espécie *Enterobacter faecalis*, pois esta é usada como procedimento padrão em protocolos de testes de inibição bacteriana em nosso laboratório.

Inicialmente, foram feitos testes de atividade antibiótica com o intuito de identificar o comportamento da produção de moléculas com esta capacidade ao longo

de um período de tempo. Foi feita a inoculação de aproximadamente $7,5 \times 10^4$ unidades formadoras de colônia (ufc) por larva, em 10 larvas por cada grupo de inoculados, sendo que utilizamos mais 5 larvas para o grupo de controles não puncionados, e 5 larvas para o grupo de controles puncionados. Procedemos coletando a hemolinfa em diferentes tempos após o desafio antigênico (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, e 24h) e os resultados obtidos a partir de três dias independentes de experimentação podem ser observados na tabela 1. Pode-se observar, pelos dados apresentados na tabela 1, que as larvas de *C. megacephala* são capazes de produzir substância(s) antimicrobiana(s) inibitória(s) do crescimento de *E. faecalis*, e que esta produção é mais frequentemente induzida pela infecção bacteriana. Por outro lado, não há uma associação constante entre desafio antigênico e produção de fator inibidor de crescimento bacteriano, por exemplo, eventualmente controles não inoculados apresentaram atividade antibacteriana, enquanto grupos infectados não apresentaram níveis detectáveis de antimicrobianos. Houve ausência de reprodutibilidade de resultados, de uma forma geral, quando comparados os três diferentes dias de experimentação; entretanto, todas as amostras de inoculados nos tempos 5 e 6 horas apresentaram atividade inibitória contra *E. faecalis*.

Os diâmetros dos halos de inibição foram medidos nas amostras positivas e são apresentados na tabela 2. Não foi observada nenhuma relação entre o intervalo de tempo decorrido entre inoculação e coleta da hemolinfa e o tamanho do diâmetro do halo de inibição. Quanto ao efeito da diluição na atividade inibitória de amostras positivas, observa-se uma tendência de diminuição do tamanho do halo medido quanto maior a diluição; contudo, devido à falta de reprodutibilidade dos resultados não foi possível determinar se há uma associação dose-efeito. Nas figuras 1, 2 e 3 é possível observar imagens características de uma amostra positiva, de um controle positivo (antibiótico) e de um controle negativo (água destilada), respectivamente. É interessante ressaltar que em algumas das amostras positivas foram detectados, delimitando o halo de inibição, agregados enegrecidos (Fig. 4).

Efeito da concentração do inóculo bacteriano na produção das moléculas antimicrobianas

Com o objetivo de investigar se a concentração bacteriana do inóculo também era um fator importante na produção de diferentes espectros de atividade antimicrobiana, foram realizados os seguintes experimentos descritos a seguir.

Foi mantido crescimento de *E. faecalis* conforme descrito anteriormente. O caldo bacteriano crescido por 18 horas era centrifugado 10 minutos a 600 x g, sendo o sedimento ($\sim 3,75 \times 10^7$ ufc) ressuspensão no volume de 1:10 do volume original com salina estéril (NaCl 0,9%, m/v). Durante o procedimento, foi inoculado 2 μ L por larva deste material (puro) e de diluições nas proporções 1:2, 1:4 e 1:8. Foram utilizadas 5 larvas para cada grupo controle (puncionado e não puncionado) e 10 larvas por cada um dos quatro grupos de inoculados. Após passadas 6 horas da inoculação, foi feita a coleta da hemolinfa.

Os resultados dos experimentos realizados em três ocasiões diferentes se encontram nas tabelas 3 e 4. Pelos dados obtidos podemos observar que as larvas de *C. megacephala* são induzidas a produzir substância(s) com atividade antibacteriana em qualquer uma das concentrações bacterianas utilizadas (Tab. 3). No entanto, não constatamos diferenças significativas na atividade encontrada conforme a variação do grau de diluição (Tab. 4). Percebemos que, assim como no experimento de coleta de hemolinfa em diferentes tempos, alguns grupos controles apresentaram atividade antibiótica.

Atividade antimicrobiana da hemolinfa em diferentes espécies bacterianas

Para avaliarmos se a hemolinfa de larvas desafiadas com *Enterobacter faecalis* também apresenta atividade antibacteriana quando testada contra outras espécies bacterianas, que não a própria *E. faecalis*, realizamos o teste de inibição de crescimento bacteriano contra as seguintes bactérias: *Escherichia coli*, *Burkholderia cepacia*, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecium*, sendo as duas primeiras

Gram-negativas e as duas últimas Gram-positivas. Testamos o efeito antibacteriano das amostras também em *Enterobacter faecalis*, como um controle positivo do experimento.

Nesse experimento foram inoculadas larvas L3 com *E. faecalis*. O caldo bacteriano, obtido após 18 horas de crescimento, foi centrifugado e ressuspensão conforme descrito no experimento anterior, e posteriormente diluído na proporção 1:2. A quantidade de larvas utilizada nos grupos controle foi a mesma dos experimentos anteriormente descritos, 5 larvas para cada um dos grupos controle, porém utilizamos 30 larvas no grupo das inoculadas com o objetivo de obter maior quantidade de material. A hemolinfa foi coletada 6 horas após a inoculação das bactérias.

O resultado do experimento supracitado se encontra na tabela 5. Pelos dados apresentados, podemos inferir que o desafio antigênico causado por *E. faecalis* também induz a produção de agentes com ação antimicrobiana contra outras bactérias, que não apenas *E. faecalis*. As bactérias testadas se mostraram sensíveis à ação antibacteriana presente na hemolinfa, com exceção da espécie *Burkholderia cepacia*.

