

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-graduação em Parasitologia

Rodolfo Silva Moreira Cezar

**ESTUDO DA FISIOLOGIA DA GLÂNDULA SALIVAR E DO INTESTINO DE
LARVAS DE TERCEIRO ESTÁDIO E ADULTOS DE *CHRYSOMYA*
MEGACEPHALA (FABRICIUS, 1794)**

Belo Horizonte

2021

Rodolfo Silva Moreira Cezar

**ESTUDO DA FISIOLOGIA DA GLÂNDULA SALIVAR E DO INTESTINO DE
LARVAS DE TERCEIRO ESTÁDIO E ADULTOS DE *CHRYSOMYA*
MEGACEPHALA (FABRICIUS, 1794)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito à obtenção do título de Doutor em Parasitologia.

Área de concentração: Entomologia

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Nascimento Araújo

Co-orientador: Prof. Dr. Nelder de Figueiredo Gontijo

Belo Horizonte

2021

043 Cezar, Rodolfo Silva Moreira.
Estudo da fisiologia da glândula salivar e do intestino de larvas de terceiro estágio e adultos de *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) (Diptera, Brachycera, Calliphoridae) [manuscrito] / Rodolfo Silva Moreira Cezar. – 2021. 83 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Nascimento Araújo. Co-orientador: Prof. Dr. Nelder de Figueiredo Gontijo.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Parasitologia.

1. Parasitologia. 2. *Chrysomya Megacephala*/fisiologia. I. Araújo, Ricardo Nascimento. II. Gontijo, Nelder de Figueiredo. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576.88/.89



ATA DE DEFESA DE TESE - DOUTORADO

Rodolfo Silva Moreira Cezar

320/2021/08
entrada
2º/2016
2016751767

Às **quatorze horas** do dia **21 de julho do ano de 2021**, reuniu-se, por videoconferência, sala <https://conferenciaweb.rnp.br/events/defesa-de-tese-de-doutorado-rodolfo-cezar>, a Comissão Examinadora de Tese, indicada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Parasitologia para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: **“Estudo da fisiologia da glândula salivar e do intestino de larvas de terceiro estágio e adultos de *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794)”,** área de concentração: **Entomologia**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, **Dr. Ricardo Nascimento Araujo**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao (a) candidato (a), para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do (a) candidato (a). Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do (a) candidato (a) e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dr. Ricardo Nascimento Araujo	UFMG	Aprovado
Dr. Antonio Ferreira Mendes Sousa	UFPI	Aprovado
Dr. Vladimir Fazito do vale	IRR/FIOCRUZ - MG	Aprovado
Dr. Eduardo Robson Duarte	ICA/UFMG	Aprovado
Dr. Fabrício Marcus Silva Oliveira	UFMG	Aprovado
Dr. Nelder de Figueiredo Gontijo	UFMG	Aprovado

Expedição do resultado final.

CONSIDERAÇÕES GERAIS – SOBRE TESE APRESENTADA PELO (A) O (A) CANDIDATO (A):

Exigências	
Recomendações	Encaminhadas ao discente em arquivo por email
Sugestões	Repassadas ao aluno durante a arguição.

Pelas indicações, o (a) candidato(a) foi considerado(a): aprovado

O resultado final foi comunicado publicamente ao(a) candidato(a) pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 21 de julho de 2021.

Dr. Ricardo Nascimento Araujo _____

(Orientador)

Dr. Antonio Ferreira Mendes Sousa _____

Dr. Vladimir Fazito do vale _____

Dr. Eduardo Robson Duarte _____

Dr. Fabrício Marcus Silva Oliveira _____

Dr. Nelder de Figueiredo Gontijo _____

(Coorientador)

Agradecimentos

A minha família, meus pais Sergio e Sônia, pelo amor, amizade, pelo apoio e incentivo, conselhos, atenção, paciência, respeito e compreensão. Sou muito grato a vocês por tudo! Meus queridos irmãos, Vinicius e Frederico, pela amizade, pelo apoio, por serem meu porto seguro, pelas conversas, paciência e por compartilharem das minhas alegrias e tristezas.

A Deus, por estar presente na minha vida todos os dias, me iluminado, guiando, protegendo, me enchendo de energia, saúde e permitindo que eu realize as minhas vontades.

Aos meus amigos do peito, meus brothers, Eduardo Porto, Luís Otavio, Sergio Mendes por todos esses anos de amizade.

Aos meus amigos que a Medicina Veterinária me presenteou, Magno, Matheus, Fernando e Gabriel Andrade por entenderem a minha ausência e sempre se fazerem presentes no meu dia-dia, me alegrando e incentivando.

Ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do ICB, em especial a secretaria Sumara por todos esses anos de ajuda, conversas, orientações, palavras de incentivo e amigas, muito obrigado por ser sempre gentil, prestativa e profissional. A Sibebe, por todo apoio e atenção.

Ao Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos (LFIH) por todos esses anos de aprendizado com alegria, harmonia, boa convivência, pelo respeito e ajuda de todos, é uma verdadeira família.

À Paula Franco, em especial, pela amizade, pelas conversas, pelos ensinamentos e por me ajudar sempre com boa vontade, paciência e calma. Muito obrigado por tudo.

Ao Luccas Malta, por me ensinar e ajudar no que fosse preciso no LFIH. Muito obrigado pelos ensinamentos, por fazer a rotina no laboratório ficar prática e descontraída, pela companhia para almoçar no bandeirão ou fazer qualquer coisa e por se tornar um grande amigo, sou grato a ciência.

Ao Prof. Maurício, que acabou virando um grande amigo. Obrigado por toda ajuda, conselhos, atenção e pelos momentos de descontração.

Aos técnicos do laboratório, em especial César Nonato, por ser uma pessoa prestativa, atenciosa, cuidadosa com as pessoas e o ambiente de trabalho, gentil, alegre, organizado e por toda ajuda que era necessária.

Aos professores do LFIH, Nelder Gontijo, Marcos Horácio, Ricardo Araújo, Maurício Sant'Anna, Leonardo Koerich e Grasielle Pessoa por todo conhecimento transmitido e discussões científicas.

Ao meu orientador Dr. Prof. Ricardo Araújo, profissional que eu já admirava desde quando estava me preparando para a seleção do mestrado! Sempre muito entusiasmado nas aulas de entomologia, muito inteligente e paciente para ensinar. No doutorado, não foi diferente, agradeço muito a oportunidade de realizar a tese no laboratório, pela atenção e o cuidado em ensinar, pelas conversas, pelas colaborações nos trabalhos, por ser profissional e um grande pesquisador. Muito obrigado por compartilhar seu conhecimento e sua opinião, pelas sugestões e a orientação.

Ao meu co-orientador Prof. Nelder Gontijo por todo conhecimento transmitido, por toda ajuda metodológica, pelas conversas científicas e descontraídas, que sempre acabavam com boas risadas e muita reflexão. Sempre lembrarei das suas palavras: o importante é o que importa, o resto é secundário. Seu Nelder, sua alegria, gentileza, educação e vocação para ciência é contagiante.

Ao Prof. Walter Santos Lima, quem abriu as portas da Parasitologia no Instituto de Ciências Biológicas - ICB e me permitiu que realizasse o meu sonho de fazer o mestrado em Helminologia Veterinária na UFMG. Sou eternamente grato por todo o conhecimento do mundo da Parasitologia. Você é um exemplo de Parasitologista e Pesquisador.

A todos os professores do Departamento de Parasitologia, muito obrigado por compartilharem os seus conhecimentos e experiências, em especial Profas. Maria Aparecida, Lucia Galvão, Daniella Bartholomeu, Helida Moteiro, Elida Rabelo, Érica Braga, Julia Gonçalves da Silveira e os Profs. Marcos Pezzi, Múcio Ribeiro, Ricardo Fujiwara, Ricardo Vitor, Álvaro Eiras, Stefan Geiger e Hudson Pinto. Prof. Ramiro, pelas conversas, histórias, doces, pimentas, pingas, queijos e por gostar de ensinar, ser paciente e atencioso.

A todos os técnicos do Departamento de Parasitologia, em especial o Hudson Andrade da Helminologia Veterinária por todo conhecimento transmitido, por gostar de ensinar, por ser atencioso, paciente e muito prestativo. João Carlos França e Elaine Matias de Leishmanioses, Afonso do Laboratório de Tripanossomoses, Rosálida de Toxoplasmose, por sempre ajudar com alegria e pelas conversas agradáveis. Vanessa, por ser prestativa, educada, gentil, atenciosa e ser disponível para ajudar sempre! Muito obrigado.

A Dona Cida e Seu Neri, por todas as conversas agradáveis, amizade e almoços que fizemos! O encontro da lasanha na cantina da Parasitologia ficará na lembrança.

Destino não é uma questão de sorte, mas uma questão de escolha. Não é uma coisa que se espera, mas que se busca.

Sergio Rubens Cezar

Este Trabalho foi realizado no Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos (LFIH), do Departamento de Parasitologia - ICB - UFMG, e contou com o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) e Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular (INCT-EM).

Suporte financeiro: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas- Gerais (FAPEMIG) e INCT em Entomologia Molecular.

RESUMO

A mosca *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) tem estreita relação com humanos e animais, sendo importante por causar miíases e atuar como disseminador de patógenos. Suas larvas são necrobiontófagas e os adultos alimentam-se de suspensões nutritivas e bactérias. O pH e as atividades biológicas presentes no intestino e aspectos relacionados com as glândulas salivares são fatores que interferem diretamente no processo digestivo e conseqüentemente, no desenvolvimento e sobrevivência de indivíduos. Dessa maneira, o objetivo desta pesquisa foi estudar a fisiologia da glândula salivar e do intestino de larvas de terceiro estágio e adultos de *C. megacephala*. A massa das larvas foi mensurada diariamente em balança analítica. Para avaliar o fluxo intestinal, as larvas foram alimentadas com carne de peixe macerada e homogeneizada com carvão vegetal ativado em pó. A quantidade de proteínas por par de glândula salivar das larvas foi avaliada pelo método de dosagem de proteínas descrito por Bradford (1974). O pH intestinal foi estimado por corantes indicadores de pH. A atividade das endoproteases no intestino foi analisada pela hidrólise do substrato azoalbumina. A atividade da catalase no intestino foi determinada pela taxa de decomposição do peróxido de hidrogênio, na presença de extrato de intestino, e a atividade da lisozima foi medida pela lise da bactéria *Micrococcus lysodeikticus*. Os resultados mostraram que o ganho de massa foi extremamente rápido nos três primeiros dias de desenvolvimento larval e em quatro dias as larvas passaram de 0,3 mg para 42,5 mg. As larvas de terceiro estágio com três dias de vida apresentaram maior comprimento das glândulas salivares e maior quantidade de proteínas. O tempo médio que o alimento ingerido pelas larvas levou para ser excretado foi de $48,8 \pm 6,2$ minutos. Nas larvas, a região do intestino médio médio (IMM) apresentou o pH mais ácido (entre 4,0 e 6,5) quando comparado com intestino médio anterior (IMA), intestino médio posterior (IMP) e intestino posterior (IP) que apresentaram pH variando de 4,5 a 7,0. Nos adultos, o pH no interior de todas as regiões avaliadas do intestino foi levemente ácido (entre 5,5 e 6,5). A atividade das endoproteases do intestino foi maior nas larvas nos pHs 7,5 e 8,0 e nos adultos, independentemente do pH testado, a atividade foi mais baixa. Larvas e adultos possuem atividade de lisozima no intestino, entretanto, essa atividade foi duas vezes maior em larvas. As larvas apresentaram atividade média de catalase no intestino maior que nos adultos que apresentaram atividade média aproximadamente 22 vezes menor. As partes do intestino das larvas com maior atividade de catalase foi o IMM. Entretanto, nos adultos o IMM e IMP foram

as regiões com maiores atividades de catalase. Todas as regiões do intestino das larvas apresentaram atividade de catalase superior em relação às verificadas para os adultos.

Futuros estudos devem elucidar o papel da glândula salivar e o intestino das L3 de *C. megacephala* para entendermos como ocorre a digestão de proteínas, de lipídeos, carboidratos quais bactérias colonizam o intestino e o papel dos produtos de secreção e excreção na digestão.

Palavras-Chaves: mosca varejeira; tubo digestivo; saliva; pH; proteases; catalase; lisozima.

ABSTRACT

The *Chrysomya megacephala* fly (Fabricius, 1794) has a close relationship with humans and animals, for acting as an important potential disseminator of pathogens and for causing myiasis. Its larvae are necrobiontophagous and the adults feed on nutrient suspensions and bacteria, with the gut being the place for processing the diet. The pH and biological activities present in the intestine are factors that interfere directly in the digestive process and, consequently, in the development and survival of individuals. Thus, the aim of this study was to study the physiology of the salivary gland and intestine of third instar larvae and adults of *C. megacephala*. The specimen mass was measured daily on an analytical balance. To assess the intestinal flow, the larvae were fed with macerated fish meat homogenized with powdered activated charcoal. The amount of proteins per salivary gland pair of third instar larvae was evaluated by the protein dosage method described by Bradford (1974). To assess the intestinal pH, different pH indicator dyes were used. The activity of endoproteinase in the intestine was evaluated by decomposition of the substrate azoalbumin. The catalase activity in the intestine was measured by the rate of decomposition of hydrogen peroxide in the presence of the intestine extract and the lysozyme activity was measured by the lysis of the bacterium *Micrococcus lysodeikticus*. The results showed that the mass gain was extremely fast in the first three days of larval development and in four days the larvae increased from 0.3 mg to 42.5 mg. Three-day-old third-instar larvae presented the length of the salivary glands with differences in length ($p < 0.01$) and in the amount of proteins ($p < 0.001$). The mean time that the food ingested by the larvae took to be excreted was 48.8 ± 6.2 minutes. In larvae, the middle midgut region had the most acidic pH (between 4.0 and 6.5) when compared to the other regions that had pH ranging from 4.5 to 7.0. In adults, the pH inside all evaluated regions of the intestine was acidic (between 5.5 and 6.5). The activity of endoproteases in the intestine was higher in larvae at pH 7.5 and 8.0 and in adults, regardless of the pH tested, the activity was lower. Larvae and adults have lysozyme activity in the intestine, which is more than twice as high in larvae. The larvae had an average activity of catalase in the intestine of 400 $\mu\text{mol}/\text{min}$ while the adults had an average activity approximately 22 times lower (18 $\mu\text{mol}/\text{min}$; $p < 0.05$). The parts of the intestine of larvae with the highest catalase activity were the IMM with 94.0 $\mu\text{mol}/\text{min}$. While in adults were the regions of the IMM and IMP, both with 4.5 $\mu\text{moles}/\text{min}$. All the different regions of the intestine of the larvae presented catalase activity higher than those verified for the adults. The results obtained in this study demonstrate the need to further study the role of the salivary gland and the intestine of the L3 of *C. megacephala* to understand how the digestion of proteins, lipids and carbohydrates occurs which bacteria colonize the intestine, the role of the products of secretion and excretion in digestion, development and in the innate immune response.

Keywords: blowfly, oriental latrine fly, digestive tract, saliva, pH, catalase, lysozyme.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Estágios de desenvolvimento ao longo do ciclo biológico de <i>C. megacephala</i> . Fonte: arquivo pessoal.	20
Figura 2:	Glândula salivar de larvas de terceiro estágio e adultos de <i>C. megacephala</i> . Adaptado de Boonsriwong et al. (2012).	22
Figura 3:	Glândula salivar de adulto de <i>C. megacephala</i> rompida e exibindo numerosas vesículas arredondadas que provavelmente são grânulos secretores. Adaptado de Boonsriwong et al. (2012)	23
Figura 4:	Intestino anterior da larva de terceiro estágio de <i>C. megacephala</i> .	23
Figura 5:	Intestino de <i>C. megacephala</i> .	24
Figura 6:	Representação esquemática da atuação de endoproteases e exoproteases. Adaptado de Barrett (1994).	27
Figura 7:	Esquema da parede celular bacteriana. (A) Bactérias Gram-positivas e (B) Bactérias Gram-negativas. Adaptado: Vermelho e Bastos, 2007.	30
Figura 8:	Insetário do Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos. Gaiolas de criação das moscas <i>C. megacephala</i> mantidas em insetário a 26°C.	36
Figura 9:	Materiais usados na manutenção da colônia de <i>C. megacephala</i> .	36
Figura 10:	Recipiente usados para o desenvolvimento de larvas e recuperação de pupas de <i>C. megacephala</i> .	37
Figura 11:	Recuperação das pupas de <i>C. megacephala</i> para obtenção dos adultos.	37
Figura 12:	Inspeção do fluxo intestinal das larvas de terceiro estágio de <i>C. megacephala</i> dentro dos microtubo de polipropileno de 1,5 mL.	41
Figura 13:	Intestino de <i>C. megacephala</i> dissecado e posicionado para ser medido o comprimento.	43
Figura 14:	Corantes vitais indicadores de pH utilizados nos experimentos.	43
Figura 15:	Ingestão de dieta contendo corantes indicadores de PH por larvas e adultos de <i>Chrysomya megacephala</i> .	44
Figura 16:	Padrões de cores dos corantes vitais indicadores de pH.	44
Figura 17:	Massa corporal do primeiro estágio larval ao empupamento de <i>C. megacephala</i> .	49
Figura 18:	Glândula salivar das larvas de terceiro estágio de <i>C. megacephala</i> .	50
Figura 19:	Conteúdo proteico por glândula salivar de larvas de terceiro estágio de <i>C. megacephala</i> .	51

Figura 20:	Fluxo intestinal de larvas de terceiro estágio de <i>C. megacephala</i> .	52
Figura 21:	Comprimento intestinal de larvas de terceiro estágio e adultos de <i>C. megacephala</i> .	53
Figura 22:	pH do intestino médio das larvas de terceiro estágio de <i>C. megacephala</i> .	55
Figura 23:	pH do intestino posterior das larvas de terceiro de <i>C. megacephala</i> .	55
Figura 24:	pH intestinal das larvas de terceiro estágio de <i>C. megacephala</i> .	56
Figura 25:	pH do intestino médio dos adultos de <i>C. megacephala</i> .	58
Figura 26:	pH do intestino posterior dos adultos de <i>C. megacephala</i> .	59
Figura 27:	pH intestinal dos adultos de <i>C. megacephala</i> .	59
Figura 28:	Atividade das endoproteases totais no intestino em diferentes pHs de larvas de terceiro estágio e adultos de <i>C. megacephala</i> .	60
Figura 29:	Atividade de lisozima no intestino de <i>C. megacephala</i> .	61
Figura 30:	Atividade de catalase no intestino de larvas e adultos de <i>C. megacephala</i> .	62
Figura 31:	Atividade de catalase nas diferentes regiões do intestino de larvas de terceiro estágio e adultos de <i>C. megacephala</i> .	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Duração dos estágios/estádios de <i>C. megacephala</i> em condições de laboratório.	49
Tabela 2:	Comprimento intestinal das larvas de terceiro estágio e adultos de <i>C. megacephala</i>	53
Tabela 3:	Variação do pH intestinal das larvas de terceiro estágio de <i>C. megacephala</i> .	57
Tabela 4:	Variação do pH intestinal dos adultos de <i>C. megacephala</i> .	59

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

AC:	Anidrase carbonica
AB:	Azul de bromotiomol
CO ₂ :	Gás carbnico
AS:	Ascorbato de sódio
APX:	Ascorbato peroxidase
BSA:	Soro albumina bovina
BOD:	Demanda bioquímica do oxigênio
C:	Grau Celsius
CAT:	Catalase
cm:	Centímetro
CO ₂ :	Gás carbnico
CTI:	Comprimento total do intestino
DNA:	cido desoxirribonucleico
EGS:	Extratos de glândula salivar
EIB:	Extrato de intestino bruto
g:	Gramas
GSH:	Glutationaredutase
GPx:	Glutationa peroxidase
H ₂ O ₂ :	Peróxido de hidrogênio
HCl:	cido clorídrico
HEPES:	cido etanosulfônico – 4 – (2 – hidroxietil) – 1 – piperazina
ICB:	Instituto de Ciências Biológicas
IA:	Intestino anterior
IMA:	Intestino médio anterior
IM:	Intestino médio
IMM:	Intestino médio médio
IMP:	Intestino médio posterior
IP:	Intestino posterior
L1:	Larva de primeiro estdio
L2:	Larva de segundo estdio

L3:	Larva de terceiro estágio
LFIH:	Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos
M:	molar
MES:	Ácido 4-morfolinoetanosulfônico
mg:	Miligramas
mL:	Mililitros
µL:	Microlitro
mM:	Milimolar
MP:	Matriz peritrófica
nm:	Nanometro
NaCl:	Cloreto de Sódio
NaOH:	Hidróxido de sódio
PB:	Púrpura de bromocresol
pH:	Potencial hidrogeniônico
pKa:	Potencial de dissociação ácida
PBS:	Tampão fosfato salino
RI:	Regiões do intestino
ROS	Espécies reativas de oxigênio
Prx:	Peroxiredoxina
PPO:	Polifenol oxidase
SOD:	Superóxido dismutase
TCA:	Ácido tricloroacético
TRIS:	hidroximetilaminometano
U:	Unidade de atividade enzimática
VB:	Verde de bromocresol