Discussão

Peptídeos antimicrobianos comprovadamente compõem um sistema eficiente de proteção contra processos infecciosos e que é utilizado tanto por animais como por plantas (Jenssen et al., 2006). A análise dos resultados apresentados nas tabelas 1 e 2 demonstra que larvas de 3º estágio de *Chrysomya megacephala* de fato produzem fatores com atividade antibacteriana presentes na hemolinfa. Contudo, não foi possível demonstrar de forma inequívoca que a produção de tais fatores era invariavelmente induzida pela inoculação com espécie bacteriana, pois não foi possível detectar atividade antimicrobiana em algumas amostras do grupo tratado. Além disso, observamos que amostras de alguns grupos controle continham componente com atividade antibacteriana. Esse fato traduz a dificuldade que

encontramos em estabelecer condições experimentais que garantissem a reprodutibilidade dos resultados obtidos. Essa dificuldade pode ser explicada por diversos motivos, uma vez que o experimento é dependente de uma multiplicidade de variáveis que podem alterar seus resultados. Para exemplificar tais fatores podemos citar a manipulação dos insetos na preparação para o experimento, a variação do estágio de desenvolvimento da larva L3 entre alimentar e pós-alimentar (pré-empupação), estresse das larvas devido ao manuseio com pinças, a punção, o choque térmico durante o tempo de imobilização que precede a coleta, entre outros.

Tais fatores poderiam levar a larva a produzir material de defesa, que se traduziria no halo de inibição. Em alguns casos, a própria punção pode ter levado à produção de material com atividade tipo cecropina, provavelmente devido à lesão e o conseqüente processo inflamatório, mas também pode ser decorrente do material utilizado durante o procedimento, uma vez que é muito difícil manter a agulha utilizada para punção completamente livre de contaminação.

Em adição aos fatores já expostos, outra situação que pode influenciar nos resultados é a fase de desenvolvimento em que se encontram as larvas utilizadas. Esse problema poderia ser solucionado ao selecionarmos larvas exatamente no mesmo estágio, no entanto, devido a variações do desenvolvimento larval é impraticável selecionar apenas larvas em estágio pós-alimentar, e essas podem apresentar diferenças fisiológicas significativas em comparação às larvas em estágio pré pós-alimentar, o que poderia levar à divergência dos resultados encontrados.

Outro fato observado a partir desses resultados é de que ao longo do período analisado após a inoculação (0 a 24 horas) não houve variação nos níveis do(s) fator(es) antimicrobiano(s) produzido(s), a se julgar pelo tamanho do halo de inibição verificado. É importante salientar que em todos os dias analisados as amostras coletadas nos tempos 5 e 6 horas, após inoculação, apresentaram atividade antibacteriana. Esse resultado sugere que, embora haja uma variabilidade no tempo de expressão de níveis detectáveis desses fatores antimicrobianos, os mesmos devem se estabilizar em torno de 5 a 6 horas após o estímulo antigênico, se mantendo por

pelo menos um período de 24 horas. Da Silva (2002) já havia descrito que decorre um período de horas, ou até dias, para a completa expressão das proteínas solúveis de defesa. Em *Drosophila melanogaster* danos causados por bactérias ou fungos ativam a transcrição de genes que codificam para peptídeos antibacterianos em cerca de 30 minutos à uma hora, sendo que a intensidade dessa transcrição atinge um pico de 12 a 48 horas após a indução (Hoffmann, 1995).

Com referência ao efeito da diluição das amostras na manutenção da atividade antimicrobiana foi observado que todas as amostras positivas mantiveram ação inibitória até a diluição de 1:4, embora algumas amostras tenham mantido atividade inibitória até o maior fator de diluição (1:16). Contudo, essa manutenção do efeito antibiótico é acompanhada de um decréscimo da atividade, pois se observa, na maioria dos casos, uma diminuição do halo de inibição.

Além disso, algumas placas apresentaram um material enegrecido circundando o halo de inibição. Esse pontilhado escuro pode se tratar de agregados, formados em decorrência da ativação da pró-fenoloxidase. A hemolinfa, assim que coletada, se mostrava clara e limpa, porém, após um período curto de tempo, à temperatura ambiente, se tornava escura, fato esperado (ver a revisão de Kanost e Gorman, 2008) e que corrobora a suposição feita acima. Cabe ressaltar que esta mudança de cor ocorria mais lentamente nas amostras provenientes das larvas inoculadas, indicando haver nestas amostras algum fator inibitório da ativação da cascata da pro-fenoloxidase que merece ser investigado.

Outro aspecto testado foi a influência do título bacteriano do inóculo na indução da expressão de fatores antimicrobianos por larvas de *C. megacephala*. Os resultados apresentados nas tabelas 3 e 4 indicam que entre os títulos de $7,5 \times 10^5$ e $9,4 \times 10^4$ há indução da produção de agentes antibacterianos após 6 horas da inoculação, embora somente na concentração de $3,75 \times 10^5$ observou-se atividade nos três experimentos realizados. Esses dados sugerem que, talvez, não exista uma quantidade ótima de bactérias para que o desafio antigênico resulte em indução da produção de peptídeos antimicrobianos. Ainda pelos resultados observados nesse

experimento, não há uma associação entre título do inóculo e quantidade de fator antimicrobiano produzido, a se julgar pelo tamanho dos halos de inibição formados.

Finalmente, investigamos se esse(s) fator(es) antimicrobiano(s) induzido(s) pelo desafio antigênico com *Enterobacter faecalis* possui(em) atividade contra outras espécies bacterianas. Observamos que houve inibição de crescimento das espécies *Escherichia coli*, *Enterococcus faecium* e *Staphylococcus aureus*. Este resultado indica que efetivamente a(s) substância(s) produzida(s) deve(m) ser uma molécula do tipo cecropina, pois inibiu o crescimento tanto de Gram-positivas como de Gram-negativas (Da Silva, 2002; Jenssen et al., 2006). Por outro lado, a espécie *Burkholderia cepacia* se mostrou resistente ao tipo de agente antimicrobiano produzido na hemolinfa testada. Este resultado pode estar associado ao fato de que essa espécie bacteriana é reconhecidamente multi-resistente aos antibióticos conhecidos (McGowan, 2006).

Esse trabalho tratou-se de um estudo inicial focado no sistema imune de *Chrysomya megacephala* e sua capacidade de produção de molécula(s) com atividade antimicrobiana. Os resultados nos indicam que, de fato, ocorre produção de tal(is) molécula(s), embora seja necessário determinar as condições mais adequadas para que se obtenha a indução de sua expressão em *C. megacephala*. Uma vez estabelecida estas condições abre-se a perspectiva de caracterização molecular desse(s) fator(es), para que num segundo momento se possa trabalhar na produção sintética dessa(s) molécula(s) com a finalidade de servir como terapia antibacteriana para animais e seres humanos.

Agradecimentos

Káren Souza recebeu apoio financeiro do CNPq através do programa institucional BIC/UFRGS.

Referências

- Bulet, P., Hetru, C., Dimarcq, J.L. & Hoffmann, D. (1999) Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Developmental and Comparative Immunology*, **23**, 329–344.
- Cytrynska M., Mak P., Zdybicka-Barabas A., SUnder P., Jakubowicz T. (2007) Purification and characterization of eight peptides from *Galleria mellonella* immune hemolymph. *Peptides*, **28**, 533–546.
- Da Silva, C.C.A. (2002). Aspectos do Sistema Imunológico dos insetos. *Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento*, **24**, janeiro/fevereiro 2002.
- Dunn, P. E. (1986) Biochemical aspects of insect immunity. *Annual Review of Entomology*, **31**, 321-339.
- Greenberg, B. (1973). Flies and Disease. *Biology and Disease Transmission*, **2**, Princeton University Press, Princeton, NJ.
- Hoffmann, J.A. (1995). Innate immunity of insects. *Current Opinion in Immunology*, **7**, 4-10.
- Hultmark, D., Weisner, A., Dunphy, G.B., Marmaras, V.J., Morishima, I., Sugumaran, M., Yamakawa, M. (1998). *Techniques in Insect Immunology*, SOS Publications, New Jersey, 103–107.
- Jenssen H., Hamill P. & Hancock R.E.W. (2006) Peptide Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, **19**, 491–511.
- Jiravanichpaisal, P., Lee, B.L. and Söderhäll, K. (2006) Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. *Immunobiology*, **211**, 213–236.
- Kanost & Gorman em Nancy Beckage (Ed.) (2008). Insect Immunology. *Elsevier*, 69-96.

Lemaitre, B; Hoffmann J. (2007). The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annual Review of Immunology*. **25**, 697-743.

McGowan, J.E. Jr. (2006). Resistance in Nonfermenting Gram-Negative Bacteria: Multidrug Resistance to the Maximum. *The American Journal of Medicine*, **119** (6A), S29–S36.

Tabela 1 – Resultados qualitativos de experimentos de indução da atividade antibacteriana em *C. megacephala*, realizados em três ocasiões distintas.

Grupos	Presença ou ausência de halos de inibição para as amostras em diferentes diluições																	
	1:2			1:4			1:8			1:16			Antibiótico			Água deionizada		
	D1	D2	D3	D1	D2	D3	D1	D2	D3	D1	D2	D3	D1	D2	D3	D1	D2	D3
CT0	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-
CPT0	Nc	-	-	Nc	-	-	Nc	-	-	Nc	-	-	Nc	+	+	Nc	-	-
IT0	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
CT1	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
CPT1	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
IT1	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-
CT2	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
CPT2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
IT2	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-
CT3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
CPT3	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-
IT3	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-
CT4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
CPT4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
IT4	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
CT5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
CPT5	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
IT5	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
CT6	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
CPT6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
IT6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-
CT24	Nc	-	-	Nc	-	-	Nc	-	-	Nc	-	-	Nc	+	+	Nc	-	-
CPT24	Nc	-	-	Nc	-	-	Nc	-	-	Nc	-	+	Nc	+	+	Nc	-	-
IT24	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-

Legenda: CT = grupo controle em diferentes tempos; CPT = grupo controle puncionado em diferentes tempos; IT = grupo inoculado em diferentes tempos; Nc = não houve crescimento; D1/D2/D3 = dias 1, 2 e 3.

Tabela 2 – Resultados quantitativos de experimentos de indução da atividade antibacteriana em *Chrysomya megacephala*, realizados em três ocasiões distintas.