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1 <i>Chrysomya megacephala</i>	19
1.1.1 Taxonomia e epidemiologia	19
1.1.2. Ciclo biológico	19
1.1.3 Importância Médica e Veterinária	20
1.1.4 Morfologia do intestino de larvas de terceiro estágio e adultos.....	21
1. 2 pH intestinal dos dípteros	25
1. 3 Endoproteases intestinais em dípteros	26
1. 4 Lisozimas intestinais em dípteros.....	28
1. 5 Catalase intestinal em insetos	30
2. JUSTIFICATIVA.....	33
3. OBJETIVOS.....	34
3. 1 Objetivo geral	34
3. 2 Objetivos específicos.....	34
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
4.1 Coleta dos espécimes de <i>C. megacephala</i>	35
4.2 Formação e manutenção da colônia de <i>C. megacephala</i> em condições de laboratório.....	35
4.3 Avaliação da massa de <i>C. megacephala</i> do primeiro estágio até a eclosão dos adultos	38
4.4 Duração do desenvolvimento dos estágios de <i>C. megacephala</i>	38
4.5 Avaliação do desenvolvimento da glândula salivar das larvas de terceiro estágio de <i>C. megacephala</i>	38
4.6 Obtenção do Extrato de glândulas Salivares (EGS) de larvas de terceiro estágio de <i>C. megacephala</i>	39
4.7 Quantificação de proteínas nas glândulas salivares das larvas de terceiro estágio de <i>C. megacephala</i>	40
4.8 Determinação do fluxo intestinal das larvas de terceiro estágio de <i>C. megacephala</i>	40
4.9 Obtenção dos intestinos das larvas de terceiro estágio e adultos de <i>C. megacephala</i>	41

4.10 Comprimento intestinal das larvas de terceiro estágio e adultos de <i>C. megacephala</i>	42
4.11 Determinação do pH intestinal	43
4.12 Ensaio para avaliação de atividades enzimáticas no intestino.....	45
4.12.1 Soluções tampão utilizadas.....	45
4.12.2 Avaliação da presença e pH ótimos para endoproteases intestinais.....	45
4.12.3 – Determinação da atividade de lisozima no intestino de larvas de terceiro estágio e adultos de <i>C. megacephala</i>	46
4.12.4 Avaliação da presença da atividade de catalase no intestino de larvas de terceiro estágio e adultos de <i>C. megacephala</i>	46
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	47
6. RESULTADOS.....	48
6.1 Desenvolvimento de larvas de primeiro estágio ao empupamento de <i>C. megacephala</i>	48
6.2 Desenvolvimento da glândula salivar de larvas de terceiro estágio de <i>C. megacephala</i>	50
6.3 Fluxo intestinal das larvas de terceiro estágio de <i>C. megacephala</i>	51
6.4 Comprimento intestinal de larvas de terceiro estágio e adultos de <i>C. megacephala</i> ...	52
6.5 pH intestinal das larvas de terceiro estágio de <i>C. megacephala</i>	54
6.6 pH intestinal dos adultos de <i>C. megacephala</i>	57
6.7 Atividade das endoproteases no intestino de larvas de terceiro estágio e adultos de <i>C. megacephala</i> em diferentes pHs	60
6.8 Atividade de lisozima no intestino de larvas de terceiro estágio e adultos de <i>C. megacephala</i>	61
6.9 Atividade de catalase no intestino de larvas de terceiro estágio e adultos de <i>C. megacephala</i>	62
7. DISCUSSÃO.....	64
8. CONCLUSÕES	69
REFERÊNCIAS	70

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Chrysomya megacephala*

1.1.1 Taxonomia e epidemiologia

Os dípteros são divididos em duas subordens: Nematocera, composta por espécimes que possuem mais de oito artigos nas antenas e Brachycera, cujas antenas têm até seis artigos. Os insetos da subordem Brachycera estão classificados em diferentes infraordens e dentre os Muscomorpha, a família Calliphoridae possui 1.525 espécies registradas (Pape et al. 2004). *Chrysomya megacephala*, espécie foco deste estudo, é um califorídeo conhecido popularmente como mosca-varejeira por sua coloração metálica que pode variar de uma tonalidade mais azulada até um tom mais esverdeado (Pape et al. 2004). No Brasil são registradas cerca de 40 espécies de califorídeos (Mello 2003), sendo três do gênero *Chrysomya*: *C. megacephala* (Fabricius 1794), *C. albiceps* (Wiedemann 1819) e *C. putoria* (Wiedemann 1818) (Baumgartner & Greenberg 1984).

Chrysomya megacephala é uma espécie cosmopolita e estudos mostram que é amplamente distribuída no sudeste da Ásia e frequentemente relatada no Oriente Médio, China, Coreia e Japão (Akbarzadeh et al. 2015). É relatado estar presente no Extremo Oriente Russo, Egito, Afeganistão, Sibéria Oriental, África e Austrália (Zumpt 1965). Na Europa foi relatada pela primeira vez na Espanha, depois em Portugal, em Malta, nas Ilhas Canárias, Madeira, em várias áreas nos Estados Unidos, México, Costa Rica, e Argentina (Taleb et al. 2018). No Brasil, *C. megacephala* foi relatado pela primeira vez por Guimarães et al. (1978) em São Paulo e posteriormente, vários estados relataram a sua presença e mais recentemente, foi relatada na Ilha de Fernando de Noronha (Carmo & Vasconcelos 2014).

1.1.2 Ciclo biológico

O ciclo biológico de *C. megacephala* é do tipo holometábolo com quatro estágios de desenvolvimento (ovos-larvas-pupas-adultos) (Fig. 1). O tempo de desenvolvimento de ovo a adulto varia de um a dois meses (Gabre et al. 2005, Barros-Cordeiro & Pujol-Luz 2010). Os adultos alimentam de exsudato de feridas, matéria orgânica e vegetal, bactérias e partículas em suspensão. A fêmea faz oviposição em locais contendo qualquer tipo de matéria orgânica em

decomposição como carcaças e cadáveres recentes, vegetação aquática ou terrestre e que estejam preferencialmente localizados em ambientes abrigados de luz solar (Greenberg et al. 1990). Os ovos precisam ser incubados por 12 a 15 horas a 26°C até a eclosão das larvas que se desenvolvem passando por três estádios. O primeiro estádio (L1) eclode dos ovos e faz a ecdise para a larva de segundo estádio (L2) após 16 a 18 horas, a L2 faz a última ecdise após 34 a 36 horas para a L3, que permanece nessa fase por mais 70 a 74 horas (Queiroz et al. 1997, Barros-Cordeiro & Pujol-Luz 2010). Esse período larval é o mais crítico durante o ciclo biológico, pois a quantidade de alimento disponível, a oxigenação, a temperatura, a luminosidade, a competição interespecífica pelo alimento e o canibalismo são fatores que influenciam no tamanho dos adultos, na sobrevivência e na reprodução da espécie (Queiroz et al. 1997, Faria et al. 1999, Queiroz et al. 2007). Quando as L3 estão completamente desenvolvidas, migram para o solo e se enterram para formar a pupa (Reigada & Godoy 2006, Barros-Cordeiro & Pujol-Luz 2010). O estágio de pupa dura em média oito dias até a emergência dos adultos (Baumgartner & Greenberg 1984, Ribeiro & Milward-de-Azevedo 1997, Barbosa et al. 2004, Sousa et al. 2010). Os adultos, após a emergência, sobrevivem por mais de um mês dependendo das condições ambientais a que são submetidos e a disponibilidade de alimento (Wells & Kurahashi 1994, Gabre et al. 2005).

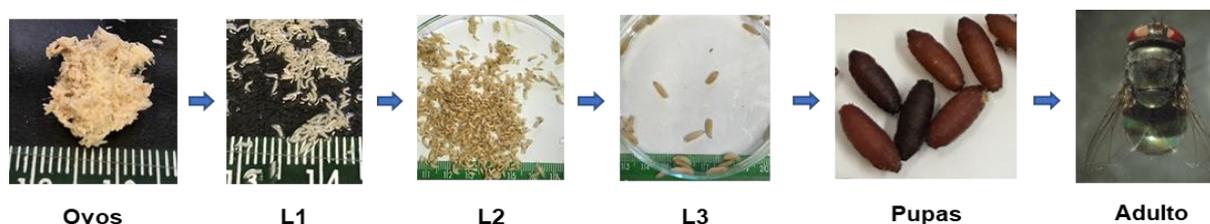


Figura 1: Estágios de desenvolvimento ao longo do ciclo biológico de *C. megacephala*. Fonte: arquivo pessoal.

1.1.3 Importância médica e veterinária

Chrysomya megacephala apresenta grande diversidade ecológica, ocupando diferentes habitats como: ambientes urbanos (depósitos de lixos urbanos e hospitalares, açougues, frigoríficos, fezes, carcaças e cadáveres) e ambientes rurais (fossas sépticas, fezes e carcaças) (Zumpt et al. 1965). A importância para a saúde pública está relacionada ao fato de os adultos serem sinantrópicos (Baumgartner & Greenberg 1984, Guimaraes et al. 1978, Zumpt et al. 1965) e responsáveis por transportarem vários microrganismos em diferentes partes do corpo,

atuando, dessa forma, como vetores mecânicos de agentes patogênicos, como enterovírus, enterobactérias, esporos de fungos, cistos de protozoários, ovos e larvas de helmintos (Greenberg & Klowden 1972, Furlanetto et al. 1984, Lindsay et al. 2012). As larvas, que são necrobiotófagas, estão entre os principais dípteros associados ao processo de decomposição da matéria orgânica, à formação de miíases secundárias e à aplicação de terapia larval em humanos e animais devido á capacidade de se alimentar de bactérias e controlá-las (Nuorteva et al. 1977, Morrison 2010).

1.1.4 Morfologia do tubo digestivo de larvas de terceiro estágio e adultos

De forma geral, o intestino dos insetos é dividido em três regiões morfológicamente distintas, sendo, o intestino anterior (IA), intestino médio (IM) e posterior (IP) (Chapman 1998).

O IA consiste em boca, cavidade oral (onde as glândulas salivares desembocam), um par de mandíbulas (no caso das larvas), faringe, esôfago, divertículo e proventrículo, sendo IA envolvida com a ingestão, condução e armazenamento de alimento (Terra & Ferreira 1994, Chapman 1998).

Em *C. megacephala*, a glândula salivar das L3 é maior em comprimento e largura do que nos adultos, é lisa e ligeiramente encurvada (Fig. 2A), o que sugere grande transformação anatômica durante a metamorfose para a forma adulta (Boonsriwong et al. 2011). Resultados semelhantes a esses já foram observados em L3 de *Calliphora vicina* (Greenberg & Kunich 2002) e primeiro estágio de *Dermatobia hominis* (mosca berneira) (Evangelista & Leite 2005). Nos adultos de *C. megacephala*, machos e fêmeas, segundo Boonsriwong et al. (2011), a glândula salivar possui um formato tubular longo, enrolado e estreito (Fig. 2B), semelhante aos adultos de *Musca domestica* e *C. vicina* (Rotte et al. 2008).

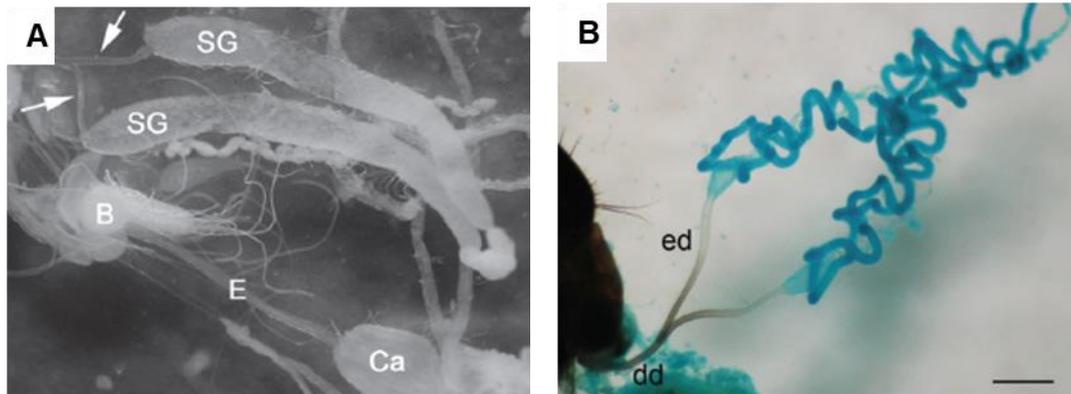


Figura 2 - Glândula salivar de *C. megacephala*. (A) larva de terceiro estágio: as setas brancas destacam a bifurcação do delicado ducto deferente, (SG) glândulas salivares, (B) cérebro, (E) esôfago e (Ca) cárdia. (B) adulto: glândulas tubulares enroladas que se conectam em dois ductos eferentes (ed) longos e estreitos conectados a um ducto deferente (dd). Adaptado de Boonsriwong et al. (2012).

Outras diferenças estruturais também já foram observadas nas glândulas salivares das L3 em relação aos adultos, como a ausência de uma cutícula espessa que envolve toda a glândula salivar (Boonsriwong et al. 2012). Essa diferença também foi observada por Riparbelli et al. (1996) em *Ceratitis capitata* (mosca das frutas do mediterrâneo) e foi sugerido que as glândulas larvais são histolizadas (autodigeridas) durante a metamorfose e nos adultos a presença da cutícula espessa situada entre a junção do ducto e a glândula reflete a adaptação à diferença no comportamento alimentar entre L3 e adultos, como anteriormente descrito em *D. hominis* (Evangelista & Leite 2007). Boonsriwong et al. (2012) demonstraram que as L3 de *C. megacephala* apresentam muitas ramificações traqueais, o que sugere o fornecimento de grande quantidade de oxigênio, semelhante às descrições da glândula salivar em larvas de *D. hominis* (Evangelista & Leite 2005). O autor sugere que a abundância de mitocôndrias, retículo endoplasmático rugoso e grande aporte de oxigênio, indica, portanto, uma alta atividade metabólica da glândula salivar em *C. megacephala* (Boonsriwong et al. 2012). Boonsriwong et al. (2012) demonstraram em estudo ultraestrutural, que as glândulas salivares de adultos de *C. megacephala* possuem vários reservatórios para secreção (Fig. 3), principalmente de enzimas, e que investigações moleculares são necessárias para identificar esses produtos secretórios.

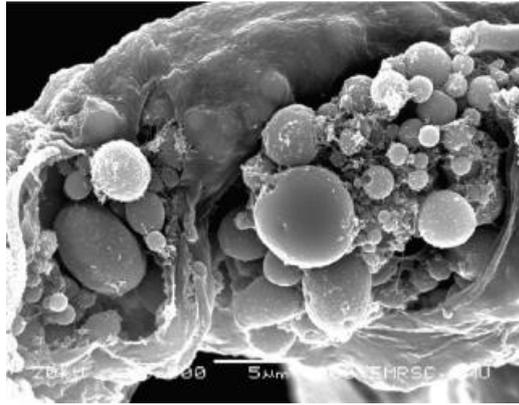


Figura 3 - Glândula salivar de adulto de *C. megacephala* rompida e exibindo numerosas vesículas arredondadas que provavelmente são grânulos secretores. Adaptado de Boonsriwong et al. (2012).

A faringe é um tubo simples e reto, relacionado com a ingestão de alimentos e possui uma musculatura bem desenvolvida conectada ao esôfago e ao divertículo (Terra & Ferreira 1994, Chapman 1998). O divertículo é um órgão de armazenamento que possui uma cutícula impermeável a moléculas hidrofílicas e é por onde o alimento passa lentamente para o IM, onde ocorre a digestão e absorção dos nutrientes (Tang & Ward 1998, Gontijo et al. 1998).

Em L3 de *C. megacephala*, após o cárdia, aparecem os cecos gástricos que são estruturas formadas por quatro tubos de extremidade cega (Fig. 4) e que nos adultos não é observada. É possível que a área de superfície aumentada fornecida por este órgão é desnecessária para a sobrevivência dos adultos, mas pode ser essencial para o estágio larval (Boonsriwong et al. 2006). A região do cárdia, posterior ao esôfago, é em formato de bulbo e conecta duas regiões, o IA e o Intestino Médio Anterior (IMA) (Boonsriwong et al. 2006). O IM é dividido em IMA, IMM e o IMP.

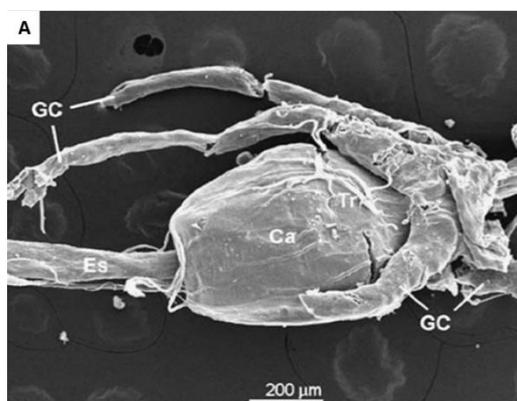


Figura 4. Intestino anterior da larva de terceiro estágio de *C. megacephala*. Algumas estruturas que compõe o intestino anterior das larvas: região cárdia semelhante a um bulbo (Ca) entre o esôfago (Es) e quatro cecos gástricos (GC). As traqueiolas semelhantes a fios (Tr) são visíveis na superfície. Adaptado de Boonsriwong et al. (2006).

O IM é a porção mais dilatada do intestino das L3 e nessa região ocorre a produção e secreção de enzimas, além de absorção dos nutrientes, sendo uma região na qual se pode observar a presença da membrana peritrófica e a inserção dos túbulos de Malpighi na sua superfície externa. A membrana peritrófica é responsável por selecionar as partículas que transitam entre os dois compartimentos, o espaço endoperitrófico (dentro da membrana peritrófica) e o espaço ectoperitrófico (fora da membrana peritrófica) (Terra & Ferreira 1994, Lehane 1997, Boonsriwong et al. 2006).

Os intestinos dos machos e fêmeas de *C. megacephala* são similares morfológicamente e no tamanho, medindo, em média, 36,23 mm e 37,73 mm desde a boca até o reto (excluindo todas as glândulas anexas, salivares e túbulos de Malpighi). Entretanto, o intestino dos adultos (Fig. 5B) é consideravelmente menor do que o observado nas L3 (Fig. 5A) que mede aproximadamente 89,15 mm (Boonsriwong et al. 2011).

Análises morfométricas de *C. megacephala* indicaram claramente que o IM é a porção mais longa do intestino das larvas e adultos, medindo 46,55 mm e 25,00 mm, respectivamente, e ocupando cerca de metade a dois terços de todo o comprimento do intestino (Boonsriwong et al. 2011, Boonsriwong et al. 2012).

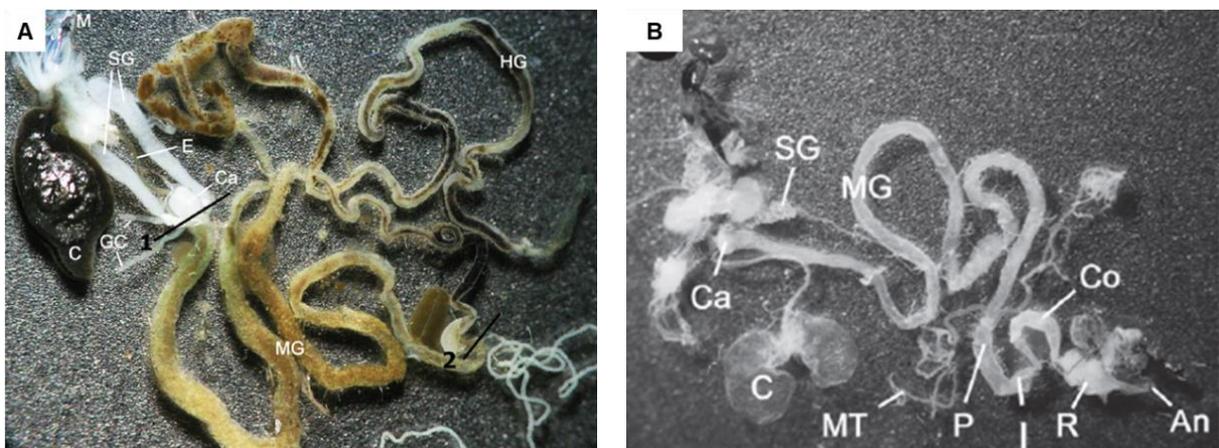


Figura 5. Intestino de *C. megacephala*. (A) larvas terceiro estágio: (M) boca, (SG) Glândula salivar, (C) divertículo, (Ca) cárdia, (E) esôfago, (GC) ceco gástrico, (MG) intestino médio, (HG) intestino posterior. (B) Adultos: (SG) glândula salivar, (Ca) cárdia, (C) divertículo, (MG) intestino médio, (MT) túbulos de Malpighi, (P) piloro, (I) íleo, (Co) cólon, (R) reto e (An) ânus. Adaptado de Boonsriwong et al. (2011).

O IP é composto por piloro, íleo, cólon, reto e ânus, sendo responsável pela excreção de resíduos oriundos do IM. O piloro é a estrutura que divide a região do IM da região do IP e o íleo é um tubo estreito que liga o piloro ao reto e, na sua porção final, o intestino se expande formando o reto. Como a cutícula do IP é muito fina, esta região se difere do IA por ser permeável à água e alguns íons (Chapman 1998, Terra & Ferreira 1994, Boonsriwong et al. 2006). O IP e o reto são marcadamente diferentes entre a L3 e adultos de *C. megacephala*. Na larva, o reto parece ser simplesmente um tubo longo e fino, enquanto nos adultos, machos e fêmeas o reto é uma estrutura muscular em forma de cone. A aparência do reto no adulto de *C. megacephala* é comparável ao do adulto da mosca de fruta, *Bactocera papayae* (Khoo & Tan 2005).

1.2 pH intestinal dos dípteros

Devido a importância do intestino e do pH para a sobrevivência dos insetos, muitos pesquisadores vem estudando fisiologia e bioquímica intestinal (Santos et al. 2008, Santos et al. 2011, Boonsriwong et al. 2012, Nepomuceno et al. 2017, Barroso et al. 2019). Entretanto, a maioria dos estudos relacionados a pH intestinal e atividade enzimática avaliaram dípteros hematófagos de importância médica, saúde pública e veterinária como: *Aedes aegypti*, *Culex pipiens* e *Anopheles stephensi* (Dadd 1975, Nepomuceno et al. 2017) e *Lutzomyia longipalpis* (Santos et al. 2008, Santos et al. 2011)

Até o momento, os estudos sobre o pH intestinal em fêmeas em *L. longipalpis* mostraram que, sem repasto sanguíneo, os valores do pH nas duas porções do intestino médio (torácico e abdominal) se mantêm entre 5,5 e 6,0 (Gontijo et al. 1998). Recentemente, Nepomuceno et al. (2017) demonstraram que *Aedes aegypti* (Diptera: Nematocera) tem um padrão de manutenção do pH intestinal semelhante ao de *L. longipalpis*. Também já foi observado por Santos et al. (2008) que a ingestão de soluções tampão como o MES em pH 5,0 e o HEPES em pH 7,5 não são capazes de alterar o pH do IM de *L. longipalpis*.