Grupos	Halos das amostras em diferentes diluições (em mm)														
	1:2			1:4			1:8			1:16			Antibiótico		
	D1	D2	D3	D1	D2	D3	D1	D2	D3	D1	D2	D3	D1	D2	D3
CT0	10,5	-	-	9	-	-	8,5	-	-	6	-	-	29	17,5	20
IT0	-	4,8	4,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	26,5	19	21
CT1	5,1	-	-	4,7	-	-	-	-	-	-	-	-	24	18,5	19,5
CPT1	-	6	-	-	4,3	-	-	4,1	-	-	-	-	28	18,5	20
IT1	8	5	-	7	4,9	-	6	-	-	4,9	4,2	-	24,5	20	20,5
CT2	4,9	-	-	4,1	-	-	4	-	-	-	-	-	25,5	18,5	20
IT2	8,1	-	-	7	-	-	5,7	-	-	4,8	-	-	29	18,5	19,5
CPT3	-	6	-	-	4,9	-	-	4,7	-	-	4,6	-	29	18	19
IT3	5,1	-	-	5	-	-	4,6	-	-	3,9	-	-	25	17,5	20
IT4	-	4,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	26	19,5	21
CPT5	-	4,9	-	-	4,4	-	-	-	-	-	-	-	27	17	20,5
IT5	*6	4,2	4,8	*5,4	4,4	4,2	-	-	-	-	-	-	25	18	21
CT6	-	5	-	-	4,5	-	-	4,2	-	-	-	-	27	16	22,5
IT6	8	5	5	7,1	4,2	4,2	6,4	5	4,1	5	-	-	25	20	20,5
CPT24	Nc	-	-	Nc	-	-	Nc	-	-	Nc	-	6,8	Nc	Nc	25
IT24	10	-	4,8	8	-	4,3	6,5	-	4,2	7	-	-	28,5	Nc	24,5

Legenda: CT = grupo controle em diferentes tempos; CPT = grupo controle puncionado em diferentes tempos; IT = grupo inoculado em diferentes tempos; D1/D2/D3 = dias 1, 2 e 3; **Nc** = não houve crescimento; * pontilhado preto circundando o halo.

Tabela 3 - Resultados qualitativos de experimentos de efeito da concentração do inoculo bacteriano na expressão de atividade antimicrobiana, realizados em três ocasiões distintas.

Grupos	Presença ou ausência de halos de inibição para as amostras em diferentes diluições																	
	1:2			1:4			1:8			1:16			Antibiótico			Água deionizada		
	D1	D2	D3	D1	D2	D3	D1	D2	D3	D1	D2	D3	D1	D2	D3	D1	D2	D3
CT6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
CPT6	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-
IT6 puro	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-
IT6 1:2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-
IT6 1:4	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-
IT6 1:8	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-

Legenda: CT6 = grupo controle, tempo 6h; CPT = grupo controle puncionado, tempo 6h; IT6 puro/1:2/1:4/1:8 = grupo inoculado com diferentes concentrações, tempo 6h; D1/D2/D3 = dias 1, 2 e 3.

Tabela 4 – Resultados quantitativos de experimentos acerca de efeito da concentração do inoculo bacteriano na expressão de atividade antimicrobiana, realizados em três ocasiões distintas.

Grupos	Halos das amostras em diferentes diluições (em mm)																	
	1:2			1:4			1:8			1:16			Antibiótico			Água deionizada		
	D1	D2	D3	D1	D2	D3	D1	D2	D3	D1	D2	D3	D1	D2	D3	D1	D2	D3
CT6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	25	26	26,5	-	-	-
CPT6	4,2	-	-	6	-	-	5	-	-	5	-	-	24,5	27	24	-	-	-
IT6 puro	5	10	-	6	9	-	5	8	-	5,3	6	-	24	27,5	22,5	-	-	-
IT6 1:2	5	10	5	5,5	10	5,5	5	9	4,5	5,5	9	-	24	28,5	24,5	-	-	-
IT6 1:4	-	5,5	7	-	5	6	-	4,8	5,5	-	4,8	5,5	25	26	20	-	-	-
IT6 1:8	-	6,1	-	5,5	6,2	-	5	6	-	4,5	4,6	-	26	22	21,5	-	-	-

Legenda: CT6 = grupo controle, tempo 6h; CPT = grupo controle puncionado, tempo 6h; IT6 puro/1:2/1:4/1:8 = grupo inoculado com diferentes concentrações, tempo 6h; D1/D2/D3 = dias 1, 2 e 3.

Tabela 5 – Resultados de experimentos de atividade antimicrobiana da hemolinfa em diferentes espécies bacterianas (halos em mm)

Espécies Bacterianas	IT6 diluição 1:2	IT6 diluição 1:4	CT6	CPT6	Antibiótico
<i>Escherichia coli</i>	4,2	-	-	-	22
<i>Burkhalderia cepacia</i>	-	-	-	-	22
<i>Enterococcus faecium</i>	5	4,5	-	-	23
<i>Staphylococcus aureus</i>	4,2	-	-	-	25
<i>Enterobacter faecalis</i>	4,2	-	-	-	27

Legenda: CT6 = grupo controle, tempo 6h; CPT = grupo controle puncionado, tempo 6h; IT6 puro/1:2/1:4/1:8 = grupo inoculado com diferentes concentrações, tempo 6h.

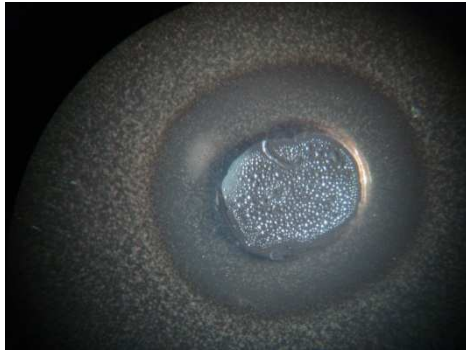


Fig. 1 – Hemolinfa coletada após 1h da inoculação, diluída 1:2.