Na subordem Brachycera, existem poucos trabalhos na literatura relacionados ao pH intestinal e atividade enzimática, principalmente nos adultos, sendo as L3 de *M. domestica* a referência para outros estudos. Nas L3 de *M. domestica* já foi demonstrado a variação do pH ao longo do intestino, sendo alcalino nas regiões do IMA e IMP com pH 6,1 e 6,8, respectivamente, e o IMM sendo a região mais ácida com pH 3,1 (Espinoza-Fuentes & Terra 1987, Terra & Regel 1995). Em larvas de mosquitos *C. pipiens*, *A. aegypti* e *Anopheles stephensi* já foi demonstrado por Dadd (1975), através da utilização de corantes vitais indicadores de pH, que o IMA é a

região mais alcalina, chegando a um pH 10,5 e o IMP a um pH 7,0. De modo geral, as larvas detritívoras dos dípteros Nematocera possuem o IMM alcalino variando de 8,0 a 10,5 (Undeen 1979, Sharma et al. 1984, Terra et al. 1979, Vale et al. 2007). Vale et al. (2007) demonstraram que larvas de *L. longipalpis* apresentam um gradiente de pH ≥ 9 no IMA a 6,5-7,0 no IMP.

Um modelo detalhado que explica os mecanismos de alcalinização no IM das L3 ainda não foi proposto, porém algumas moléculas têm sido responsabilizadas por este fenômeno. Barroso et al. (2019) estudaram o intestino de L3 de *M. domestica* utilizando micro eletrodos, corante vital Vermelho Congo e sequências de RNA e verificaram que a acidificação do IMM é afetada diretamente pela troca de Na^+/H^+ e indiretamente por uma proteína envolvida na homeostase do cobre. A alcalinização do IMP resulta da ação de um transportador de NH_3 e transportador de peptídeo acoplado a H^+ , principalmente em uma dieta rica em peptídeos livres.

1.3 Endoproteases intestinais em dípteros

Em geral, a digestão nos insetos pode ocorrer ao longo de todo o tubo digestivo, mas é no IM que a maior parte das hidrolases estão presentes e onde o alimento é absorvido (Chapman 1988). Essas enzimas são responsáveis pela quebra de polímeros, como proteínas, carboidratos e lipídeos. As proteases participam na digestão inicial (polímeros maiores), digestão intermediária (oligômeros) e na digestão final (dímeros e pequenos oligômeros) (Terra 1990).

As proteases podem ser classificadas quanto a posição da cadeia polipeptídica a ser clivada (Fig. 6). As endoproteases tem especificidade por atuar na região interna da cadeia, enquanto as exoproteases atuam exclusivamente nas extremidades amino (N) terminal ou carboxi (C) terminal. As proteases que atuam na região (N) terminal livre liberando um único resíduo de aminoácido são denominadas aminopeptidases e as carboxipeptidases atuam na região (C) terminal livre, liberando também um único resíduo de aminoácido. Por fim, as dipeptidases, são exopeptidases que atuam apenas em dipeptídeos, liberando dois aminoácidos (Barrett 1994).

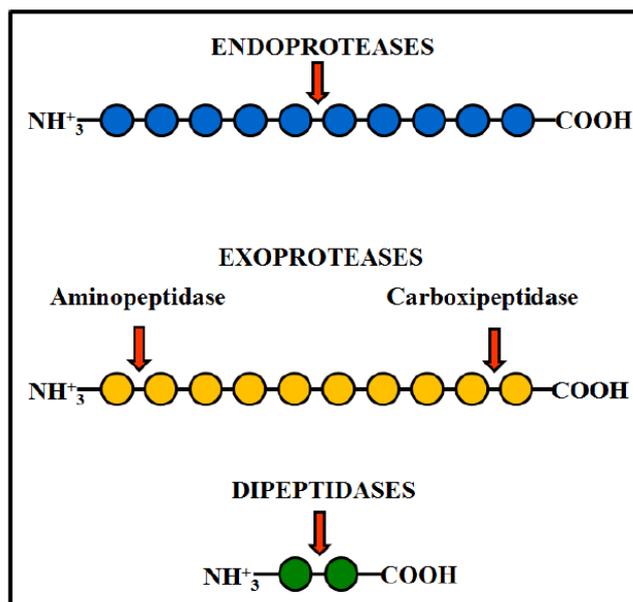


Figura 6 – Representação esquemática da atuação de endoproteases e exoproteases. Adaptado de Barrett, 1994.

Em dípteros Nematocera, Yang & Davies (1971) demonstraram que em fêmeas de *A. aegypti* após a hematofagia, as endoproteases como tripsina aumentam gradativamente e a quimotripsina praticamente não demonstrou atividade. Briegel & Lea (1975) também demonstraram em adultos *A. aegypti*, que a quimotripsina apresenta níveis baixos e que a tripsina é responsável por 75% da digestão das proteínas.

Em larvas de *A. aegypti*, *C. pipiens* e *A. stephensi*, o pH do IM é alcalino e variando entre 10,0 e 12,0. Um pH ótimo para atividade proteolítica de tripsina e quimotripsina (Dadd 1975), com a atividade sempre maior no conteúdo intestinal do que na mucosa intestinal, demonstrando que as enzimas são solúveis (Briegel & Lea 1975). Resultado semelhante foi obtido em larvas de *L. longipalpis* por Vale et al. (2007), que observaram atividade de tripsina e quimotripsina no IMA e aminopeptidases no IMP. Os autores concluíram que as proteínas são digeridas em peptídeos no IMA dentro do espaço endoperitrófico e posteriormente, esses peptídeos são processados no espaço ectoperitrófico do IMP.

Todos os insetos possuem diversidade de enzimas proteolíticas como um dos principais componentes do processo digestivo, sendo as endoproteases as enzimas proteolíticas mais dominantes (Terra & Ferreira 1994, Terra et al. 1996). A atividade proteolítica foi caracterizada pela primeira vez em *Stomoxys calcitrans* utilizando azoalbumina e azocaseína em pH 7,9 e 7,8, respectivamente, e a tripsina foi a protease que mostrou hidrólise máxima (Houseman et al. 1987). Posteriormente, devido a importância das enzimas proteolíticas e sua dependência de

um pH específico para hidrolisar as proteínas, diversos estudos foram realizados com diferentes ordens de insetos como Coleoptera, Orthoptera, Lepidoptera e Diptera (Terra & Ferreira 1994). Em *M. domestica*, Tamaki et al. (2012) constataram que L3 possuem quimotripsina no IM. Os autores verificaram que a atividade da quimotripsina solúvel é maior em pH 7,4, sendo liberada por exocitose no IMA e IMP.

Yong et al. (1996) registraram em *L. cuprina*, mosca causadora de miíase facultativa, a atividade proteolítica capaz de degradar a pele de ovelhas e que a maioria dessas proteases são da classe das endoproteases. Muharsini et al. (2000), em *C. bezziana*, demonstraram que a atividade de tripsina é ótima entre pH 6,5 a 9,5, para quimotripsina o pH 5,0 a 9,5 e com maior atividade nas regiões do IMA e IMP. Em outra mosca causadora de miíase obrigatória, *Oestrus ovis*, cujas larvas colonizam a cavidade nasal de ovinos e caprinos, foi observado que as enzimas secretadas pelas larvas são capazes de degradar mucina e soroalbumina, proteínas presentes no ambiente inflamado devido à infestação. Surpreendentemente, essas enzimas foram capazes também de degradar IgG (muitas vezes resistentes a degradação proteolítica), o que poderia ser um mecanismo de escape contra o sistema imune do hospedeiro (Tabouret et al. 2003).

1.4 Lisozimas intestinais em dípteros

Lisozimas são enzimas encontradas em animais, plantas, bactérias, insetos e podem ser classificadas em seis tipos baseados na diferença na sequência de aminoácidos e em propriedades bioquímicas: sendo a lisozima de tipo frango (tipo C), lisozima do tipo ganso (tipo G), lisozima vegetal, lisozima bacteriana, lisozima do fago T4 (tipo fago) e lisozima de invertebrados (tipo I) (Hikima et al. 2003).

Em insetos, há escassez de estudos em relação às lisozimas e suas funções, mas já foram descritos três tipos: I, C e G. A principal função dessas enzimas é a capacidade de catalisar a hidrólise da ligação beta (1->4) entre uma N-acetilglicosamina e um ácido N-acetilmurâmico (Fig. 7) (Jolles & Jolles 1984, Zhao et al. 2010). Devido à atividade em substrato bacteriano, algumas lisozimas hidrolisam ligações β -N-acetilglicosaminas da quitina, mostrando atividade de quitinase, conferindo atividade antimicótica, além de possuir papel importante para a manutenção da resposta imunológica inata e função digestiva do inseto (Jolles & Jolles 1984, Zhao et al 2010)

Lemos et al. (1993) descobriram duas lisozimas com as mesmas propriedades cinéticas enzimáticas a partir de extrato homogeneizado do IM de L3 de *M. domestica* e demonstraram que as lisozimas foram resistentes a um tipo de catepsina D presente no IM, apresentaram atividade de quitinase e foram secretadas principalmente pelas vesículas na superfície externa das microvilosidades de células do IMA e atuaram em um pH ótimo de 4,5 a 6,5 no IM, de maneira semelhante às lisozimas de ruminantes. Resultados semelhantes foram obtidos por Ito et al. (1995) com homogeneizados do corpo das L3 de *M. domestica* que verificaram que a lisozima não possui efeito lítico contra o *Micrococcus luteus* em pH 7,0, pois para a enzima ter um perfil de atividade lítica, ela depende de um pH ácido ótimo em torno de 5,0. Portanto, os autores sugerem que as propriedades enzimáticas dessa lisozima são semelhantes às lisozimas do estômago de ruminantes e diferentes das enzimas convencionais de humanos e aves que atuam em pH entre 5,0 e 8,5.

No entanto, mais tarde foi descoberto por Ren et al. (2008) que a lisozima de *M. domestica*, além da função digestiva, tem papel importante no sistema imunológico inato, atuando como agente antimicrobiano em bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli*) e Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*). Os autores observaram que a lisozima de mosca é mais expressa no IM que no tecido adiposo e hemolinfa de adultos e níveis reduzidos foram verificados desde o primeiro estágio de larva até o estágio de pupa. Resultados semelhantes foram obtidos por Cançado et al. (2008) que descobriram uma nova lisozima, chamada de MdL2 (lisozima do tipo 2 de *M. domestica*), no IM de L3 de *M. domestica*, verificando a atividade lítica sobre *Micrococcus lysodeikticus* e em um pH ótimo ácido pH 4,9.

Diante dessas informações, é percebido que vários fatores influenciam a atividade das lisozimas nos insetos, como o pH, o tipo de membrana da bactéria, a região do corpo e o gênero do inseto (Ito et al. 1995, Cançado et al. 2008). Além desses fatores, Nayduch & Joyner (2013) atribuem que a produção da lisozima é regulada por um mecanismo de controle pós-transcricional e a expressão seja constitutiva no nível de mRNA, implicando em uma defesa em todos os estágios evolutivos de *M. domestica* induzidos pela alimentação de *S. aureus*.

Wang et al. (2018) reportaram que a lisozima encontrada tipicamente em invertebrados não é estudada quanto as lisozimas do tipo C presentes em mamíferos, sugerindo que as lisozimas de invertebrados poderiam ter funções ainda não determinadas.

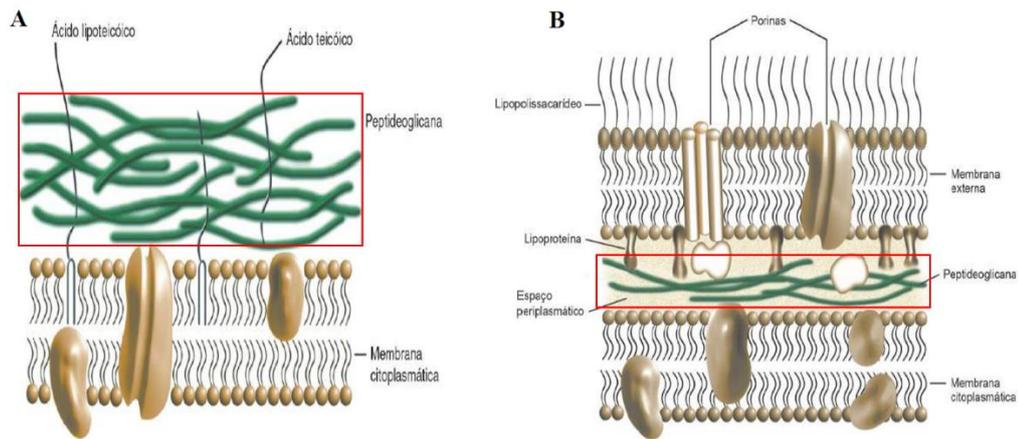


Figura 7. Esquema da parede celular bacteriana. (A) Bactérias Gram-positivas e (B) Bactérias Gram-negativas. Adaptado: Vermelho e Bastos, 2007. Linhas vermelhas indicam a camada de peptidoglicano onde a lisozima causa a hidrólise.

1.5 Catalase intestinal em insetos

A catalase (CAT) é uma enzima que pertence à subclasse das enzimas oxidorreduzidas que usam o peróxido de hidrogênio como receptor e doador de elétrons e, portanto, é uma peroxidase (Grigoras 2017, Heit et al. 2017, Inanan et al. 2018, No Lee et al. 2018). Existe uma variedade de enzimas oxidativas que irão decompor espécies reativas de oxigênio. Superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX), glutatona redutase (GSH), glutatona peroxidase (GPx) peroxiredoxina (Prx), CAT e polifenol oxidase (PPO) são exemplos de enzimas oxidativas que irão decompor espécies reativas de oxigênio (Mittler 2002).

Nos seres vivos, CAT, SOD e GPx são enzimas responsáveis por bloquear as reações em cadeia dos radicais livres produzidos e atuar nos mecanismos de defesa críticos que previnem as modificações oxidativas de DNA, proteínas e lipídios. Assim, a CAT participa da reação de dismutação do peróxido de hidrogênio (um composto prejudicial para as células vivas) para oxigênio e água (Grigoras 2017).

Um dos primeiros estudos para avaliar o papel das enzimas oxidativas foi realizado por Peterkofsky & Prather (1977) em fibroblastos de galinhas, humanos e camundongos, cultivados com ascorbato de sódio (AS). Nesse estudo, ficou comprovado que as células incubadas com AS, a partir de 4 e 6 horas, aumentam o tamanho e se separam e, após 24 horas, são lisadas. Mas quando essas células foram cultivadas com adição de CAT no meio de cultura, o efeito letal para as células foi inibido por reações que degradam o H_2O_2 . Para confirmar tal hipótese, as mesmas células foram incubadas com H_2O_2 nas concentrações de 0,05 mM e o efeito na morfologia celular foi idêntico ao do AS. Os autores sugerem com esses resultados que muitos

tipos celulares não têm níveis intracelulares suficientes para degradar toda quantidade de H_2O_2 formado e que a GPx também pode degradar H_2O_2 como demonstrado nos eritrócitos humano. Davison et al. (1986) constataram que o ascorbato é oxidado para produzir H_2O_2 e semideidroascorbato, e que os altos níveis de H_2O_2 podem rapidamente causar morte celular, e devem ser neutralizados pela CAT, resultando em moléculas inócuas de água e oxigênio.

Diante dessas descobertas relacionadas ao papel das enzimas oxidativas na sobrevivência das células, a área da entomologia também vem estudando o papel dessas enzimas em diferentes artrópodes hematófagos para tentar compreender os mecanismos que controlam o estresse oxidativo no intestino. Durante a alimentação dos artrópodes hematófagos, a hemoglobina é degradada e grandes quantidades de heme são liberadas após a digestão (Graça-Souza et al, 2006). O heme estimula a peroxidação de lipídeos, que culmina com maior produção e liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Tappel 1955). Diante disso, a detoxificação de grupamentos heme e do excesso de ROS é de extrema importância para insetos hematófagos (Oliveira et al. 1999, Paes et al. 2001).

Em *Rhodnius prolixus* foi demonstrado que tanto a CAT como a SOD possuem sua expressão aumentada em células do intestino dos insetos durante a digestão de sangue (Paes et al. 2001). Em carrapatos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, Citelliet et al. (2007) confirmaram a importância da CAT na sobrevivência dos espécimes realizando o silenciamento específico da CAT por RNAi e demonstrando que o acúmulo de H_2O_2 no epitélio intestinal reduz a sobrevivência. A importância da CAT no controle de ROS no intestino médio de *A. aegypti* e na competência vetorial para infecções arbovirais como Dengue e Zika também já foi estudada por Oliveira et al. (2017). O estudo mostrou que o silenciamento da CAT no IM dos adultos de *A. aegypti* após a ingestão de sangue reduziu a atividade enzimática da CAT no epitélio do IMM e, conseqüentemente, aumentou a produção de H_2O_2 , reduzindo a fecundidade e a expectativa de vida quando os mosquitos foram alimentados com H_2O_2 . Sobre a capacidade vetorial, o silenciamento da CAT reduziu a infecção dos mosquitos para o vírus da Dengue, mas não para a Zika.

Alternativas “naturais” aos inseticidas para o controle dos insetos também vem sendo estudadas e foi mostrado por Mc Dermott et al. (2019) que o AS encontrado naturalmente em frutas e vegetais em concentrações superiores a 8% reduziram significativamente a sobrevivência de vários dípteros adultos estudados como: *A. aegypti*, *A. stephensi* e *L. longipalpis* ao longo de 10 dias em comparação com controles alimentados com sacarose.

Paralelamente a esse resultado, também foi observado que os mosquitos expostos a AS exibiram elevados níveis de CAT e morte celular.

2. JUSTIFICATIVA

C. megacephala tem estreita relação com humanos e animais, e são consideradas importantes por serem potenciais causadores de míases e atuarem como vetores de vírus, bactérias, protozoários e helmintos. Além disso, os estádios larvais realizam a decomposição de cadáveres e na medicina humana e veterinária, são utilizadas para auxiliar no tratamento de feridas crônicas com difícil cicatrização e nos casos de resistência a antibioticoterapia. Todos esses eventos dependem do trato intestinal, visto que é o meio de comunicação com o ambiente externo e o órgão responsável pela digestão. Sabe-se também que o pH intestinal é importante para manutenção e adequado funcionamento das enzimas digestivas que auxiliam na aquisição de nutrientes da dieta. Diante do exposto, entender a fisiologia do trato digestório de larvas e adultos pode fornecer conhecimentos que influenciem na sobrevivência, reprodução e na capacidade de patógenos colonizarem o intestino. Considerando a importância do sistema digestivo desses insetos e carência de estudos fisiológicos, faz-se necessário o estudo da fisiologia da glândula salivar e do intestino de larvas de terceiro estágio e adultos de *C. megacephala*.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Estudar a fisiologia da glândula salivar e do intestino de larvas de terceiro estágio e adultos de *C. megacephala*.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar a massa corporal de *C. megacephala* do primeiro estágio larval até a emergência dos adultos.
- ✓ Avaliar a duração de cada estágio e estágio larval de *C. megacephala*
- ✓ Avaliar o desenvolvimento (tamanho e conteúdo proteico) da glândula salivar das larvas de terceiro estágio de *C. megacephala*.
- ✓ Medir o fluxo intestinal em larvas de terceiro estágio dessa mosca.
- ✓ Analisar o comprimento do intestino de larvas de terceiro estágio e adultos de *C. megacephala*.
- ✓ Descrever o pH nas diferentes regiões do intestino de larvas de terceiro estágio e adultos *C. megacephala*.
- ✓ Detectar e quantificar a atividade de endoproteases no intestino de larvas de terceiro estágio e adultos de *C. megacephala*.
- ✓ Detectar e quantificar a atividade de lisozima no intestino de larvas de terceiro estágio e adultos de *C. megacephala*.
- ✓ Analisar e quantificar a atividade de catalase no intestino de larvas de terceiro estágio e adultos de *C. megacephala*.
- ✓ Verificar e quantificar a atividade de catalase nas diferentes regiões do intestino de larvas de terceiro estágio e adultos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Coleta dos espécimes de *C. megacephala*

Os exemplares adultos de *C. megacephala* foram coletados com um puçá na parte da manhã, próximo ao canil do Instituto de Ciências Biológicas (ICB), utilizando 200 gramas de isca de frango em início de decomposição, após 24 horas de exposição à temperatura ambiente conforme Marcondes (2006). Após as coletas, os espécimes foram armazenados em frascos com a boca vedada com malha fina e encaminhados ao laboratório de Fisiologia Insetos Hematófagos (LFIH) para a quantificação e identificação (Mc Alpine et al. 1981, Erzinclioglu 1985, Queiroz *et al.* 1997) e para a formação da colônia utilizada no estudo.

4.2 Formação e manutenção da colônia de *C. megacephala* em condições de laboratório

Após a quantificação e identificação da espécie, iniciou-se a formação da colônia no insetário (Fig. 8) do Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos do Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas (ICB) - Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

As moscas foram alocadas em gaiolas feitas com baldes cilíndricos de 29 cm de altura e 30 cm de largura. No balde foram realizadas duas aberturas para facilitar a ventilação e manipulação das moscas, sendo uma abertura na tampa e a outra no centro do balde. Na abertura central foi instalado um cano para permitir a manutenção e higienização da gaiola e dos alimentos. As aberturas foram revestidas com malha para permitir a ventilação e mantidas a 26 °C, fotoperíodo de 12 horas, e umidade de 60%.



Figura 8. Insetário do Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos. Gaiolas de criação das moscas *C. megacephala* mantidas em insetário a 26°C. Fonte: arquivo pessoal.

A manutenção e alimentação dos adultos foi realizada semanalmente utilizando três placas de petri: a primeira, forrada com papel filtro e com um frasco de plástico de 80 mL invertido contendo solução de sacarose saturada, a segunda e a terceira placas contendo 20 gramas de sacarose sólida e ração de peixe moída, respectivamente (Fig. 9A). Também foi colocado junto às placas de petri, 30 g de carne bovina moída (CBM) em decomposição em frascos âmbar como estímulo a oviposição (Fig. 9B) e para o desenvolvimento gonotrófico dos adultos após a emergência das pupas (Von Zuben et al. 2000).

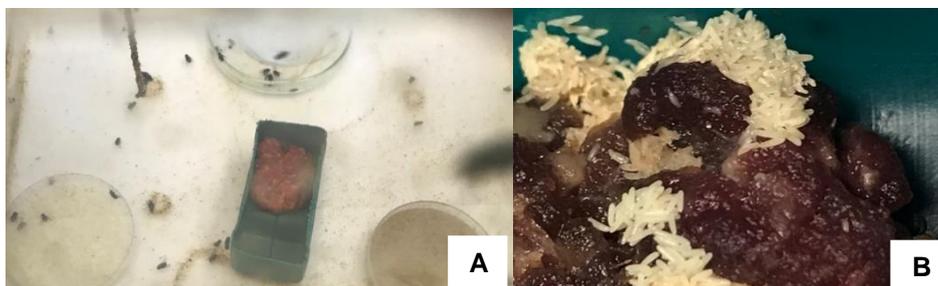


Figura 9. Materiais usados na manutenção da colônia de *C. megacephala*. (A) Dieta fornecida para os adultos nas placas de petri individualmente separadas contendo açúcar e solução de sacarose, e um recipiente com carne bovina moída. (B) Recipiente com carne bovina moída e ovos das moscas. Fonte: arquivo pessoal.

Após a oviposição, a CBM contendo os ovos foram transferidas para outro recipiente de plástico com 10x5x7 cm (Figura 10) com mais 70 g de CBM previamente exposta a temperatura ambiente por 24 horas para alimentação das larvas. Foi utilizada a CBM para a manutenção da colônia segundo Barros-Cordeiro & Pujol-Luz (2010).

Posteriormente, esse recipiente contendo a postura com a CBM (Fig. 9B) foi instalado dentro de outro recipiente também de plástico 30x20x10 (Fig. 10) e transparente, com a tampa telada para permitir a aeração e colaborar com a alimentação das larvas. O recipiente de plástico

contendo as larvas foi mantido em estufa do tipo B.O.D. a 27°C e umidade de 60% até a eclosão dos adultos.

As larvas eclodiram em menos de 24 horas e ingeriram exclusivamente a CBM por aproximadamente cinco dias (Linhares 1988). No terceiro dia de alimentação era adicionado 50 g de CBM em decomposição com a finalidade de evitar competição entre os estádios e para permitir um desenvolvimento homogêneo (Von Zuben et al. 2000 até o empupamento das larvas L3, no fundo do recipiente de plástico forrado por maravalha (Fig. 10).



Figura 10. Recipiente usados para o desenvolvimento de larvas e recuperação de pupas de *C. megacephala*. Os recipientes continham uma tampa telada e maravalha para o empupamento das larvas e recuperação das pupas. Fonte: arquivo pessoal.

As pupas foram obtidas (Fig. 11A) e separadas com auxílio de pinças entomológicas em outro recipiente de plástico transparente (Fig. 11B) e devidamente identificados até a eclosão dos adultos que foram transferidos para as gaiolas de criação.

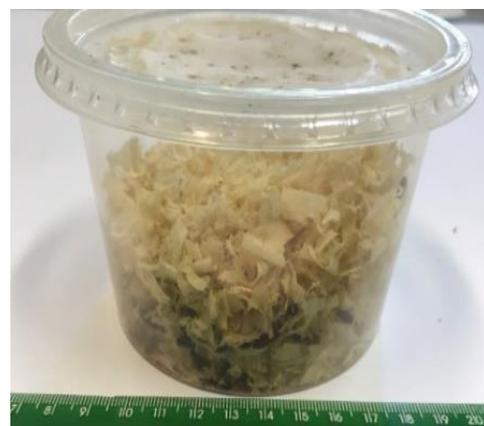
**A****B**

Figura 11. Recuperação das pupas de *C. megacephala* para obtenção dos adultos. Foto (A) Pupas recuperadas após empupação, (B) recipiente de plástico para eclosão dos adultos. Fonte: arquivo pessoal.

4.3 Avaliação da massa de larvas de *C. megacephala* do primeiro estágio até a emergência dos adultos

Foi instalado um frasco de plástico de 80 mL com 30g de CBM previamente exposta a temperatura ambiente dentro da gaiola de criação dos adultos para obter os ovos. Posteriormente, o frasco de plástico com a CBM contendo os ovos foram mantidos em estufa B.O.D. a 27°C para eclosão e desenvolvimento das larvas. Após a eclosão das larvas, 15 espécimes aleatoriamente foram separados em um frasco de 80 mL com 30 g de CBM para o desenvolvimento e com a tampa revestida por malha. Durante os cinco dias de desenvolvimento larval, os espécimes foram pesados em balança eletrônica semi analítica (330 g x 0,001 g) individualmente, dentro de microtubo de polipropileno de 1,5 mL até o empupamento. Com auxílio de pinças entomológicas, as larvas foram retiradas do substrato da CBM e lavadas com solução salina para retirar qualquer matéria orgânica aderida à cutícula e posteriormente foram secadas em papel toalha para garantir que a cutícula ficasse limpa e seca, sem influenciar no peso dos espécimes.

4.4 Duração do desenvolvimento dos estágios de *C. megacephala*

Para avaliar o desenvolvimento dos estágios e estádios, um frasco de plástico de 80 mL com 30g de CBM previamente exposta a temperatura ambiente foi ofertada para os adultos na gaiola de criação para obter os ovos. A carne com os ovos foram transferidos para outro recipiente de plástico com a tampa com malha fina e foram colocados na B.O.D. a 27°C. Na estufa, após a eclosão das L1, foram separadas 15 espécimes de forma aleatória para acompanhar o desenvolvimento até emergência do adulto. Todos os dias às 11:00 da manhã foi realizada a inspeção visual do desenvolvimento dos estádios e estágios.

4.5 Avaliação do desenvolvimento da glândula salivar das larvas de terceiro estágio de *C. megacephala*

Para avaliar o desenvolvimento da glândula salivar nas L3, realizou-se o mesmo procedimento do item 4.4 até a obtenção das L1. Para isso, todos os dias na parte da manhã as larvas foram inspecionadas e no terceiro dia de desenvolvimento larval, quando se encontram no terceiro estágio, 5 espécimes foram coletadas de forma aleatória, diariamente, até o quinto dia de desenvolvimento larval para a dissecação segundo Boonsriwong et al. (2011) para

obtenção das glândulas salivares e avaliação do seu desenvolvimento através de medidas com régua no microscópio estereoscópico.

4.6 Obtenção do Extrato de Glândulas Salivares (EGS) de larvas de terceiro estágio de *C. megacephala*

Para obtenção do EGS, as L3 foram coletadas de forma aleatória nos três diferentes dias de desenvolvimento. Para avaliação do EGS em cada dia de desenvolvimento foram coletadas 5 larvas. Posteriormente as L3 foram lavadas com solução salina e posteriormente secadas com papel toalha para garantir a limpeza da cutícula das larvas. Após esse procedimento as larvas foram dissecadas em solução salina (NaCl 0,9%) com auxílio de estiletos, pinças, tesouras entomológicas e de microscópio estereoscópico segundo (Boonsriwong et al. 2006).

A dissecação foi realizada em placa de petri colocando as L3 na posição dorsal em uma gota de solução salina e antes de iniciar a dissecação o aparato bucal com as mandíbulas e maxilas foram empurrados no sentido caudal até a altura do espiráculo anterior, onde foi realizado um corte transversal utilizando tesoura entomológica. Nessa etapa, grande parte do sistema digestivo sai automaticamente e com a ajuda dos estiletos e das pinças o aparato bucal com a glândula salivar foram separados para facilitar a visualização. É importante segurar a peça bucal com a pinça e com o estilete ir liberando a glândula salivar com muito cuidado para não a romper e sempre utilizando solução salina.

Após obter a glândula salivar, individualmente o material era transferido para um microtubo de polipropileno de 1,5 mL mantido constantemente em gelo, contendo 20 µL de salina 0,9%. Para a obtenção do EGS, o par de glândula salivar foi sonificado por dois minutos até se desfazer por completo e em seguida foi centrifugado a 10.000g por 5 minutos à 5 graus centígrados e o sobrenadante foi coletado e transferido para outro microtubo para realizar a quantificação proteica.

4.7 Quantificação de proteínas nas glândulas salivares das larvas de terceiro estágio de *C. megacephala*

A concentração de proteínas dos extratos de glândula salivar (EGS) obtidos foi determinada pelo método de Bradford (1976) utilizando soro contendo albumina bovina (BSA) em diferentes diluições (testadas em triplicata) para a confecção da curva padrão. A leitura das amostras foi realizada em leitor de micro-placas sob temperatura ambiente e utilizando um comprimento de onda de 595 nm. Na placa de 96 poços, as amostras foram colocadas em triplicata na diluição de 1:100, com o volume final de 20 µL em cada poço.

4.8 Determinação do fluxo intestinal das larvas de terceiro estágio de *C. megacephala*

Com 3 a 4 dias de vida as L3 (n=32) foram separadas em recipientes transparentes contendo 4 g de carne de peixe macerado por 15 minutos para que se alimentassem e o lúmen do intestino adquirisse a coloração branca da carne do peixe. Posteriormente, as larvas foram transferidas com auxílio de uma pinça entomológica para outro recipiente contendo carne de peixe macerada com 2 mg de carvão vegetal ativado em pó misturados até a coloração ficar preto homogêneo, permitindo a visualização do fluxo do alimento no intestino. Esse homogeneizado foi disponibilizado para alimentação das larvas por 15 minutos e acompanhado por inspeção visual até o conteúdo intestinal aproximar da região posterior. Nesse momento, as L3 foram transferidas individualmente com auxílio de pinça para tubos de polipropileno de 1,5 mL (Fig. 12A) para observação no microscópio estereoscópico à eliminação do conteúdo ingerido (Fig. 12B). Os tubos de polipropileno tiveram as tampas furadas para permitir a ventilação. Esse procedimento teve objetivo o aumento do metabolismo durante a alimentação (Boonsriwong et al. 2012). O tempo do fluxo intestinal começou a ser considerado a partir do momento que as larvas ingeriram somente o peixe macerado. Após a excreção conteúdo intestinal, todas as larvas foram dissecadas imediatamente de acordo com o item 4.9 para avaliar o fluxo intestinal de forma macroscópica.

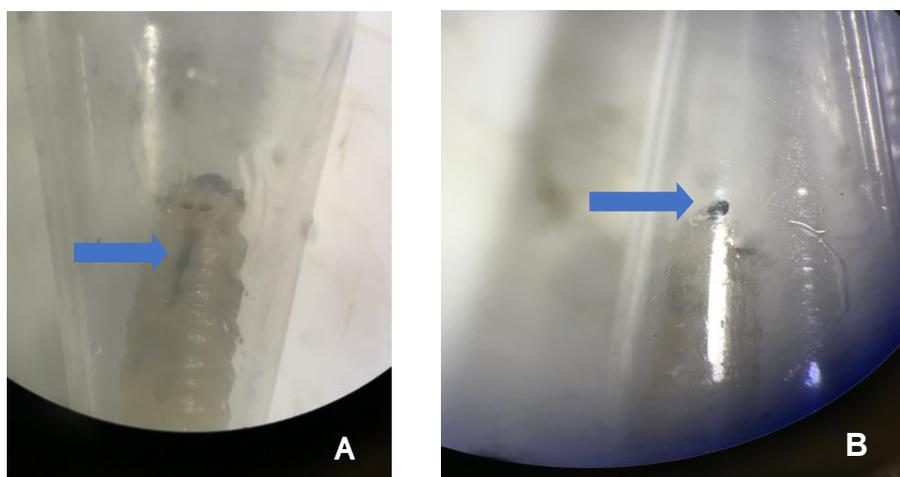


Figura 12. Inspeção do fluxo intestinal das larvas de terceiro estágio de *C. megacephala* dentro dos microtubo de polipropileno de 1,5 mL. As larvas utilizadas tinham 3 a 4 dias de vida e foram alimentadas com carne de peixe macerada e homogeneizada com carvão vegetal ativado em pó. Fonte: arquivo pessoal. (A) Larva individualmente separada em microtubo de polipropileno de 1,5 mL com a região posterior do intestino com conteúdo ingerido (seta azul). (B) Conteúdo ingerido pela larva eliminado e aderido à parede do microtubo de polipropileno de 1,5 mL (seta azul).

4.9 Obtenção dos intestinos das larvas de terceiro estágio e adultos de *C. megacephala*

Utilizando um microscópio estereoscópico (Olympus SZ4045), estiletos, pinças e tesoura entomológica, as larvas e adultos foram dissecados em placa de petri em solução salina 0,9%. Em cada experimento foram utilizados 15 exemplares, sendo as larvas com 3 a 4 dias de vida e os adultos com 10 a 15 dias de vida.

A dissecação das L3 e adultos foram realizadas segundo o método de Boonsriwong et al. (2011) modificando dois aspectos, o sentido da dissecação e colocando os espécimes no freezer antes da dissecação. A dissecação no caso das larvas, iniciou-se pela extremidade anterior com uma incisão no sentido da região posterior e foi adotado pela facilidade da dissecação. O processo de resfriamento rápido por cinco minutos foi realizado para facilitar a dissecação dos espécimes, visto que o resfriamento reduz o metabolismo e relaxa a musculatura.

Para realizar a dissecação das larvas, cada larva foi colocada individualmente na placa de petri na posição dorsal com uma gota de solução salina. Antes de iniciar a dissecação, o aparato bucal com as mandíbulas e maxilas foram empurrados no sentido caudal até a altura do espiráculo anterior onde foi realizado um corte transversal utilizando a tesoura entomológica. Nessa etapa, grande parte do sistema digestivo sai automaticamente. Jatos de solução salina

foram jogados pela ponteira sobre a larva dissecada para auxiliar a liberação do intestino do tecido adiposo. Posteriormente, com auxílio de uma pinça e tesoura entomológica, a cutícula da larva foi cortada cuidadosamente longitudinalmente no sentido caudal até o reto. Nessa última etapa, o sistema digestivo está enrolado e bem aderido ao tecido adiposo e aos escleritos, a dissecação do intestino foi realizada cuidadosamente até a liberação total. Com o intestino livre, o mesmo foi transferido com o estilete para uma lâmina de microscópio contendo uma gota de solução salina, esticado, mensurado com régua e avaliado pelo software Image G.

Para realizar a dissecação dos adultos, os mesmos foram colocados na posição dorsal na placa de petri em uma gota de solução salina e sem cortar as asas, pois essas ajudam o díptero a ficar na posição sem a necessidade de utilizar agulhas entomológicas para fixá-lo. Posteriormente, todas as patas foram cortadas com tesoura entomológica e iniciava-se a dissecação com estiletes e pinças entomológicas realizando um corte transversal no esclerito da região do abdômen para acessar a cavidade abdominal com muito cuidado para não romper o intestino. Em seguida, foi adicionada uma gota de solução salina no interior da cavidade abdominal para manter a hidratação e facilitar a visualização das estruturas internas durante a dissecação. Utilizando a tesoura entomológica foi realizado corte no sentido sagital medial caudal em direção ao reto com muito cuidado e com as pinças entomológicas o intestino foi sendo liberado do tecido adiposo, dos escleritos e desenrolados. Após essa etapa, foi realizada uma secção utilizando a tesoura na altura da cabeça e outra na região posterior circundando o reto para sua liberação. Com o intestino solto da cavidade abdominal e com a ajuda da pinça e estilete, a porção do intestino anterior foi puxada delicadamente no sentido caudal para liberação da cavidade torácica que é muito desenvolvida e ligada aos escleritos endurecidos associados com as pernas e asas, e por fim, o intestino era transferido com o estilete para uma lâmina de microscópio contendo uma gota de solução salina.

4.10 Comprimento intestinal das larvas de terceiro estágio e adultos de *C. megacephala*

Após a obtenção dos intestinos de acordo com o item 4.9, tanto as larvas (Fig.13 A) como os adultos (Fig. 13 B) foram transferidos para uma lâmina de microscópio, esticados com auxílio dos estiletes entomológicos em uma gota de salina e fotografados utilizando uma régua escolar.

Com as imagens dos intestinos fotografadas, foi utilizado o software Image J (Abramoff et al. 2004) para avaliar o comprimento do intestino e das diferentes regiões como demonstrado

pela linha vermelha (FIG. 13 A). Para avaliar o comprimento total do intestino (CTI) das L3 e adultos, o iniciou-se a medida após o cárdia e finalizou na ampola retal (Fig. 13 B).

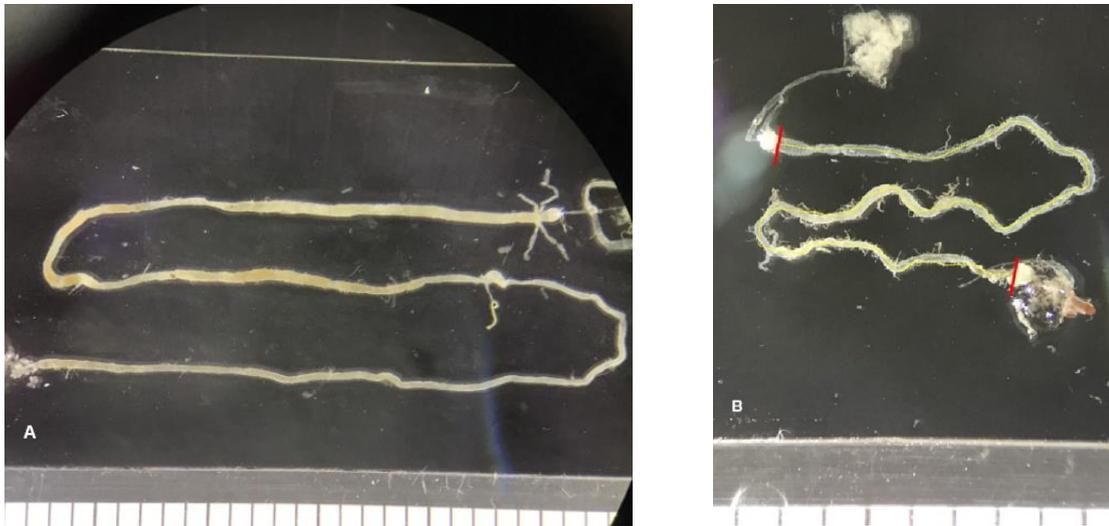


Figura 13 - Intestino de *C. megacephala* dissecado e posicionado para ser medido o comprimento. (A) Larva de terceiro estágio e (B) macho, traços vermelhos indicam a região intestinal medida e linha amarela mediana mostra como foi medido.

4.11 Determinação do pH intestinal

Corantes vitais indicadores de pH foram misturados a 2% (p/p) em carne de peixe macerada segundo Gontijo et al. (1998). Essa mistura tem tonalidade suficientemente clara para permitir a observação da cor assumida pelo corante no interior do intestino. Foram utilizados, separadamente, os seguintes corantes indicadores de pH: azul de bromotimol (AB) (pKa 7,1) (Fig. 14 A), verde de bromocresol (VB) (pKa 4,7) (Fig. 14 B) e púrpura de bromocresol (PP) (pKa 6,3) (Fig. 14 C).



Figura 14. Corantes vitais indicadores de pH utilizados nos experimentos. (A) Azul de bromotimol, (B) Púrpura de bromocresol e (C) Verde de bromocresol misturados à carne de peixe macerada. Fonte: arquivo pessoal.

Para avaliação do pH intestinal das larvas (Fig. 15A) e adultos (Fig. 15B) 15 exemplares de cada estágio foram separados em recipiente de plástico com tampa telada. No fundo do recipiente foi colocado a carne de peixe macerada misturada de forma homogênea ao corante a ser testado. Larvas foram dissecadas após 30 minutos da ingestão e adultos após 24 horas de acordo com o item 4.9 e foram comparados com escalas de cor usadas como padrão (Fig. 16).

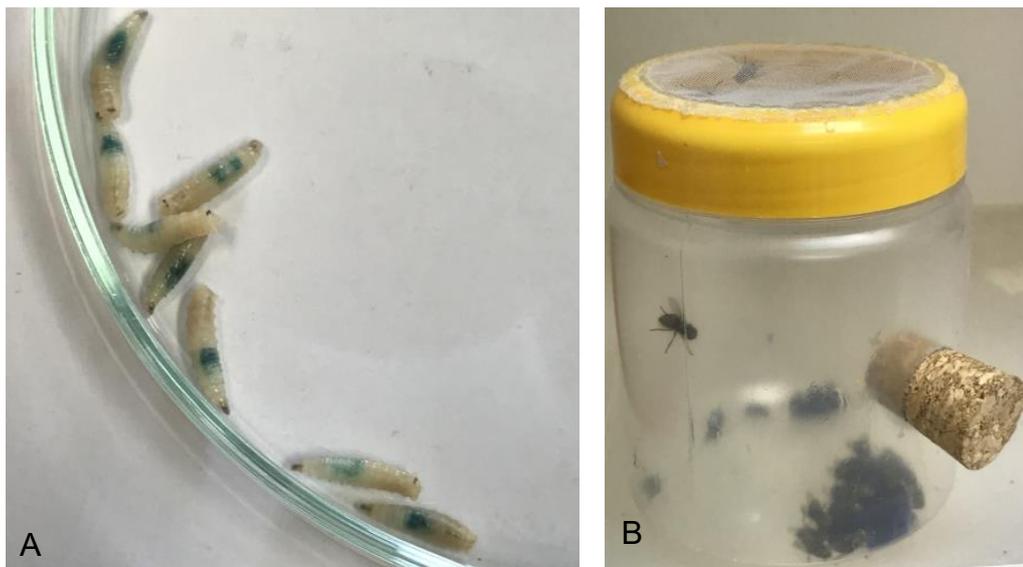


Figura 15. Ingestão de dieta contendo corantes indicadores de PH por larvas e adultos de *C. megacephala*. (A) Larvas de terceiro estágio após ingestão da carne de peixe macerada e homogeneizada com o corante a ser testado por 30 minutos e a coloração adquirida pelo intestino. (B) Recipiente de plástico com tampa telada e com carne de peixe macerada e homogeneizada com o corante a ser testado. Alimentação dos adultos de *C. megacephala* por 24 horas com peixe macerado e o corante a ser testado. Fonte: arquivo pessoal.