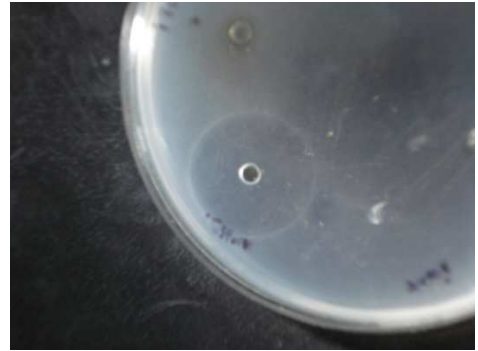


Fig. 2 – Controle positivo (antibiótico).



Fig. 3 – Controle negativo (água destilada autoclavada).

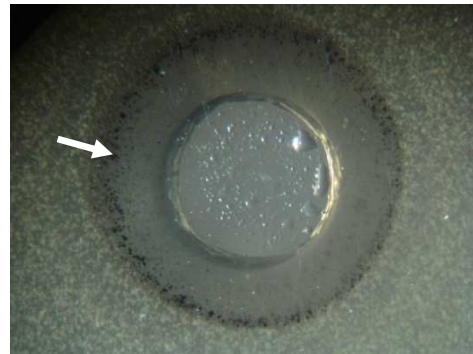


Fig. 4 – Hemolinfa coletada após 5h de inoculação, diluída 1:2. Notar a presença de pontilhado escuro circundando o halo de inibição e indicado pela seta.

5. CONCLUSÕES

Os resultados do trabalho nos levam a concluir o seguinte:

- Larvas de *Chrysomya megacephala* em estágio L3 não produzem níveis detectáveis de agentes antibacterianos ao serem testadas contra *Escherichia coli*, *Burkholderia cepacia*, *Enterobacter faecalis*, *Staphylococcus aureus* ou *Enterococcus faecium* quando a larva se encontra em condições normais, sem presença de injúria ou estresse de qualquer tipo;
- Quando inoculadas com *Enterobacter faecalis*, em concentrações de no mínimo $7,5 \times 10^4$ bactérias, as larvas produzem em sua hemolinfa fatores antibacterianos do tipo cecropina;
- Nem sempre quando *E. faecalis* foi inoculada foi detectada presença de agentes do tipo cecropina;
- Outros fatores, que não somente o desafio antigênico, podem levar à produção de moléculas com atividade antimicrobiana, como se pode perceber em alguns casos de controles puncionados ou não;
- Fatores antimicrobianos induzidos por *Enterobacter faecalis* também causam efeito antibiótico sobre as seguintes espécies bacterianas: *Escherichia coli*, *Enterobacter faecalis*, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecium*;
- Nas condições nas quais foi realizado esse trabalho, não se observou ação antibiótica sobre a bactéria *Burkholderia cepacia*.

Esse trabalho tratou-se de um estudo inicial focado no sistema imune de *Chrysomya megacephala* e sua capacidade de produção de molécula(s) com atividade antimicrobiana. Os resultados nos indicam que, de fato, ocorre produção de

tal(is) molécula(s), embora seja necessário determinar as condições mais adequadas para que se obtenha a indução da expressão destas moléculas em *C. megacephala*. Uma vez estabelecida estas condições abre-se a perspectiva de caracterização molecular desse(s) fator(es), para que num segundo momento se possa trabalhar com perspectivas de produção sintética dessa(s) molécula(s) com a finalidade de servir como terapia antibacteriana para animais e seres humanos.

6. BIBLIOGRAFIA COMPLEMENTAR

Bogdan, C; Rollinghoff, M; Diefenbach, A. (2000). Reactive oxygen and reactive nitrogen species in innate and specific immunity. *Current Opinion in Immunology*, **12**, 64-76.

Boman h.G., Faye I., Gudmundsson G.H., Lee J.Y., Lidholm D.A. (1991). Cell-free immunity in *Cecropia*. A model system for antibacterial proteins. *European Journal of Biochemistry*, **201**, 23-31.

Brey P.T., Lee W.J., Yamakawa M., Koizumi Y., Perrot S., François M., Ashida M. (1993). Role of the integument in insect immunity: epicuticular abrasion and induction o cecropin synthesis in cuticular epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **90**, 6275-6279.

Cerenius L; Söderhäll K. (2004). The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunological Reviews*, **198**, 116-26.

Chambers, L., Woodrow, S., Brown, A.P. et al. (2003) Degradation of extracellular matrix components by defined proteinases from the greenbottle larva *Lucilia sericata* used for the clinical debridement of non-healing wounds. *British Journal of Dermatology*, **148**, 14–23.

Da Silva, J.B., Albuquerque, C.M., Araujo, E.C., Peixoto, C.A., Hurd, H., (2000). Immune defense mechanisms of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) against *Candida albicans* infection. *Journal of Invertebrates Pathology*, **76**, 257–262.

Erdmann, G.R. & Khalil, S.K.W. (1986) Isolation and identification of two antibacterial agents produced by a strain of *Proteus mirabilis* isolated from larvae of the screwworm (*Cochliomyia hominivorax*) (Diptera: Calliphoridae). *Journal of Medical Entomology*, **23**, 208–211.

Faraldo, A.C., Lello, E. (2003). Defense reactions of *Dermatobia hominis* (Diptera: Cuterebridae) larval hemocytes. *Biocell*, **27**, 197–203.

- Faraldo, A.C.; Gregório E.A., Lallo E. (2007). Morphological and quantitative aspects of nodule formation in hemolymph of the blowfly *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794). *Experimental Parasitology*, **118**, 372–377
- Furlanetto, S.M., Campos, M.L.C., Harsi, C.M., (1994). Microorganismos enteropatogênicos em moscas africanas pertencentes ao gênero *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) no Brasil. *Revista de Microbiologia*, **15**, 170–174.
- Gillespie, JP; Kanost, MR; Trenczek, T. (1997). Biological mediators of insect immunity. *Annual Reviews of Entomology*, **42**, 611-643.
- Götz, P., Boman, H.G. (1985). Insect immunity. In: Kertut, G.A., Gilbert, L.I. (Eds.). *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, Pergamon Press, Oxford, 454–485.
- Greenberg, B. (1971). Flies and Disease. Volume 1: Ecology, Classification and Biotic Associations. *Princeton University Press*, Princeton, NJ.
- Greenberg, B. (1988). *Chrysomya megacephala* (F.) (Diptera: Calliphoridae) collected in North America and notes on *Chrysomya* species present in the New World. *Journal of Medical Entomology*, **25**, 199–200.
- Guimarães, J.H., Prado, A.P., Linhares, A.X. (1978). Three newly introduced blowfly species in Southern Brazil (Diptera: Calliphoridae). *Revista Brasileira de Entomologia*, **22**, 53–60.
- Hall, D.G. (1948). The Blow Flies of North America. *Thomas Say Foundation Publication*, Lanham, MD.
- Jiang, S.J. (1999). Chinese Pharmaceutical Insects (in Chinese). *Chinese Forestry Publishing House*, Beijing, China.
- Kerridge A.; Lappin-Scott h.; & Stevens J.R. (2005). Antibacterial properties of larval secretions of the blowfly, *Lucilia sericata*. *Medical and Veterinary Entomology*, **19**, 333–337.
- Koizumi, N., Imamura, M., Kadotani, T., Yaoi, K., Iwahana, H., & Sato, R. (1999). The lipopolysaccharide- binding protein participating in hemocyte nodule

formation in the silkworm *Bombyx mori* is a novel member of the C-type lectin superfamily with two different tandem carbohydraterecognition domains. *FEBS Letters*, **443**, 139-143.

Kuhlhorn, F. (1983). Distribution of toxoplasmosis. Cat feces and Diptera. *Tierärztliche Praxis*, **11(3)**, 385-92.

Lackie, A.M. (1980). Invertebrate immunity. *Parasitology*, **20**, 393–412.

Mumcuoglu, KY. (2001). Clinical Applications for Maggots in Wound Care. *American Journal of Clinical Dermatology*, **2**, 219-27.

Pemberton, R.W. (1999). Insects and other arthropods used as drugs in Korean traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, **65**, 207–216.

Prete, P.E. (1997) Growth effects of *Phaenicia Sericata* larval extracts on fibroblasts: Mechanism for wound healing by maggot therapy. *Life Sciences*, **60**, 505–510.

Ratcliffe, N. A., & Gagen, S. J. (1977). Studies on the *in vivo* cellular reactions of insects: An ultrastructural analysis of nodule formation in *Galleria mellonella*. *Tissue Cell*, **9**, 73–85.

Ratcliffe, N.A., Rowley, A.F. (1979). Role of insect hemocytes against biological agents. In: Gupta, A.P. (Ed.), *Insect Hemocytes: Development, Forms, Functions and Techniques*, Cambridge University Press, 331–414.

Ratcliffe, N.A., Rowley, A.F., Fitzgerald, S.W., Rhodes, C.P. (1985). Invertebrate immunity, basic concepts and recent advances. *International Review of Cytology*, **97**, 183–350.

Ratcliffe, N.A. (1986). Insect cellular immunity and the recognition of foreignness. *Symposium of the Zoological Society of London*, **56**, 21–43.

Ratcliffe, N. A., Brookman, J. L., & Rowley, A. F. (1991). Activation of the prophenoloxidase cascade and initiation of nodule formation in locusts by bacterial lipopolysaccharides. *Developmental & Comparative Immunology*, **15**, 33–39.

- Russo, J.; Brehélin, M.; Carton, Y. (2001). Haemocyte changes in resistant and susceptible strains of *D. melanogaster* caused by virulent and avirulent strains of the parasitic wasp *Leptopilina boulardi*. *Journal of Insect Physiology*, **47**, 167-172.
- Silva C., Gary B.D., Rau M.E. (2000). Interaction of hemocytes and prophenoloxidase system of fifth instar nymphs of *Acheta domesticus* with bacteria. *Developmental and Comparative Immunology*, **24**, 367-379.
- Slovák, M., Kazimírová, M., Bázliková, M., (1991). Haemocytes of *Mamestra brassicae* (L.) (Lepidoptera, Noctuidae) and their phagocytic activity. *Acta Entomologica Bohemoslovia*, **88**, 161–172.
- Stanley D.W., Miller J.S. & Howard R.W. (1998). The influence of bacterial species and intensity of infections on nodule formation in insects. *Journal of Insect Physiology*, **44**, 157–164.
- Strand M.R., Pech L.L. (1995). Immunological basis for compatibility in parasitoid-host relationships. *Annual Review of Entomology*, **40**, 31-56.
- Wells J.D. (1991). *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae) has reached the continental United States: review of its biology, pest status, and spread around the world. *Journal of Medical Entomology*, **28**, 471–473.
- Wiesner A. (1991). Introduction of immunity by latex beads and by hemolymph transfer in *Galleria mellonella*. *Developmental & Comparative Immunology*, **15**, 241–250.
- Wiesner A. (1992). Characteristics of inert beads provoking humoral immune responses in *Galleria mellonella*. *Journal of Insect Physiology*, **38**, 533–541.
- Wijesundara DP. (1957). The life-history and bionomics of *Chrysomya megacephala* (Fabricius). *Ceylon Journal of Science*, **B25**, 169-185.
- Williams RE. (1954). Investigation of outbreaks of infection. *British Medical Journal*, **4853**, 91-93.