Figura 16. Padrões de cores dos corantes vitais indicadores de pH. (A) azul de Bromotimol, (B) verde de bromocresol e (C) púrpura de bromocresol. Os corantes foram utilizados para determinar o pH intestinal das larvas de terceiro estágio e adultos de *C. megacephala* após alimentação com peixe moído.

4.12 Ensaios para avaliação de atividades enzimáticas no intestino

4.12.1 Soluções tampão utilizadas

Os seguintes tampões foram utilizados nos ensaios: ácido acético/NaOH pH 4,5); ácido acético/NaOH pH 5,5); ácido 4-morfolinoetanosulfônico MES/NaOH (pH 6,5); ácido etanosulfônico – 4 – (2 – hidroxietil) – 1 – piperazina (HEPES)/NaOH (pH7,0) e hidroximetil aminometano (TRIS)/HCl (pH 8,0). Todos os tampões utilizados foram preparados como soluções estoque na concentração de 0,1 M. A concentração final nos ensaios era de 0,05 M.

4.12.2 Avaliação da presença e pH ótimos para endoproteases intestinais

Para a determinação do pH ótimo das endoproteases totais, a azoalbumina foi utilizada como substrato (Sarath et al. 1989). Larvas e adultos foram alimentados previamente com CBM por 24 horas. Os adultos com idade de 10 a 15 dias de emergência das pupas e as larvas com 3 a 4 dias de vida foram dissecados conforme o item 4.9.

Para as larvas e adultos, foram preparados homogeneizados usando-se um conjunto de 5 intestinos incluindo o conteúdo intestinal. Os intestinos dissecados foram transferidos para microtubos de polipropileno de 1,5 mL contendo 125 µL de solução salina 0,9 %. O material foi homogeneizado com um microhomogeneizador manual de vidro abrasivo que se encaixava perfeitamente ao fundo do tubo somente até romper e liberar o conteúdo.

Essa preparação foi centrifugada a 10.000g por 5 minutos à 5 graus centígrados e o sobrenadante foi coletado e transferido para outro tubo e colocado em banho de gelo até ser utilizado nos ensaios. Cinquenta microlitros de uma solução de azoalbumina a 4%, preparada em salina 0,9%, foram incubados a 30°C, durante 2 horas, em um microtubo de polipropileno de 1,5 mL contendo também 100 µL do tampão desejado, 25 µL de uma solução aquosa de mercaptoetanol 5 mM e 25 µL de homogeneizado contendo o equivalente a um intestino para as larvas e para os adultos. Terminada a incubação, 600 µL de ácido tricloroacético (TCA) a 10% foram adicionados em cada tubo para parar a reação e precipitar a azoalbumina não digerida.

Após 15 minutos de espera, os tubos foram centrifugados a 10000 g por 5 minutos e 600 µL do sobrenadante foram transferidos para outros tubos contendo 700 µL de NaOH 1M. A absorvância de cada amostra foi medida a 440 nm em espectrofotômetro (Shimadzu UV- 1650 PC). Os controles foram preparados substituindo-se o homogeneizado por um volume

equivalente de salina. Neste experimento as atividades das endoproteases totais foram avaliadas em valores de pH 4,5; 5,5; 6,5; 7,0 e 8,0.

4.12.3 Determinação da atividade de lisozima no intestino de larvas de terceiro estágio e adultos de *C. megacephala*

Para avaliar a possível presença de atividade de lisozima no intestino de larvas e adultos, ambos foram alimentados previamente com carne bovina moída por 24 horas. Os adultos com idade de 10 a 15 dias de emergência e as larvas com 3 a 4 dias de vida foram dissecados conforme o item 4.9 e diferentes quantidades de extrato de intestino bruto (EIB) foram utilizados nos ensaios. Os intestinos foram obtidos e alocados individualmente em microtubo de polipropileno de 1,5 mL contendo 30 µL de tampão MÊS pH 6,5. Foram sonicados até se desfazerem por completo e centrifugados 15.000 g por 5 minutos e após a centrifugação o volume médio de 35 µL do sobrenadante foi transferido para um novo tubo. Para avaliação da atividade de lisozima, utilizou-se 5 µL de cada amostra de intestino para orifícios separados em uma placa de cultura Costar® 3590 de 96 poços e a reação disparada adicionados 195 µL do substrato (*Micrococcus lysodeikticus* a 1 mg/mL em MES 100 mM / NaCL 100 mM pH 6,54). A leitura realizada foi a cinética a 650 nm por 30 minutos a cada 30 segundos a 30°C, agitando 5 segundos no início e 3 segundos entre cada leitura.

4.12.4 Avaliação da presença da atividade de catalase no intestino de larvas de terceiro estágio e adultos de *C. megacephala*

A atividade da catalase no intestino foi ensaiada segundo Citelliet al. (2007) medindo-se a taxa de queda da absorvância do peróxido de hidrogênio que absorve luz no comprimento de onda de 240 nm.

Para avaliação da atividade da catalase nos intestinos das L3 e adultos foi ofertada CBM em decomposição em recipiente de plástico por 24 horas. Posteriormente, as L3 e adultos foram capturadas e dissecadas em salina 0,9% de acordo com o item 4.9 para obtenção dos intestinos. Os intestinos inteiros e íntegros foram colocados em microtubo de polipropileno de 1,5 mL contendo 1,0 mL de Tampão Fosfato de Potássio a 50 mM e pH 7. Cada microtubo de polipropileno de 1,5 mL continha dois intestinos inteiros e íntegros.

Após a dissecação, os microtubos foram sonicados até os intestinos se desfazerem e a solução ficar homogênea, em seguida foram coletados 500 μL e misturados com 1 mL de solução Tampão Fosfato de Potássio, obtendo uma diluição final de 1:2 e submetidos à análise de cinética enzimática em espectrofotômetro a 240 nm, a 30 °C por período de 2 min.

Cada microtubo contendo dois intestinos, continha 100 μL coletados e misturados a 900 μL de substrato (peróxido de hidrogênio misturado ao tampão fosfato com absorvância entre (0,520 e 0,550) dentro de uma cubeta de 1mL em espectrofotômetro modelo Shimadzu a 30 °C. A absorvância foi medida em intervalos de cinco segundos no módulo cinético de modo que foi possível calcular a taxa de queda de absorvância. A atividade da catalase foi expressa em micromoles de peróxido de hidrogênio degradados por minuto (uma unidade de atividade – U é igual a 1 μmol de peróxido degradado por minuto). A concentração do peróxido de hidrogênio foi calculada a partir do coeficiente de extinção molar de 39,4. $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Hugo 1984).

Uma vez que o peróxido de hidrogênio pode se degradar não enzimaticamente, essa degradação foi avaliada no extrato de intestino fazendo um ensaio da catalase na presença de um inibidor da enzima. O inibidor 3-Amino-1,2,4- triazole foi utilizado na concentração final de 10 mM. A degradação do peróxido de hidrogênio medida neste controle foi subtraída da degradação total medida na ausência do inibidor.

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram analisados através do *software* GraphPad Prism 5 (GraphPad Inc, EUA) e representados pela média \pm desvio padrão. Para verificar a normalidade dos dados, foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov. As comparações de três grupos ou mais foram realizadas utilizando One-Way ANOVA, seguido pelo teste de Kruskal-Wallis ou Two-Way ANOVA seguido por Boferroni ou Tukey. A diferença entre dois grupos foi verificada pelo Test T.

6. RESULTADOS

6.1 Desenvolvimento de larvas de primeiro estágio ao empupamento de *C. megacephala*

As larvas de primeiro estágio apresentaram, em média, massa corporal de 0,3 mg, enquanto as larvas de segundo estágio apresentaram massa corporal 13 vezes maior em relação ao primeiro estágio ($p < 0,001$). No terceiro dia, as larvas de terceiro estágio apresentaram massa média de 28,8 mg, valor sete vezes superior em relação aquele observado para o segundo estágio ($p < 0,001$) (Fig. 17).

No quinto dia após o nascimento, as larvas de terceiro estágio estão menos ativas e reduzem a massa corporal em relação ao quarto dia, mas apresentam massa 1,5 vez maior em relação ao terceiro dia (Fig. 17). No quinto dia, as larvas apresentaram a cutícula retraída, mais seca e com a coloração amarronzada clara.

No primeiro dia de pupa, a massa corporal foi, em média, 5,0 mg menor que das larvas de terceiro estágio no quinto dia ($p < 0,001$) (Fig. 17). No segundo dia de pupa, a perda da massa corporal em relação ao quinto dia de vida da larva de terceiro estágio foi de 11,0 mg ($p < 0,001$) em relação ao quinto dia de vida da larva de terceiro estágio e em relação ao primeiro dia de pupa a perda foi de 6 mg ($p < 0,05$).

A perda de massa da pupa continuou ao longo do ciclo biológico chegando no terceiro dia de pupa com a massa corporal de 29,6 mg e com uma diferença de menos 12,0 mg em relação ao quinto dia de vida ($p < 0,001$) e 7,0 mg em relação ao primeiro dia de pupa ($p < 0,01$) (Fig. 17).

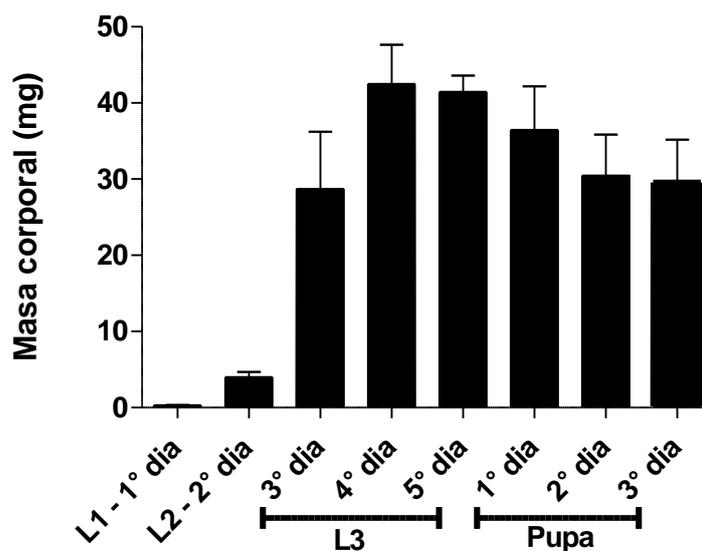


Figura 17 – Massa corporal do primeiro estágio larval ao empupamento de *C. megacephala*. Dados representados por média \pm desvio padrão.

O tempo de desenvolvimento dos estágios de ovo até a emergência dos adultos das pupas de *C. megacephala* em condições avaliadas foi de $9 \pm$ dias (Tab. 1). O estágio de ovo foi rápido e em menos de $24 \pm$ horas ocorreu a eclosão do primeiro estágio larval (L1). O desenvolvimento do estágio larval também ocorreu relativamente rápido e as larvas passam de L1 a L3 em cinco dias, sendo que as L3 são o estágio de maior duração ($3 \pm$ dias). O estágio de pupa, de maneira semelhante à L3, também necessitou de $3 \pm$ dias para o desenvolvimento.

Tabela 1 – Duração dos estágios e estádios de *C. megacephala* em condições de laboratório.

Estágio/Estádio	Duração do desenvolvimento (Dias)
Ovo	Menos de 1
L 1	1
L 2	1
L 3	3
Pupa	3

6.2 Desenvolvimento da glândula salivar de larvas de terceiro estágio de *C. megacephala*.

As glândulas salivares das L3 foram compostas por dois lobos e apresentaram aspecto esbranquiçado, longilíneo, com dois ductos eferentes bifurcando em um ducto deferente (Fig. 18A). As glândulas salivares das L3 aumentaram o tamanho durante o desenvolvimento nesse estágio. Nos três dias de acompanhamento, verificou-se que as glândulas salivares das L3 no segundo dia aumentaram 0,9 mm em relação ao primeiro dia, medindo em média 8,6 mm. No terceiro dia, as glândulas salivares das L3 aumentaram comprimento 9,8 mm, com diferença estatística em relação aos primeiros dias de desenvolvimento larval ($p < 0,01$) (Fig. 18B).

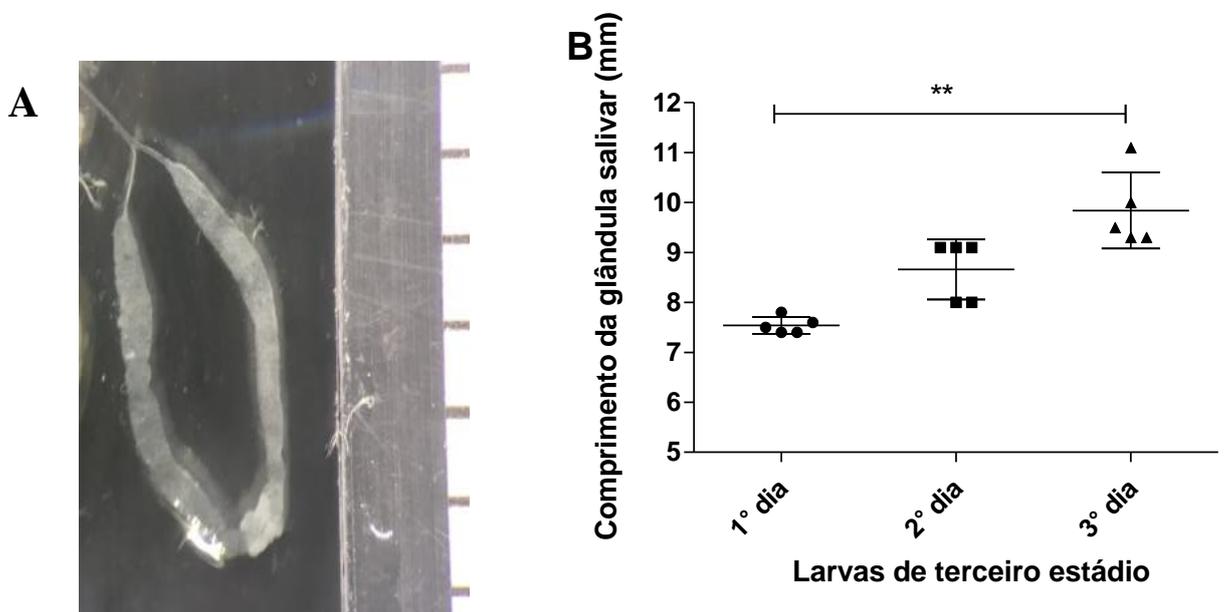


Figura 18 – Glândula salivar das larvas de terceiro estágio de *C. megacephala*. A - Aspecto da glândula salivar (mm). B - Comprimento da glândula salivar. Dados representados por média \pm desvio padrão. Análise estatística: para avaliar a diferença entre os grupos foi utilizado o teste One-Way ANOVA seguido de Kruskal-Wallis ** ($p < 0,01$) indicaram diferença estatística no comprimento da glândula salivar, $n = 5$.

Durante o desenvolvimento das L3 observou-se que a quantidade de proteínas por glândula salivar aumentou significativamente entre os dias de desenvolvimento ($p < 0,001$) (Fig. 19). As L3, no terceiro dia de vida apresentaram 2,6 vezes mais proteínas por par de glândula salivar quando comparado com L3 de um dia de vida e 1,6 a mais que a L3 de dois dias ($p < 0,01$).

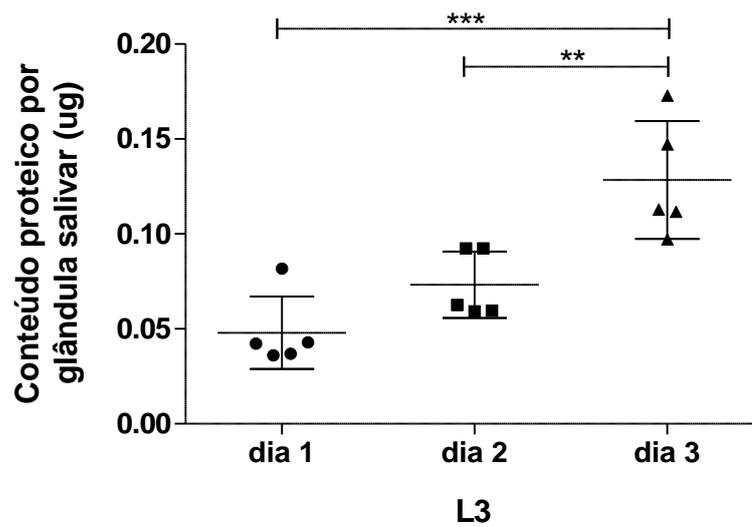


Figura 19 – Conteúdo proteico por glândula salivar de larvas de terceiro estágio de *C. megacephala*. Os dados representados foram obtidos diariamente através da dissecação das glândulas salivares em solução salina 0,9% e a dosagem de proteína conforme Bradford (1976). Dados representados por média \pm desvio padrão. Análise estatística: para avaliar a diferença entre os grupos foi utilizado o teste One-Way ANOVA seguido de Kruskal-Wallis ** ($p < 0,01$) e *** ($p < 0,001$) indicaram diferenças estatísticas no conteúdo proteico por par de glândula salivar, $n = 5$.

6.3 Fluxo intestinal das larvas de terceiro estágio de *C. megacephala*

O carvão vegetal ativado em pó homogeneizado com peixe macerado permitiu que o fluxo intestinal das larvas fosse avaliado de forma macroscópica (Fig. 20A). O tempo médio que o alimento ingerido pelas L3 levou para percorrer todo o intestino e ser excretado foi de $48,8 \pm 6,2$ minutos. Entretanto, verificou-se variação individual no tempo de eliminação do conteúdo intestinal que foi de 34 a 62 minutos após a ingestão (Fig. 20B).

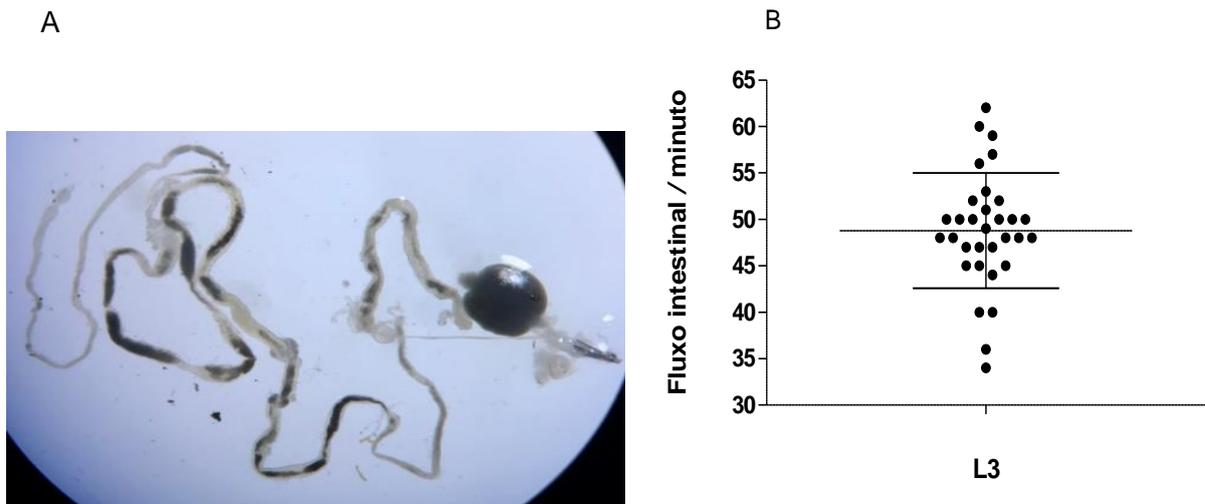


Figura 20. Fluxo intestinal de larvas de terceiro estágio de *C. megacephala*. (A) Coloração adquirida pelo intestino das larvas de terceiro estágio de *C. megacephala* utilizando o carvão vegetal ativado em pó para avaliação do tempo do fluxo intestinal. Dados representados por média \pm desvio padrão. (B) Duração da passagem do alimento pelo intestino, da ingestão até a excreção, $n=32$.

6.4 Comprimento intestinal das larvas de terceiro estágio e adultos de *C. megacephala*

O comprimento total do intestino (CTI) das L3 foi de 70,4 mm, sendo que a região mais longa do intestino foi o IM com 39,3 mm e a menor o IP com 31,4 mm (Tab. 2).

Nos adultos, o CTI dos machos e das fêmeas foram de 24,1 e 27,4 mm, respectivamente. O comprimento da região do IM dos machos foi de 18,2 mm e das fêmeas 20,9 mm, enquanto o IP nos machos foi de 6,0 mm e nas fêmeas 6,5 mm (Tab 2).

O CTI (Fig. 21) das L3 foi maior em relação aos CTI dos machos e as fêmeas ($p<0,001$). As regiões do IM e IP, quando comparadas, entre as L3, machos e as fêmeas, foram maiores nas L3 ($p<0,001$). Entre machos e fêmeas não houve diferenças estatísticas (Tab. 2).