7. ANEXOS

Normas do Periódico Medical and Veterinary Entomology.

Author Guidelines

Papers should be submitted online at <http://mc.manuscriptcentral.com/mve>. Full upload instructions and support are available online from the submission site via the 'Get Help Now' button. Please submit your covering letter or comments to the editor when prompted online. Papers submitted to *Medical and Veterinary Entomology* should be original research papers on the biology and control of arthropods of medical or veterinary importance such as ectoparasites, endoparasites, vectors of pathogens affecting humans and other animals and arthropods of forensic importance. The principal interests are in experimental applied entomology, genetics, epidemiology, vector transmission, biosystematics and distribution, ecology, life-cycles, behaviour and environment, biological and chemical control methods. In general, technical reports of insecticide trials are not published unless they present the results of large-scale field trials, or the use of particularly novel compounds. Insect and parasite distribution reports must be of more than local interest. Reviews and opinion papers are encouraged. This journal is covered in FO:VM.

Particular attention should be taken to adhere exactly to the journal style in all respects. Papers should be in clear concise English, not normally exceeding 6000 words of text (10 printed pages) but longer papers of particular merit may be accepted. Papers submitted must not have been published or be under consideration for publication by any other journal. Each manuscript must be accompanied by a cover letter(s) signed by all the authors stating that they have read and contributed to the work presented in the manuscript.

We recommend the use of a tool such as EndNote for reference management and formatting. EndNote reference styles can be searched for [here](#).

Manuscripts not complying with these conditions will be returned to the authors.

Ethical considerations will be taken into account in judging the acceptability of papers and the editors' decision on this, as on all other aspects, will be final. A PDF of each paper will be provided free to the corresponding author following publication. Reprints may be ordered from the publishers at current prices when proofs are returned.

The name and full postal address, phone, fax and email address of the author to whom readers should address correspondence should be given on the first page; this will appear as a footnote in the journal.

Measurements should be given in SI units. Simple measures of variability (e.g. standard error or confidence limits) should always accompany means. The same data should not be given in both tables and figures.

References should conform to the 'name-and-date' system; titles of periodicals must be given in full in the list of references at the end of the paper. The title of the paper should be informative but preferably not exceed twenty words. A short title (for page headlines) of not more than forty letters, including spaces, should also be supplied. Taxonomic affiliation and authority should be given at the first mention of a species in the abstract, not in the title. Authority only should follow the taxonomic name in full at first mention in the text. The paper should include a self-contained abstract, presented as a series of factual statements which summarise the results. The abstract should follow under the title. Authors should provide a maximum of ten key words.

Tables with their legends must be on separate sheets. Figure legends should be grouped together on a separate sheet. Both figure and table legends should be self-explanatory.

Figures must be boldly drawn in black. Colour may be used, colour artwork is reproduced online free of charge but authors will be charged the full cost for the reproduction in print. Therefore, please note that if there is colour artwork in your manuscript when it is accepted for publication, Wiley-Blackwell require you to complete and return a Colour Work Agreement form before your paper can be published. Details can be found in the colour work agreement section below.

Figures should be submitted at least twice their final printed size with lettering large enough to allow appropriate reduction on the printed page. Figures should be numbered serially. Authors should avoid unnecessarily large lettering. When preparing electronic figures please remove default settings, such as background shading, gridlines, borders and headings. Maps must be clear, drawn with high quality continuous lines, with scales and compass orientation. Photographs of good contrast are acceptable for half-tone reproduction when they are a real contribution to the text.

Initially, graphics and bitmap files should be submitted in an easy to read format, such as Word or as a PDF. Once a manuscript is accepted, it is preferable that graphics (e.g. line artwork) be provided in Encapsulated Postscript Format (EPS) and bitmap files (e.g. half-tones) in Tagged Image File Format (TIFF). For more information, please see section below.

Early View

Medical and Veterinary Entomology is covered by Wiley-Blackwell's Early View service. Early View articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Articles are therefore available as soon as they are ready, rather than having to wait for the next scheduled print issue. Early View articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. The nature of Early View articles means that they do not yet have volume, issue or page numbers, so Early View articles cannot be cited in the traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the

DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article. More information about DOIs can be found at: <http://www.doi.org/faq.html>.

Offprints

The corresponding author will receive a PDF file of the article free of charge. Additional offprints may be ordered from offprint@cosprinters.com

Exclusive Licence Form

Authors will be required to sign an Exclusive Licence Form (ELF) for all papers accepted for publication. Signature of the ELF is a condition of publication and papers will not be passed to the publisher for production unless a signed form has been received. Please note that signature of the Exclusive Licence Form does not affect ownership of copyright in the material. (Government employees need to complete the Author Warranty sections, although copyright in such cases does not need to be assigned). After submission authors will retain the right to publish their paper in various medium/circumstances (please see the form for further details). To assist authors an appropriate form will be supplied by the editorial office.

OnlineOpen

OnlineOpen is available to authors of primary research articles who wish to make their article available to non-subscribers on publication, or whose funding agency requires grantees to archive the final version of their article. With OnlineOpen the author, the author's funding agency, or the author's institution pays a fee to ensure that the article is made available to non-subscribers upon publication via Wiley InterScience, as well as deposited in the funding agency's preferred archive. For the full list of terms and conditions, see

http://www3.interscience.wiley.com/authorresources/onlineopen.html#OnlineOpen_Terms.

Any authors wishing to send their paper OnlineOpen will be required to complete the payment form available from our website at:

https://secure.interscience.wiley.com/funded_access.html

Prior to acceptance there is no requirement to inform an Editorial Office that you intend to publish your paper OnlineOpen if you do not wish to. All OnlineOpen articles are treated in the same way as any other article. They go through the journal's standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit.

Note to NIH Grantees

Pursuant to NIH mandate, Wiley-Blackwell will post the accepted version of contributions authored by NIH grant-holders to PubMed Central upon acceptance. This accepted version will be made publicly available 12 months after publication. For further information, see www.wiley.com/go/nihmandate.

Author material archive policy

Please note that unless specifically requested, Wiley-Blackwell will dispose of all hardcopy or electronic material submitted 2 months after publication. If you require the return of any material submitted, please inform the Editorial Office or Production Editor as soon as possible if you have not yet done so.

Colour work agreement forms

It is the policy of *Medical and Veterinary Entomology* for authors to pay the full cost for the print reproduction of their colour artwork. Colour artwork will be published online free of charge. Therefore, please note that if there is colour artwork in your manuscript when it is accepted for publication, Wiley-Blackwell require you to complete and return a [Colour Work Agreement form](#) before your paper can be published. This form can be downloaded as a PDF* from the internet. If you are unable to access the internet, or are unable to download the form, please contact the Production Editor at: mve@wiley.com and they will be able to email or FAX a form to you. Once completed, please return the form to the Production Editor at the address below:

Fionna de Guzman

Production Editor

Journal Content Management

Wiley-Blackwell

Wiley Services Singapore Pte Ltd

600 North Bridge Road

05-01 Parkview Square

Singapore

188778

Any article received by Wiley-Blackwell without colour work will not be published until the form has been returned.

*To read PDF files, you must have Acrobat Reader installed on your computer. If you do not have this program, this is available as a free download from the following web address: <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>

Preparation of electronic artwork

Once your manuscript has been accepted, we would like to receive your artwork. Please prepare your figures according to the publisher's [Electronic Artwork Guidelines](#).

- Create EPS files for images containing lineart. EPS files should be saved with fonts embedded (and with a TIFF preview if possible). The following packages can be used to create EPS files: Adobe

Illustrator 7.0 and above, Deneba Canvas 6.0 and above, CoreIDRAW 7.0 and above, SigmaPlot 8.01 and above. Other programs may also be able to create EPS files - use the SAVE AS or EXPORT functions. EPS files can be produced from other applications (e.g. PowerPoint, Excel) BUT results can be unpredictable (e.g. fonts and shading not converted correctly, lines missing, dotted lines becoming solid).

- Create TIFF files images containing half-tones/photographs. For scanned images, the scanning resolution (at final image size, see above for a guide to sizes) should be as follows to ensure adequate reproduction: lineart, >800 d.p.i.; half-tones, >300 d.p.i. Figures containing both halftone and line images, >600 d.p.i. The following programs can be used to create TIFF files: Adobe Photoshop 4.0 and above, Adobe Illustrator 9.0 and GraphPad Prism 3. Other programs may also be able to create TIFF files - use the SAVE AS or EXPORT functions.
- Black and white images should be supplied as 'grayscale'; colour images should be supplied as CMYK.
- Multipart figures should be supplied in the final layout in one file, labelled as (A), (B) etc
- Supply figures at final size widths if possible: 19 picas (single column) or 40 picas (double column)
- Use sans serif, true-type fonts for labels if possible, preferably Arial or Helvetica, or Times (New) Roman if serif fonts required.
- Ensure all lines and lettering are clear.

Proofs

The corresponding author will receive an email alert containing a link to a web site. A working e-mail address must therefore be provided for the corresponding author. The proof can be downloaded as a PDF (portable document format) file from this site. Acrobat Reader will be required in order to read this file. This software can be downloaded (free of charge) from the following web site: <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>. This will enable the file to be opened, read on screen and printed out in order for any corrections to be added. Further instructions will be sent with the proof. Hard copy proofs will be posted if no e-mail address is available. Excessive changes made by the author in the proofs, excluding typesetting errors, will be charged separately.

Author Services

Online production tracking is now available for your article through Wiley-Blackwell's Author Services. Author Services enables authors to track articles--once they have been accepted--through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated emails at key stages of production so they do not need to contact the production editor to check on progress. Visit <http://authorservices.wiley.com/bauthor/> for more details on online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission, and more.

Aims & Scope

Medical and Veterinary Entomology is the leading periodical in its field. The Journal covers all aspects of the biology and control of insects, ticks, mites and other arthropods of medical and veterinary importance. The main strengths of the Journal lie in the fields of: vector biology and transmission dynamics;

- host parasite interactions;
- behaviour;
- biosystematics;
- ecology;
- environmental, physical, chemical and biological control methods.