Tabela 2. Comprimento intestinal das larvas de terceiro estágio e adultos de *C. megacephala*

RI	L3			Machos			Fêmeas		
	IM	IP	CTI	IM	IP	CTI	IM	IP	CTI
1	47,7	37,1	84,4	19,2	5,8	25,0	16,0	6,1	22,00
2	39,2	24,5	63,8	18,4	5,4	23,8	19,8	6,0	25,8
3	31,7	29,7	60,7	17,4	6,3	23,7	24,0	6,0	30,0
4	36,8	31,7	68,5	16,7	6,6	23,3	21,1	7,1	28,1
5	41,2	34,2	74,7	19,2	5,7	24,9	23,8	7,5	31,3
M	39,3	31,4	70,4	18,2	6,0	24,1	21,0	6,5	27,4

As siglas na horizontal indicam: (L3) larva de terceiro estágio. (RI) Regiões do intestino, (IM) Intestino médio, (IP) Intestino posterior e (CTI) comprimento total do intestino. Os números na coluna primeira coluna na vertical indicam os indivíduos usados nas mensurações. Os dados são apresentados como a média (M), n=5.

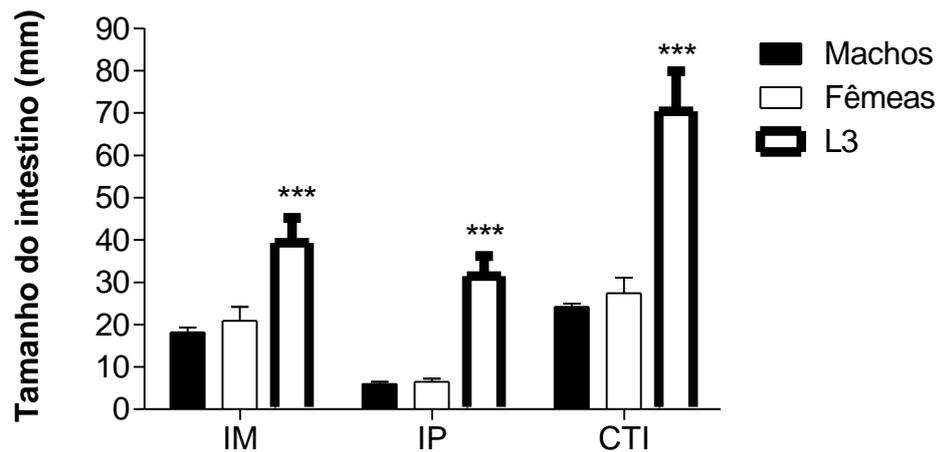


Figura 21. Comprimento intestinal de larvas de terceiro estágio e adultos de *C. megacephala*. (IM) Intestino médio, (IP) Intestino posterior, (CTI) comprimento total do intestino. Os dados estão representados como média \pm desvio padrão. Análise estatística: para avaliar a diferença entre os grupos foi utilizado o teste Two - Way ANOVA - Bonferroni, *** $p < 0,001$ indicam diferenças estatísticas nos comprimentos dos intestinos, n=5 para larvas e adultos.

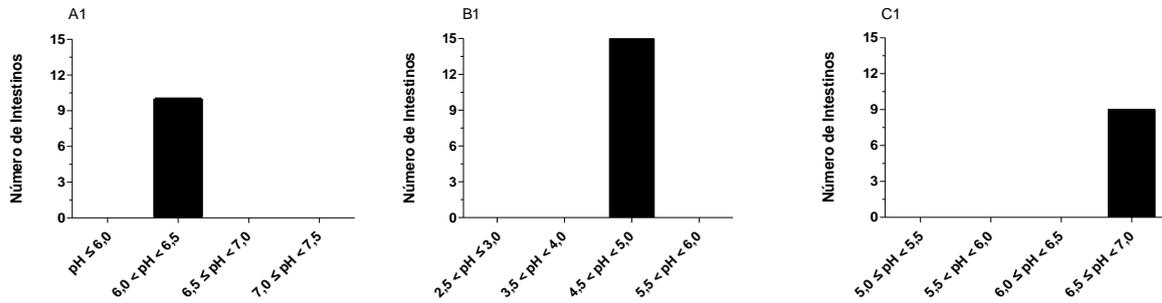
6.5 pH intestinal das larvas de terceiro estágio de *C. megacephala*

Utilizando o corante AB foi possível avaliar o pH do IMA das L3 que variou de 6,0 a 6,5 (Fig. 22 A1). O VB mostrou faixa de pH um pouco mais ácida quando comparado com o AB, variando de 4,5 a 5,0 (Fig. 22 B1), enquanto a PB revelou pH próximo a neutralidade, entre 6,5 e 7,0 (Fig. 22 C1). Portanto, observou-se discrepância entre os valores de pH encontrados com os diferentes corantes, sugerindo que o pH no IMA variou de 4,5 a 7,0.

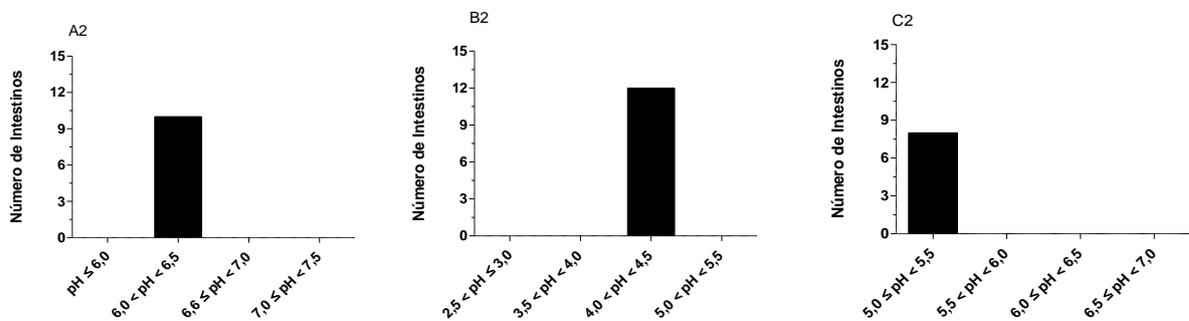
A utilização do corante AB constatou-se faixa de pH da região do IMM entre 6,0 a 6,5 (Fig. 22 A2) de maneira semelhante ao observado para o IMA. O corante VB mostrou uma faixa de pH mais ácida quando comparado com o AB variando de 4,0 a 4,5 (Fig. 22 B2) e para a PB, os valores de pH oscilaram entre 5,0 e 5,5 (Fig. 22 C2). Constatou-se variação nas medições com os diferentes corantes indicando que o pH no IMM foi entre 4,0 e 6,5.

O IMP também revelou pH oscilando entre 6,0 e 6,5 de maneira semelhante ao observado para as outras regiões (IMA e IMM) quando o corante AB foi utilizado (Fig. 22 A3). O corante VB mostrou uma faixa de pH mais ácido quando comparado ao AB variando de 4,5 a 5,0 (Fig. 22 B3). Para o PB, a faixa de pH verificada para o IMP foi de 6,0 a 6,5 semelhante àquela verificada para o AB (Fig. 22 C3). Esses resultados sugerem que o pH do IMP variou de 4,5 a 6,5.

IMA



IMM



IMP

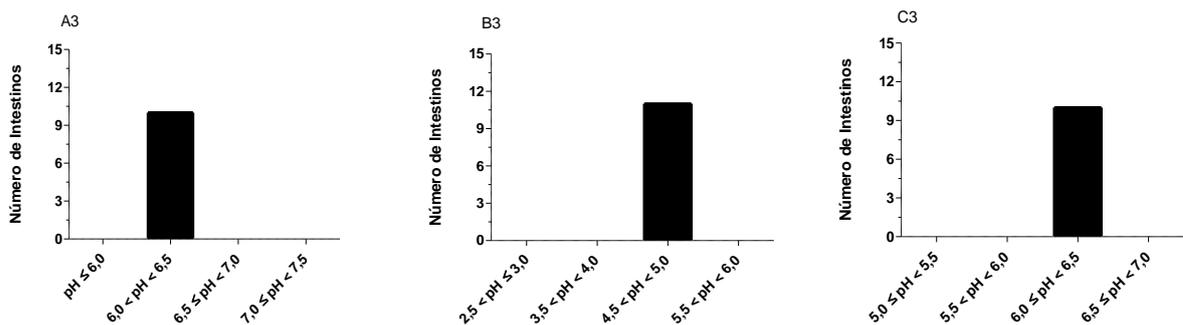


Figura 22 - pH do intestino médio das larvas de terceiro estágio de *C. megacephala* utilizando os corantes (A) AB, (B) VB e (C) PB. (IMA) intestino médio anterior (A1, B1, C1); (IMM) intestino médio médio (A2, B2, C2) e (IMP) intestino médio posterior (A3, B3, C3). Os dados representados foram obtidos 30 minutos após alimentação das larvas com os corantes. Os intestinos foram dissecados em solução salina 0,9% e avaliados visualmente de acordo com a escala de cor (Fig. 16 e 24).

No IP, a faixa de pH utilizando o corante AB demonstrou uma variação entre 6,0 e 6,5 (Fig. 23 A). O corante VB demonstrou faixa de pH no IP entre 5,5 e 6,0 semelhante ao AB (Fig. 23 B). Para o PB, a faixa de pH verificada no IP oscilou entre 6,0 e 6,5 de maneira semelhante ao verificado com o AB e mais alto do que o verificado para o VB (Fig. 23 C). Sendo assim, o pH no IP de *C. megacephala* variou de 5,5 a 6,5.

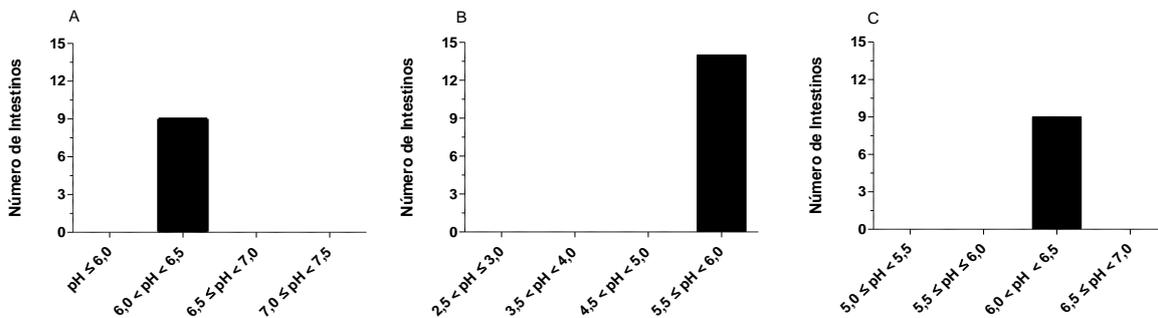


Figura 23 - pH do intestino posterior das larvas de terceiro de *C. megacephala* utilizando os corantes (A) AB, (B) VB e (C) PB. Os dados representados foram obtidos 30 minutos após alimentação das larvas com os corantes. Os intestinos foram dissecados em solução salina 0,9% e avaliados visualmente de acordo com a escala de cor (Fig. 16 e 24).

Em conjunto, as medições de pH indicaram que a faixa de pH ao longo do intestino das larvas de terceiro estágio de *C. megacephala* utilizando os corantes vitais e seguindo a escala padrão foi caracterizado por apresentar valores entre 4,5 e 7,0 (Fig. 24), sendo a região do intestino com a faixa de pH mais baixa o IMM, que pode chegar a pH 4,0 e o IMA com a faixa de pH mais alta podendo chegar ao neutro (Tab. 3).



Figura 24 - pH intestinal das larvas de terceiro estágio de *C. megacephala* utilizando os corantes (A) AB, (B) VB e (C) PB. (IMA) intestino médio anterior, (IMM) intestino médio médio, (IMP) intestino médio posterior e (IP) intestino posterior. Os dados representados foram obtidos 30 minutos após alimentação das larvas com os corantes. Os intestinos foram dissecados em solução salina 0,9% e avaliados visualmente de acordo com a escala de cor (Fig. 16). Fonte: arquivo pessoal.

Tabela 3. Variação do pH intestinal das larvas de terceiro estágio de *C. megacephala*.

Porção do intestino*	IMA	IMM	IMP	IP
Varição do pH	4,5 – 7,0	4,0 – 6,5	4,5 – 6,5	5,5 – 6,5

*IMA: Intestino médio anterior, IMM: Intestino médio médio, IMP: Intestino médio posterior, IP: Intestino posterior.

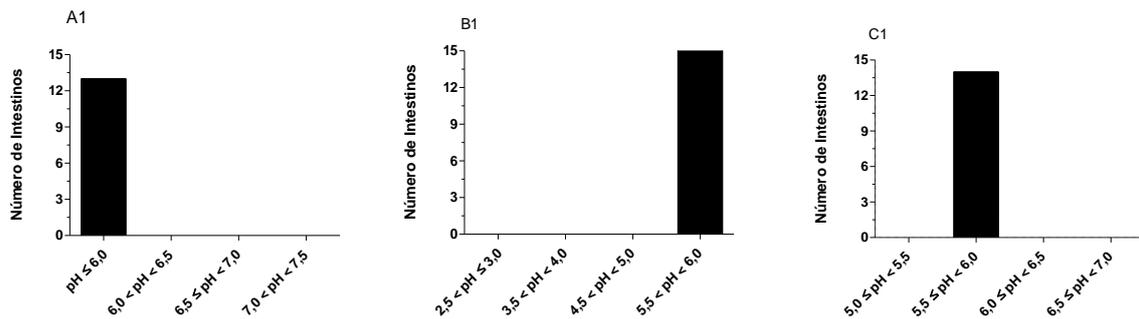
6.6 pH intestinal dos adultos de *C. megacephala*

A utilização do corante AB permitiu verificar a faixa de pH da região do IMA que foi $\leq 6,0$ (Fig. 25 A1). O corante VB mostrou uma faixa de pH variando de 5,5 a 6,0, assim como o corante PB (Fig. 25 B1 e C1). As colorações adquiridas para a mesma região do IMA com os diferentes corantes confirmaram o pH verificado segundo a escala padrão e em conjunto, dessa forma o pH do IMA variou de 5,5 a 6,0.

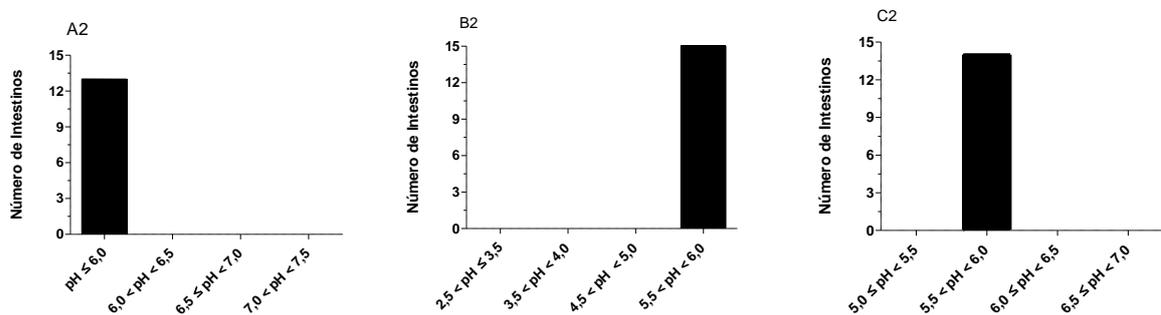
A utilização do corante AB mostrou uma faixa de pH da região do IMM abaixo de 6,0 (Fig. 25 A2) de maneira semelhante ao observado para o IMA. Os corantes, VB e PB demonstraram pH variando de 5,5 a 6,0 (Fig. 25 B2 e C2). As colorações adquiridas para a mesma região IMM indicaram que a região possui um pH entre 5,5 a 6,0.

A utilização do corante AB mostrou uma faixa de pH da região do IMP inferior a 6,0 (Fig. 25 A3) de maneira semelhante ao observado para o IMA e IMM. O corante VB demonstrou uma faixa de pH variando de 5,5 a 6,0 (Fig. 25 B3). Para o corante PB, a faixa de pH observada para o IMP 6,0 e 6,5 (Fig. 25 C3). Dessa forma o pH do IMP variou de 5,5 a 6,5.

IMA



IMM



IMP

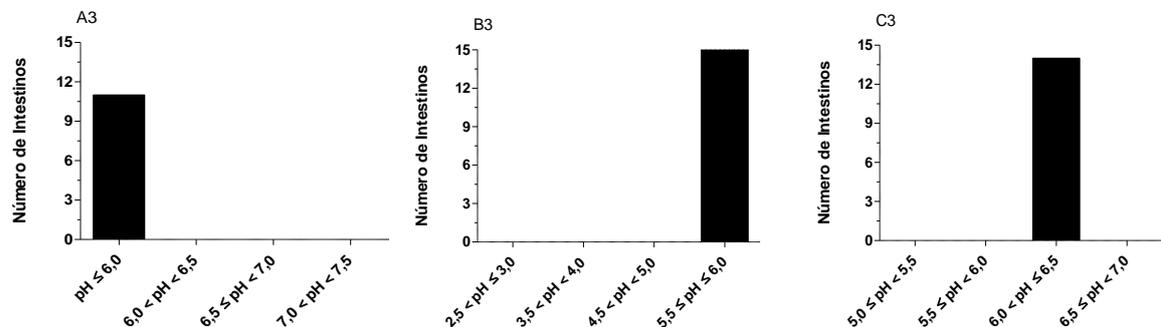


Figura 25 - pH do intestino médio dos adultos de *C. megacephala* utilizando os corantes (A) AB, (B) VB e (C) PB. (IMA) intestino médio anterior (A1, B1, C1); (IMM) intestino médio médio (A2, B2, C2) e (IMP) intestino médio posterior (A3, B3, C3). Os dados representados foram obtidos 24 horas após alimentação dos adultos com os corantes. Os intestinos foram dissecados em solução salina 0,9% e avaliados visualmente de acordo com a escala de cor (Fig. 16 e 27).

No IP, a faixa de pH utilizando, o corante AB observou-se pH 6,0 a 6,5 (Fig. 26 A). O corante VB demonstrou faixa de pH no IP mais baixa quando comparado com o corante AB, oscilando entre 5,5 e 6,0 (Fig. 26 B). Para a PB, a faixa de pH verificada no IP foi entre 6,0 e 6,5, semelhante ao verificado com o AB e mais alto do que o verificado para o VB (Fig. 26 C). Dessa forma o pH do IP variou de 5,5 a 6,5.

IP

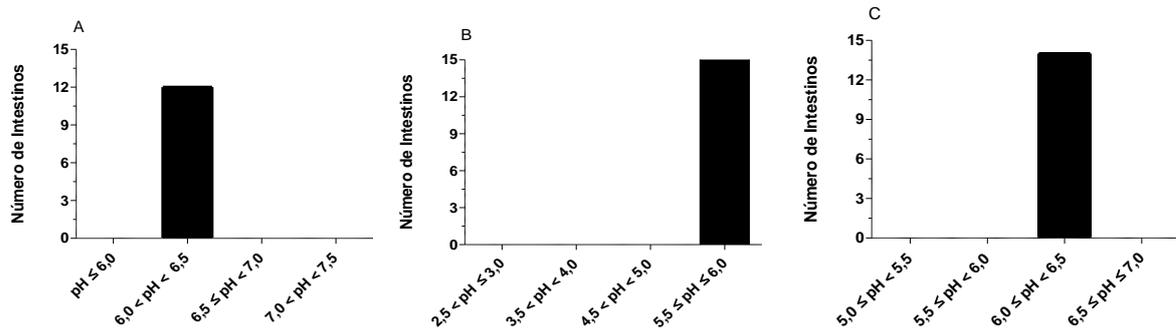


Figura 26 - pH do intestino posterior dos adultos de *C. megacephala* utilizando os corantes (A) Azul de Bromotimol, (B) Verde de Bromocresol e (C) Púrpura de Bromocresol. Os dados representados foram obtidos 24 horas após alimentação dos adultos com os corantes. Os intestinos foram dissecados em solução salina 0,9% e avaliados visualmente de acordo com a escala de cor (Fig. 16 e 27).

A utilização dos corantes vitais possibilitou a determinação do pH ao longo do intestino dos adultos de *C. megacephala* (Fig. 27). Em conjunto, o IMA apresentou o valor do pH semelhante ao IMM, entre 5,5 a 6,0 e para o IMP e o IP, os valores do pH foram pouco maior, de 5,5 a 6,5 (Tab. 4).

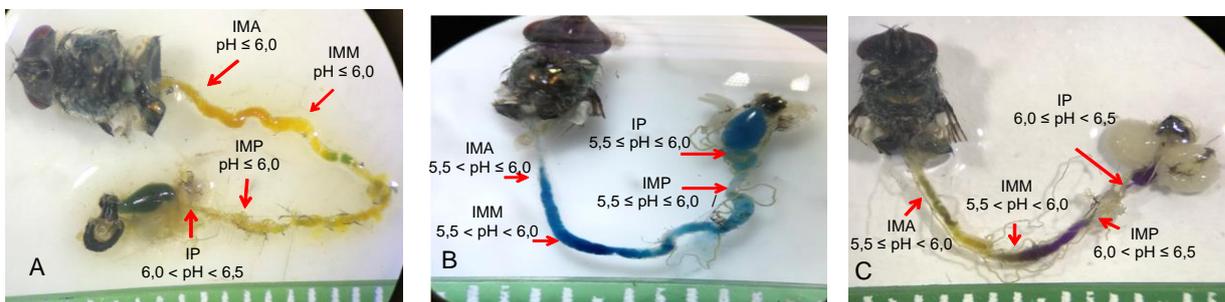


Figura 27 - pH intestinal dos adultos de *C. megacephala* utilizando os corantes (A) Azul de Bromotimol, (B) Verde de Bromocresol e (C) Púrpura de Bromocresol. (IMA) intestino médio anterior, (IMM) intestino médio médio, (IMP) intestino médio posterior e (IP) intestino posterior. Os dados representados foram obtidos 24 horas após alimentação dos adultos com os corantes. Os intestinos foram dissecados em solução salina 0,9% e avaliados visualmente de acordo com a escala de cor (Fig. 16). Fonte: arquivo pessoal.

Tabela.4 Variação do pH intestinal dos adultos de *C. megacephala*.

Porção do intestino*	IMA	IMM	IMP	IP
Varição do pH	5,5 – 6,0	5,5 – 6,0	5,5 – 6,5	5,5 – 6,5

*IMA: Intestino médio anterior, IMM: Intestino médio médio, IMP: Intestino médio posterior, IP: Intestino posterior.

6.7 Atividade das endoproteases no intestino de larvas de terceiro estágio e adultos de *C. megacephala* em diferentes pHs

A atividade proteolítica de extrato do intestino das L3 e adultos foram medidos usando-se o substrato azoalbumina e a curva de pH *versus* atividade de proteases totais é mostrada na Fig. 28. Nas L3, foi observado diferença na atividade de forma crescente em relação ao pH testado (Fig. 28A). Nos pHs 4,5; 5,5 e 6,5 a atividade enzimática foi baixa e sem diferença estatística. Entretanto quando o pH se tornou alcalino 7,5, verificou-se diferença estatística em relação aos pHs 4,5 e 5,5 ($p<0,01$). A maior atividade enzimática ocorreu em pH alcalino 8,5 ($p<0,001$).

Nos adultos, as endoproteases degradaram menos a azoalbumina, demonstrando baixa atividade enzimática no extrato intestinal. A utilização de diferentes pHs nos ensaios não alterou atividade das proteases ($p>0,5$) no intestino de adultos (Fig. 28B).

A atividade das endoproteases no extrato de intestino das L3 foi maior que aquela observada para os extratos dos adultos ($p<0,001$). O extrato do intestino das L3 mostrou atividade superior à dos adultos ($p<0,001$), quando utilizou-se pH alcalino (Fig. 28 C).

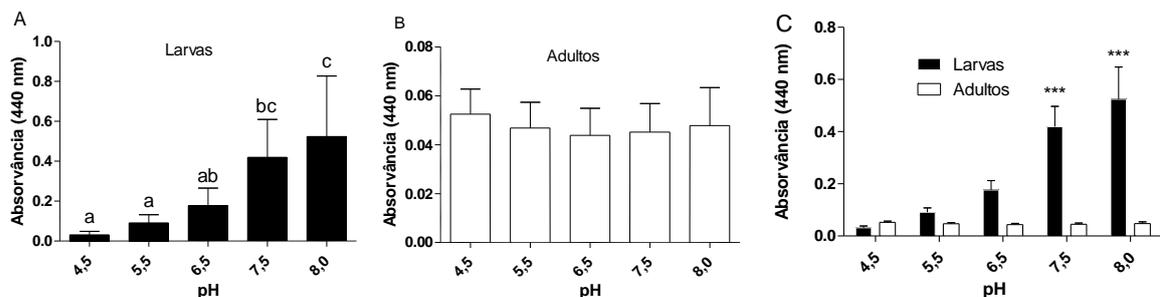


Figura 28 - Atividade das endoproteases no intestino em diferentes pHs de larvas de terceiro estágio e adultos de *C. megacephala*. Os dados estão representados como média \pm desvio padrão. Análise estatística: (A) e (B) - ANOVA - Tukey, letras diferentes indicam diferença estatística ($p<0,05$), (C) - ANOVA - Bonferroni, *** ($p<0,001$) indica diferença estatística entre larvas e adultos, $n=5$ para larvas e adultos.

6.8 Atividade de lisozima no intestino de larvas de terceiro estágio e adultos de *C. megacephala*

Nas L3, as diferentes quantidades de intestinos utilizadas nos ensaios demonstraram atividade de lisozima e, apesar de não haver diferença estatística, percebe-se uma tendência de aumento de atividade de lisozima intestinal quando a quantidade de intestinos é aumentada (Fig. 29A).

Nos adultos, também foi observado atividade de lisozima no intestino, mas a quantidade de intestinos utilizados nos ensaios não influenciou na atividade da lisozima, que foi baixa e sem diferença estatística (Fig. 29B).

Ao comparar a atividade da lisozima no intestino das L3 com adultos, observou-se que a V_{max} da reação foi maior nas larvas ($p < 0,05$). A quantidade de intestinos das L3 e adultos utilizados nos ensaios com pH 6,5 influenciaram na V_{max} da reação. Nas L3, com um ou dois intestinos a V_{max} da reação foi duas vezes maior em relação aos adultos ($p < 0,05$) (Fig 29C).

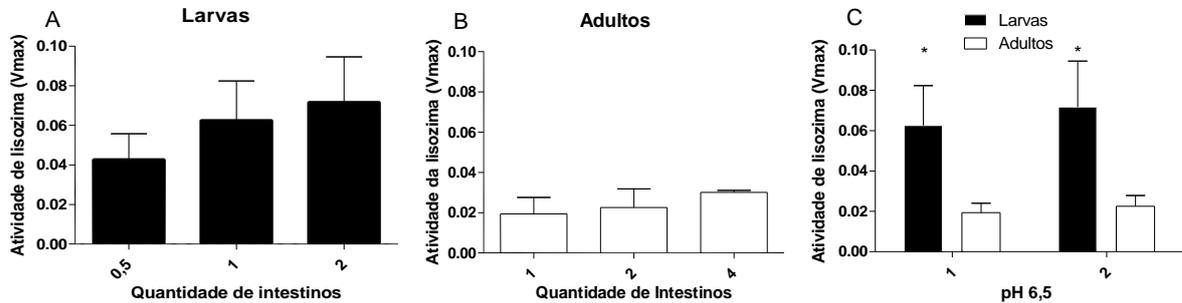


Figura 29. Atividade de lisozima no intestino de *C. megacephala*. (A) Larvas de terceiro estágio, (B) Adultos, (C) Comparação entre larvas e adultos. V_{max} = maior velocidade de decomposição do substrato pela ação da lisozima determinada pelo maior decréscimo de absorbância em um minuto. Os dados estão representados como média \pm desvio padrão. Análise estatística: (A) e (B) ANOVA – Tukey. Não houve diferença estatística entre os dados ($p > 0,05$), (C) ANOVA – Bonferroni, * ($p < 0,05$) indica diferença estatística entre larvas e adultos, $n=3$ para larvas e adultos.

6.9 Atividade de catalase no intestino de larvas de terceiro estágio e adultos de *C. megacephala*

A degradação do peróxido de hidrogênio e a utilização do inibidor 3-Amino-1,2,4-triazole permitiu verificar que os intestinos das L3 com 3 a 4 dias de vida e dos adultos com 10 a 15 dias de emergência apresentaram atividade de catalase (Fig. 30). Entretanto, a intensidade da atividade no intestino das larvas mostrou-se significativamente maior àquela observada no intestino dos adultos, sendo 18 vezes maior ($p < 0,05$).

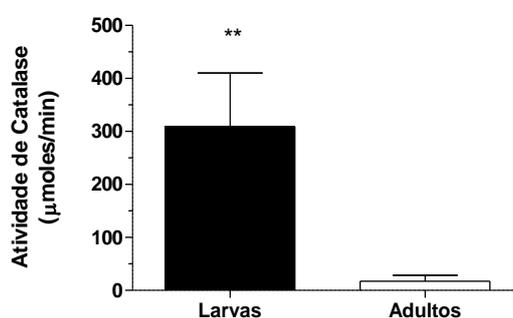


Figura 30 – Atividade de catalase no intestino de larvas e adultos de *C. megacephala*. A quantificação da atividade de catalase foi realizada em espectrofotômetro usando como substrato o H_2O_2 e intestinos de larvas com 3 a 4 dias de vida e adultos com 10 a 15 dias de emergência do pupário. Cada unidade de atividade enzimática é equivalente a um mM de peróxido de hidrogênio degradado para cada intestino por minuto ($1U = 1 \mu mol \cdot min^{-1} \cdot intestino^{-1}$). Os dados estão representados como média \pm desvio padrão. Análise estatística: a diferença entre os grupos foi verificada pelo Test T, ** $p < 0,01$ indica diferença estatística entre as larvas e adultos, $n=5$ para larvas e adultos.

Entre as diferentes regiões do intestino das L3 o IMM foi a região com maior atividade enzimática quando comparado com as outras regiões IMA, IMP e IP. Nos adultos, independentemente da região do intestino avaliada, a atividade de catalase foi baixa.

A comparação da atividade de catalase no intestino das L3 com os adultos demonstrou que todas as regiões do intestino das L3 possuem atividade enzimática superior aos adultos (Fig. 31). A região do intestino das L3 que apresentou maior atividade de catalase foi o IMM, sendo a média 20 vezes maior que a atividade medida na mesma região do intestino dos adultos ($p < 0,001$). As regiões do IMA e IMP das larvas, apresentaram as médias de atividade de catalase menores que a região do IMM e maiores que as médias verificadas para as mesmas regiões do intestino dos adultos. A região com menor atividade de catalase verificada no intestino das larvas foi IP e essa foi 15 vezes maior que atividade verificada para a mesma região nos adultos.

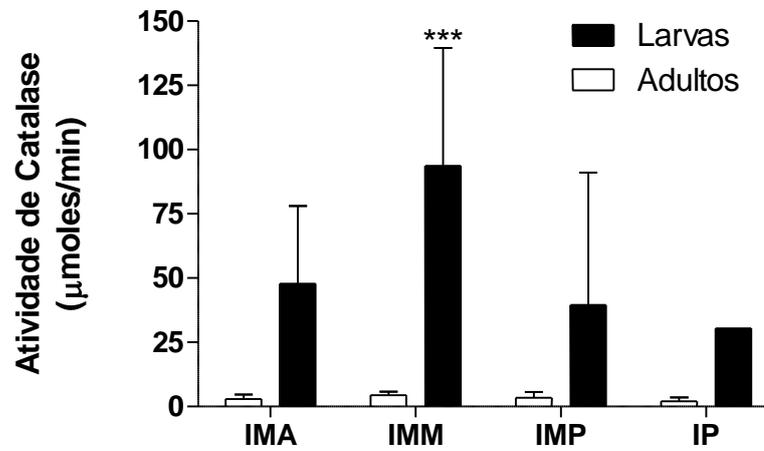


Figura 31 - Atividade de catalase nas diferentes regiões do intestino de larvas de terceiro estágio e adultos de *C. megacephala*. A quantificação da atividade de catalase foi realizada em espectrofotômetro usando como substrato o H_2O_2 e intestinos de larvas com 3 a 4 dias de vida e adultos com 10 a 15 dias de emergência do pupário. Cada unidade de atividade enzimática é equivalente a um mM de peróxido de hidrogênio degradado para cada intestino por minuto ($1U = 1 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{intestino}^{-1}$). Os dados estão representados como média \pm desvio padrão. Análise estatística: a diferença entre os grupos foi verificada Two-way ANOVA - Bonferroni *** ($p < 0,05$) indica diferença estatística entre larvas e adultos, $n=3$ para as larvas e $n=5$ para adultos.

7. DISCUSSÃO

Relembra a importância do estudo dos parâmetros morfológicos e fisiológicos da glandular e do tubo digestivo de larvas e adultos de *C. megacephala*. A fonte proteica utilizada para as L3 foi a carne bovina moída por ser um alimento que favorece o desenvolvimento uniforme e rápido das larvas, quando comparado com carne equina, peixe *in natura*, fígado de frango e ração comercial para cães (Ribeiro & Milward-de-Azevedo 1997, Pires et al. 2009, Milward-de Azevedo et al. 2000, Barbosa et al. 2004, Ferraz et al. 2011). Porém, um dos grandes problemas encontrados na utilização dessa dieta foi o odor característico de matéria orgânica em decomposição, bastante desagradável no local em que as amostras são trabalhadas, além de atrair outros insetos e a possibilidade de contaminação bacteriana.

A redução da massa corporal das L3 a partir do quinto dia pode ser atribuída a excreção parcial do conteúdo intestinal para a formação da pré-pupa. A redução da massa corporal das pupas até a eclosão dos adultos pode ser atribuída a perda de água pelos espiráculos respiratórios no processo de respiração como reportado por Boonsriwong et al. (2012).

A massa corporal de L2 em relação aos outros estudos foi inferior ao relatado por Thyssen et al. (2014) em L2 de *C. megacephala* alimentada com musculo bovino, que obtiveram o peso médio de $9,6 \pm \text{mg}$. No presente estudo, no terceiro dia de desenvolvimento, as L3 apresentaram um ganho de massa corporal de $24,7 \pm \text{mg}$ em relação a L2 (Fig.17) semelhante ao observado por Thyssen et al. (2014), que relataram peso médio das L3 com $80,6 \pm \text{mg}$ e $74,5 \pm \text{mg}$ alimentadas com coração de galinha e estômago de boi, respectivamente. No terceiro dia, as L3 atingiram, $28,7 \pm \text{mg}$ e no quarto dia apresentaram a maior massa corporal $42,4 \pm \text{mg}$, mas nenhuma das L3 atingiram o peso relatado no estudo acima. A redução da massa corporal das L3 a partir do quinto dia pode ser atribuída a excreção parcial do conteúdo intestinal para a formação da pré-pupa. Essa hipótese parece se confirmar devido à contínua perda da massa corporal no primeiro dia de pupa para o segundo dia de pupa. A redução da massa corporal das pupas até a eclosão dos adultos pode ser atribuída a perda de água pelos espiráculos respiratórios no processo de respiração que provavelmente vai levando a desidratação do pupário.

O tempo de incubação dos ovos de *C. megacephala* criadas em condições de laboratório neste estudo foi de acordo com estudos anteriores (Prins 1982, Wells & Kurahashi 1994, Gabre et al. 2005, Barros-Cordeiro & Pujol-Luz 2010). A duração do desenvolvimento da L1 e L2 foi de apenas um dia, corroborando Prins (1982) e Barros-Cordeiro & Pujol-Luz (2010). Por outro

lado, a L3 necessitou de três dias, um tempo maior de alimentação e desenvolvimento que os estádios anteriores, corroborando Vélez & Wolff (2008). Foi observado também, nesse estudo, que a L3, durante a formação da pupa, não excreta totalmente o conteúdo intestinal. Esse fato possivelmente ocorreu para que quando adultos emergissem, a microbiota do intestino já esteja formada, auxiliando na digestão e na resposta imune inata.

O estágio de pupa durou três dias neste estudo, metade do tempo relatado em estudos anteriores (Prins 1982, Vélez & Wolff 2008). O período de pupa mais longo descrito na literatura foi de nove dias (Wells & Kurahashi 1994). O tempo de desenvolvimento de ovo a adulto de *C. megacephala* neste estudo foi de nove dias em condições de laboratório, diferente do observado por Milward-de-Azevedo et al. (1996) que verificaram 10,8 dias sob as mesmas condições de temperatura e umidade, mas utilizando a carne de equino como fonte proteica para o desenvolvimento larval.

Nesse estudo, verificou-se durante o desenvolvimento das L3 que o tamanho da glândula salivar aumentou significativamente ao longo do desenvolvimento (Fig. 18B). Esse resultado indicou que a glândula se desenvolveu concomitantemente à larva e que provavelmente a mudança morfológica seja devido ao conteúdo proteico no interior dos lobos. Boonsriwong et al. (2012) demonstraram que existe mudança morfológica e anatômica na glândula salivar das L3 para os adultos. Segundo Evangelista & Leite (2005), essa transformação morfológica da glândula salivar reflete a adaptação à diferença na alimentação como descrito em *D. hominis*.

O aumento do conteúdo proteico nas glândulas salivares durante o desenvolvimento larval das L3 pode ser explicado pelo crescimento das glândulas com armazenamento de uma maior quantidade de proteínas (Fig. 19). Poderia ter ocorrido também alteração no perfil de moléculas ao longo do desenvolvimento, o que deve ser elucidado em futuros estudos. Em estudos anteriores, foi demonstrado que o perfil de enzimas de L1 é diferente do perfil de L2 e L3 (Evangelista & Leite, 2007).

O fluxo intestinal das L3 neste estudo foi considerado rápido (Fig. 20B), demonstrando que a larvas consegue encher e esvaziar o tubo digestivo com alimento por várias vezes ao longo de um dia; provavelmente por até 23 vezes. Nenhum estudo na literatura relatou sobre o do fluxo intestinal em L3 de *C. megacephala* para outras espécies de Brachycera.

As medições dos comprimentos dos intestinos demonstraram que o CTI das L3 tem 70,4 mm e que a região do IM é a maior, seguida do IP. Estes resultados estão de acordo com Boonriwong et al. (2010) que verificaram um CTI para as L3 de 89,1 mm, e o IM maior que o IP. As medições do comprimento dos intestinos dos adultos, revelaram que as fêmeas e os

machos possuem CTI estatisticamente semelhante (Tab. 2), resultado semelhante ao obtido por Boonriwong et al. (2010), porém CTI de ambos os sexos foram maiores que o verificado neste presente estudo.

Nas L3, o CTI, IM e IP foram mais longos que as mesmas regiões estudadas nos machos e fêmeas, essas diferenças podem ser explicadas pela biologia de cada estágio, o pH intestinal, a atividade de enzimas intestinais e outros fatores ainda não descritos. O estudo mais recente que avaliou a anatomia e morfologia do sistema digestório de L3 e adultos de *C. megacephala* foi Boonriwong et al. (2010), no entanto sobre a fisiologia digestiva nenhum relato foi descrito.

Este estudo foi o primeiro a avaliar o pH intestinal das L3 de *C. megacephala*. Essa avaliação foi realizada com base em conceitos desenvolvidos em trabalhos anteriores, como Espinoza-Fuentes & Terra (1987), que verificaram que o pH intestinal das L3 de *M. domestica* é 6,1 para o IMA, 3,1 para o IMM e 6,8 para o IMP e IP. Terra & Regel (1995) também verificaram que a L3 de *M. domestica* tem o IMM muito ácido, chegando a pH 3,0. Diferentemente dos resultados obtidos nos estudos descritos acima, neste presente estudo foi demonstrado, que as L3 possuem uma variação de pH do IMM de 4,0 a 6,5 (Tab. 3). Apesar dos estudos serem em moscas de gêneros diferentes, o pH intestinal das L3 de *C. megacephala* também foi ácido, demonstrando, adaptação para a realização da saprofagia conforme relatado por Clark (1999) e Espinoza-Fuentes & Terra (1987).

A atividade de endoproteases no intestino avaliada nesse estudo revelou que, para larvas, o pH 8,0 mais eficiente para a digestão da azoalbumina dentre os pHs testados. É possível que o pH ótimo ainda não tenha sido detectado e, para isso, seria necessário a avaliação de outros valores de pH acima de 8,0. É importante ressaltar que os pHs utilizados no ensaio foram escolhidos baseados no pH intestinal mensurados no item 5.5 que indicou um pH intestinal entre 4,5 e 6,5. Portanto, a maior atividade em pH 8,0 foi um achado inesperado. Entretanto, esses resultados vão de encontro ao relatado por Muharsini et al. (2000), com larvas de *C. bezziana*, que demonstraram que a atividade da tripsina intestinal é ótima entre pH 6,5 a 9,5 e para quimotripsina intestinal o pH ótimo foi entre 5,0 a 9,5. Tamaki et al. (2012), em L3 de *M. domestica*, também verificaram atividade de quimotripsina no IM em pH 7,4, sendo liberada por exocitose principalmente no IMA e IMP. Essas informações sustentam a hipótese de que no intestino das L3 de *C. megacephala*, as proteases responsáveis pela digestão das proteínas sejam a tripsina e quimotripsina.

Diferentemente de larvas, a atividade de endoproteases intestinais nos adultos não sofreu influência do pH e apresentou atividade similar na faixa de pH testada sendo significativamente menor que a atividade intestinal das L3. Outros ensaios devem ser realizados para elucidar essas diferenças, mas essa poderia ser explicada pelo tipo de alimentação, o tamanho das proteínas ingeridas, a frequência da alimentação e a exigência nutricional. Uma hipótese para explicar a diferença entre L3 e adultos seria uma digestão baseada em exoproteases em adultos, e não em endoprotease, gerando peptídeos relativamente grandes no ensaio utilizado no presente trabalho e se tornado solúveis e não precipitado com o tratamento com TCA (Vale et al. 2007).

A atividade da lisozima no intestino das larvas foi dependente da quantidade de intestinos utilizados nos ensaios (Fig. 29). Nos adultos, também foi verificada atividade da lisozima, mas três vezes menor quando comparado com a atividade das larvas. Essa diferença de atividade de lisozima no intestino da L3 em relação aos adultos poderia ser explicada pelo local que as larvas vivem, um ambiente repleto de bactérias Gram positivas e Gram negativas e por se alimentarem frequentemente, existe a possibilidade de as bactérias colonizarem o seu intestino. Sendo assim, esperávamos que a atividade de lisozima nas larvas seria maior que nos adultos, que apesar de alimentarem várias vezes ao dia e de diferentes fontes nutritivas, mostrou que a lisozima não deve ser a principal enzima envolvida no mecanismo de defesa e que outras enzimas possam exercer essa função.

Resultados semelhantes aos achados para a atividade de lisozima foram obtidos em larvas de *M. domestica*, por Lemos et al. (1993), que descobriram duas lisozimas no extrato homogeneizado do IM de L3 que funcionaram em pH ótimo de 4,5 a 6,5 no IM. Neste estudo, não foi avaliada a atividade de lisozima nas diferentes regiões do intestino, mas foi verificado o pH intestinal dessas diferentes regiões e os resultados obtidos foram semelhantes àqueles verificado por Lemos et al. (1993). Dessa forma, é de se esperar que a atividade de lisozima identificada neste estudo nas L3 de *C. megacephala* tem função lítica contra bactérias. Diferentemente Ito et al. (1995) verificaram que a lisozima de L3 de *M. domestica* não possui efeito lítico contra *M. luteus* nas condições fisiológicas de pH 7,0 e concluíram que, para a enzima ter um perfil de atividade lítica seria necessário um pH ácido ótimo em torno de 5,0. Na literatura, pesquisas realizadas com L3 de *M. domestica* por Ren et al. (2009) afirmaram que as lisozimas tem função digestiva e um papel importante no sistema imunológico inato, atuando como agente antimicrobiano em bactérias Gram-negativas (Ex: *E. coli*), Gram-positivas (Ex: *S. aureus*) e que a enzima é mais expressa no IM que no tecido adiposo e hemolinfa de adultos, e

níveis reduzidos foram verificados desde o primeiro estágio de larva até o estágio de pupa. Corroborando com esses resultados, Cançado et al (2008) demonstraram que a lisozima MdL2 no IM em L3 de *M. domestica* teve a atividade lítica sobre *M. lysodeikticus* e que o pH ótimo de atividade lítica foi ácido.

A atividade da CAT no intestino das L3 foi significativamente maior que a verificada para os adultos (Fig. 30). Nas diferentes regiões do intestino, a atividade de CAT nas L3 foi maior em ordem decrescente na região do IMM, IMA, IMP e IP. Nos adultos, a atividade de CAT foi baixa em todas as regiões do intestino (Fig. 31), as regiões que apresentaram maior atividade foram IMM e IMP. A diferença observada na atividade da catalase entre L3 e adultos poderia ser explicada pela diferença de dieta. Sabe-se que, larvas ingerem quantidade de grupos heme muito maior que os adultos (Citelliet et al. 2007). Por isso pode-se hipotetizar que o estresse oxidativo no intestino das larvas seriam maior que o verificada nos adultos, que apesar de L3 alimentarem várias vezes durante o dia, a frequência de alimentação, a composição do alimento e o tamanho das partículas são bem menores, provocando menos stress oxidativo no intestino. Em *C. megacephala*, não foram encontrados estudos relatando a atividade da CAT no intestino, mas em diferentes artrópodes hematófagos, já foi demonstrado a importância para controle do estresse oxidativo no intestino (Paes et al. 2001, Citelliet et al. 2007, Oliveira et al. 2017).

Os resultados obtidos neste estudo, demonstram a necessidade de elucidar o papel da glândula salivar e do intestino das L3 de *C. megacephala* para compreender melhor sobre a digestão de proteínas, de lipídeos e de carboidratos, e quais bactérias colonizam o intestino, além do papel dos produtos de secreção e excreção na digestão, desenvolvimento dee na resposta imune inata.

8. CONCLUSÕES

- ✓ Durante o desenvolvimento larval, a larva de segunda estágio aumentou massa corporal 7 vezes para a larva de terceiro estágio.
- ✓ As glândulas salivares das larvas de terceiro estágio aumentaram o comprimento 2 mm do primeiro dia para o terceiro dia de desenvolvimento e a quantidade de proteína três vezes do primeiro para o terceiro dia.
- ✓ As larvas de terceiro estágio podem excretar o conteúdo intestinal até 23 vezes por dia.
- ✓ O comprimento do tubo digestivo das larvas foi duas vezes o tamanho dos adultos e a região do intestino médio quase duas vezes o tamanho dos adultos o que poderia explicar o rápido desenvolvimento larval.
- ✓ O pH intestinal das larvas e adultos foi ácido e o intestino médio foi a região mais ácida, mais para as larvas que os adultos.
- ✓ A atividade das endoproteases no intestino das larvas foi 9 vezes maior que nos adultos em pH 7,5 e 11 vezes maior no pH 8,5 mostrando que em adultos outras enzimas podem estar relacionadas a hidrólise proteica.
- ✓ A atividade de lisozima nas larvas foi três vezes maior que nos adultos e com a mesma quantidade de intestinos e no intestino em pH 6,5 o que sugeri que tem efeito lítico contra as bactérias.
- ✓ O estresse oxidativo no intestino das larvas foi maior que nos adultos visto que a catalase mostrou uma atividade 18 vezes maior no intestino das larvas que nos adultos.

9. REFERÊNCIAS

- Barbosa LS, Jesus DML & Coelho VMA 2004. **Longevidade e capacidade reprodutiva de casais agrupados de *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) (Diptera, Calliphoridae) oriundos de lavras criadas em dieta natural e oligídica.** Rev. bras. Zoociências Juiz de Fora V. 6 Nº2 p. 207-217.
- Barrett A. 1994. **Classification of peptidases: Proteolytic enzymes: Serine and Cysteine Peptidases.** In: *Methods in Enzymology*. (ed. Barrett AJ). Academic Press, San Diego. 244: p.1-15.
- Baumgartner DL & Greenberg B 1984 **The genus *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) in the new world.** *Journal Medicine and Entomology*, 21:105-113.
- Barros-Cordeiro K B & Pujol-Luz J R 2010 **Morfologia e duração do desenvolvimento pós-embrionário de *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae) em condições de laboratório.** Papéis Avulsos de Zoologia. Volume 50(47):709-717.
- Barroso IG, Santos GS, Bertotti M, Ferreira C, Terra WR 2019. **Molecular mechanisms associated with acidification and alkalization along the larval midgut of *Musca domestica*.** *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 237 (2019) 110535.
- Boonsriwong W, Sukontason K, Olson JK, Vogtsberger R C, Chaithong U, Kuntalue B, Ngernkun R, Upakut S, Sukontason K L 2006. **Fine structure of the alimentary canal of the larval blow fly *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae).** *Parasitology Research*, October.
- Boonsriwong W, Sukontason K, Olson J K 2007. **“Fine structure of the alimentary canal of the larval blow fly *Chrysomya megacephala*(Diptera: Calliphoridae),”** *Parasitology Research*, vol. 100, no. 3, pp. 561–574.
- Boonsriwong W, Sukontason K, Vogtsberger R C & Sukontason K L 2011. **“Alimentary canal of the blow fly *Chrysomya megacephala* (F.) (Diptera: Calliphoridae): an emphasis on dissection and morphometry,”** *Journal of Vector Ecology*, vol. 36, no. 1, pp. 2–10.

Boonsriwong W, Kabkaew L. Sukontason, Tarinee Chaiwong, UraiChaisri, Roy C. Vogtsberger, Kom Sukontason 2012. **Alimentary Canal of the Adult Blow Fly, *Chrysomya megacephala* (F.) (Diptera: Calliphoridae)—Part I: Ultrastructure of Salivary Glands.** Journal of Parasitology Research.

Briegel H, Lea AO 1975. **Relationship between protein and proteolytic activity in the midgut of mosquitoes.** *J Insect Physiol.* 21(9):1597-1604.

Carmo R. & Vasconcelos S 2014. **First record of the blow fly *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae) on a southern Atlantic island: Implications for disease transmission in a protected environment.** Journal of Vector Ecology 39:228–230.

Cançado FC, Effio PC, Terra WR., Marana SR 2008. **Cloning, purification and comparative characterization of two digestive lysozymes from *Musca domestica* larvae.** Braz. J. Med. Biol. Res. 41: 969–977.

Chapman RF 1998. **Alimentary canal, digestion and absorption.** In: The Insects: Structure and function. (ed. Chapman RF), p. 38-68. University Press, Cambridge.

Citelli M, Lara FA, Vaz Jr. IS, Oliveira PL 2007. **Oxidative stress impairs heme detoxification in the midgut of the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.** Molecular & Biochemical Parasitology 151, 81–88.

Clark TM 1999. **Evolution and adaptive significance of larval midgut alkalinization in the insect superorder Mecoptera.** *Journal of Chemical Ecology.* n. 25, p. 1945-1960.

Corena MP, Fiedler MM, Vanekeris L, TU C, Silverman DN, Linser PJ 2004. **Alkalization of larval mosquito midgut and the role of carbonic anhydrase in different species of mosquitoes.** Comparative Biochemistry and Physiology (parte C). n. 137, p. 207-225.

Dadd R.H 1975. **Alkalinity within the midgut of mosquito larvae with alkaline active digestive enzymes.** *Journal of Insect Physiology.* n. 21, p. 1847-1853.

Davison AJ, Kettle AJ, Fatur D 1986 **Mechanism of the Inhibition of Catalase by Ascorbate.** **The Journal of Biological Chemistry.** Vol.261, N°3.

Espinoza-Fuentes FP & Terra WR 1987. **Physiological adaptations for digesting bacteria. Water fluxes and distribution of digestive enzymes in *Musca domestica* larval midgut.** *Insect Biochemistry.* n. 17, p. 809-817.

Evangelista L G & Leite ACR 2005. **“Optical and ultrastructural studies of midgut and salivary glands of first instar of *Dermatobia hominis* (Diptera: Oestridae),”** *Journal of Medical Entomology*, vol. 42, no. 3, pp. 218–223.

Evangelista LG & Leite ACR 2007. **“Salivary glands of second and third instars of *Dermatobia hominis* (Diptera: Oestridae),”** *Journal of Medical Entomology*, vol. 44, no. 3, pp. 398–404.

Faria LDB, Orsi L, Luzia Aparecida Trinca LA, Godoy WAC 1999. **Larval predation by *Chrysomya albiceps* on *Cochliomyia macellaria*, *Chrysomya megacephala* and *Chrysomya putoria*.** *Entomologia Experimentalis et Applicata* **90**: 149–155.

Ferraz ACP, Bosisio DD, Coelho VMA 2011. **Dieta para larvas de *Chrysomya megacephala*, *Chrysomya putoria* e *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae).** *EntomoBrasilis*, 4(3): 125-129.

Furlanetto SMP, Campos M L C, Hársi CM, Buralli GM & ISHIHATA GK 1984. **Microrganismos enteropatogênicos em moscas africanas pertencentes ao gênero *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) no Brasil.** *Rev. Microbiol.*, São Paulo, 15: 170-174.

Gabre RM, Adham FK & Chi H 2005. **Life table of *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae).** *Acta Oecologica*, 27:179-183.

Gontijo NF, Almeida-Silva S., Mares-Guia ML, Costa FF, Williams P, Melo MN 1998. ***Lutzomyia longipalpis*: pH in thegut, digestive glycosidases, and some speculations up on *Leishmania* development.** *Experimental Parasitology* **JCR**, v. 90, p. 212-219.

Graça-Souza AV, Maya-Monteiro C, Paiva-Silva GO, Braz GR, Paes MC, Sorgine MHF 2006. **Adaptations against heme toxicity in blood-feeding arthropods.** *Insect biochemistry and molecular biology*, v. 36, n. 4, p. 322-335.

Greenberg B & Klowden MJ 1972. **Enteric bacterial interaction in insects.** *Am. J. Clin. Nutr.*, v.25, p.1459–1466.

Greenberg B 1990. **Behavior of post-feeding larvae of some calliphoridae and a muscid (Diptera).** *Ann Ent Soc Am* 83: 1210-1214.

Greenberg B & Kunich JC 2002. **Entomology and the law: Files as Forensic indicators.** University press, Cambridge, 306p.

Grigoras AG 2017. **Catalase immobilization - A review.** *Biochem. Eng. J.* 117: 1–20.

Guimaraes JH, Prado AP & Linhares AX 1978. **Tree newly introduced blowfly species in southern Brazil (Diptera, Calliphoridae).** *Revista Brasileira de Entomologia*, 22:53-60.

Ito, Y., M. Nakamura, T. Hotani, T. Imoto 1995. **Insect lysozyme from house fly (*Musca domestica*) larvae: possible digestive function based on sequence and enzymatic properties.** *J. Biochem.* 118: 546D551.

Hikima S, Hikima J, Rojtinnakorn J, Hirono I, Aoki T 2003. **Characterization and function of kuruma shrimp lysozyme possessing lytic activity against *Vibrio* species.** *Gene*, 316, 187–195.

Heit C, Marshall S, Singh S, Yu X, Charkoftaki G, Zhao H, Orlicky DJ, Fritz KS, Thompson DC, Vasiliou V 2017. **Catalase deletion promotes prediabetic phenotype in mice.** *Free Radic. Biol. Med.* 103: 48–56.

Hugo AE 1984. **Catalase in vitro.** In: **Methods in enzymology.** Academic Press, p. 121-126.

Houseman J G, Campbell F C, Morrison P E 1987. **A preliminar characterization of digestive proteases in the posterior midgut of the stable fly *Stomoxys calcitrans* (L.) (Diptera:**

Muscidae). *Insect Biochem.* Vol. 17, n°1, pp. 213-218.

Inanan T, Tüzmen N, Karipcin F 2018. **International Journal of Biological Macromolecules Oxime-functionalized cryogel disks for catalase immobilization.** *Int. J. Biol. Macromol.* 114: 812–820.

Jollès P, Jollès, J 1984. **What's a new in lysozyme research?** *Molecular and Cellular Biochemistry.* n. 63, p. 165-189.

Khoo CCH, Tan KH 2005 **Rectal gland of *Bactrocera papayae*: ultrastructure, anatomy and sequestration of auto fluorescent compounds upon methyl eugenol consumption by the male fly.** *Microsc Res Tech* 67:219–226

Lehane MJ 1997. **Peritrophic matrix structure and function.** *Annu Rev Entomol* 42: 525-550.

Lemos FJ, Ribeiro AF, Terra WR 1993. **A bacteria-digesting midgut lysozyme from *Musca domestica* (Diptera) larvae. Purification, properties and secretory mechanism.** *Insect Biochem. Mol. Biol.* 24: 533-541.

Lindsay SW, Lindsay TC, Duprez J, Hall MJR, Kwambana A, Jawara M, Nurudeen I U, Sallah N, Wyatt N, D'alessandro U, Pinder M, Antonio M 2012. ***Chrymoya putoria*, a Putative Vector of Diarrheal Diseases.** *PLoS Negl Trop Dis* 6(11): e1895. doi:10.1371/journal.pntd.0001895.

Mittler R 2002. **Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance.** *Trends in Plant in Science*, 9:405-410.

McDermott EG, Morris EK, Garver LS 2019. **Sodium Ascorbate as a Potential Toxicant in Attractive Sugar Baits for Control of Adult Mosquitoes (Diptera: Culicidae) and Sand Flies (Diptera: Psychodidae).** *Journal of Medical Entomology*, 56(5), 2019, 1359–1367.

Mello RP 2003. **Chave para identificação das formas adultas das espécies da família Calliphoridae (Diptera, Brachycera, Cyclorrhapha) encontradas no Brasil.** Entomol. Vector. 10, 255–268.

Miward-de-Azevedo EMV, Carraro VM, Carvalho CRP, Brandolinii SVP, Ribeiro EGM, Almeida ATS, Amorium MGR 2000. **Criação de *Chrysomya* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae) em dietas comerciais: abordagem preliminar.** Revista Brasileira de Medicina Veterinária. Rio de Janeiro, 22 (3):113 – 116.

Moraes CS, Lucena SA, Moreira BHS, Brasil RP, Gontijo NF, Genta FA 2012. **Relationship between digestive enzymes and food habit of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) larvae: Characterization of carbohydrases and digestion of microorganisms.** Journal of Insect Physiology **JCR**, v. 58, p. 1136-1145.

Morrison S 2010. **Maggot debridement therapy for laminitis.** Vet Clin Equine 26 447–450.

Muharsini S, Sukarsih Riding G, Partoutomo S, Hamilton S, Willadsen P, Wijffels G 2000. **Identification and characterization of the excreted/secreted serine protease of larvae of the old world screw- worm fly, *Chrysomya bezziana*.** Int J Parasitol; 30:705–14.

Riparbelli MG, Callaini G, Dallai R. 1994. “**Cytoskeletonof larval and adult salivary glands of the dipteran *Ceratitiscapitata*. Implication of microfilaments and microtubules in saliva discharge,**” *Bolletino di Zoologia*, vol. 61, no. 1, pp. 9–17.

Nayduch D & Joyner C 2013. **Expression of Lysozyme in the life history of the house Flay (*Musca domestica* L.).** Journal of Medical Entomology. 50(4): 847-852.

Nepomuceno DB, Santos VC, Araújo RN, Pereira MH, Sant'anna MR, Moreira LA, Gontijo NF 2017. **pH control in the midgut of *Aedes aegypti* under diferente nutritional conditions.** Journal of Experimental Biology **JCR**, v. 220, p. 3355-3362.

Nepomuceno DB, Paim RMM, Araujo RN, Pereira MH, Pessoa GCD, KOERICH, L. B, Santanna MRV, Gontijo NF 2019. **The role of Lulo PAT amino acid/proton symporters in**

mid gut alkalization in the sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera - Psychodidae). Journal of Insect Physiology **JCR**, v. 120, p. 103973.

No Lee J, Kumar R, Maharjan Y, Liu Z, Lim J, Kim S, Cho D, So H, Choe S, Park R 2018. **Biochemical and Biophysical Research Communications Catalase inhibition induces pexophagy through ROS accumulation.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 501: 696–702.

Nuorteva P 1977. **Sarcosaprophagous insects as forensic indicators.** In: **Tedeschi, C.G.; Eckert, W.G. & Tedeschi, L.G. (Eds.), Forensic medicine: A study in trauma and environmental hazards.** Saunders, Philadelphia, v. 2, p. 1072-1095.

Oliveira MF, SILVA JR, Dansa-Petretski M, Souza W, Lins U, Braga CMS, Masuda H, Oliveira PL 1999. **Haem detoxification by an insect.** *Nature*, v. 400, n. 6744, p. 517.

Oliveira JHM, Talyuli OAC, Goncalves RLS, Paiva-Silva GO, Sorgine MHF, Alvarenga PH, Oliveira PL 2017. **Catalase protects *Aedes aegypti* from oxidative stress and increases midgut infection prevalence of Dengue but not Zika.** *PLOS Neglected Tropical Diseases*. Dis 11(4): e 0005525.

Pape T, Wolff M, Amat EC 2004. **Los califóridos, éstridos, rinofóridos y sarcófagidos (Diptera: Calliphoridae, Oestridae, Rhinophoridae, Sarcophagidae) de Colombia.** *Biota Colombiana*, 5 (2004), pp. 201-208.

Paes MC, Oliveira M B, Oliveira PL 2001. **Hydrogen peroxide detoxification in the midgut of the blood-sucking insect, *Rhodnius prolixus*.** *Archives of Insect Biochemistry and Physiology: Published in Collaboration with the Entomological Society of America*, v. 48, n. 2, p. 63-71.

Peterkofsky B & Prather W 1977. **Cytotoxicity of Ascorbate and other reducing agents towards cultured fibroblasts as a result of hydrogen peroxide formation.** *J. Cell. Physiol.*, 90:61-70.

Pires SM, Cárcamo MC, Zimmer CR, Ribeiro PB 2009. **Influência da dieta no desenvolvimento e investimento reprodutivo de *Chrysomya megacephala* (FABRICIUS, 1794) (DIPTERA: CALLIPHORIDAE)**. Arq. Inst. Biol., São Paulo, v.76, n.1, p.41-47.

Queiroz MM DE C, Mello RP, Lima MM 1997. **Morphological Aspects of the Larval Instars of *Chrysomya albiceps* (Diptera, Calliphoridae) Reared in the Laboratory**. MemInst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 92(2): 187-196, Mar./Apr.

Queiroz MM DE C, Oliveira MS, Mello RP 2007. **Morfologia e duração dos ínstares larvais de *Chrysomya putoria* (Wiedemann) (Diptera, Calliphoridae), em laboratório**. Revista Brasileira de Entomologia 51(2): 239-245.

Ramalho-Ortigão JM, Pitaluga NA, Telleria EL, Marques C; Souza AA, Traub-Cseko YM 2007. **Cloning and characterization of a V-ATPase subunit C from the American visceral leishmaniasis vector *Lutzomyia longipalpis* modulated during development and blood ingestion**. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 102: 509-515.

Reigada C & Godoy WAC 2006. **Larval density, temperature and biological aspects of *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae)**. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. [online]. vol.58, n.4, pp.562-566.

Ren, Q., X. Zhao, and J. Wang 2009. **Molecular characterization and expression analysis of a chicken-type lysozyme gene from housefly (*Musca domestica*)**. J. Genet. Genomics. 36: 716.

Ribeiro RC & Milward-de-Azevedo EMV 1997. **Dietas naturais de *Chrysomya albiceps* (WIEDEMANN, 1819: CALLIPHORIDAE): Estudo comparado**. Ciência Rural, Santa Maria, v.27, n. 4, p. 641-644.

Riparbelli MG, Callaini G, Dallai R 1996. **Primordial germ cell migration in the *Ceratitis capitata* embryo**. Tissue & Cell 28: 99-105.

Rotte C, Walz B, & Baumann O 2008. **Morphological and functional characterization of the thoracic portion of blowfly salivary glands.** *Arthrop. Struct. Dev.* 37:372-382.

Santos VC, Araujo RN, Machado LAD, Pereira MH, Gontijo NF 2008. **The physiology of the mid gut of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva 1912): pH in different physiological conditions and mechanisms involved in its control.** *Journal of Experimental Biology JCR*, v. 211, p. 2792-2798.

Santos VC, Nunes CA, Pereira MH, Gontijo NF 2011. **Mechanisms of pH control in the mid gut of *Lutzomyia longipalpis*: roles for ingested molecules and hormones.** *Journal of Experimental Biology JCR*, v. 214, p. 1411-1418.

Sarath, G. De La Monte, R. Wagner, F. 1989. **Protease assay methods. *Proteolytic enzymes: a practical approach*.** Press at Oxford, University Press, cap.3, p.25-55.

Sharma BR, Martin MM, Shafer JA 1984. **Alkaline proteases from the gut fluids of detritus feeding larvae of the crane fly *Tipula abdominalis* (Say) (Diptera: Tipulidae).** *Insect Biochemistry* 14, 37-44.

Sherman RA & Shimoda KJ 2004. **Presurgical Maggot Debridement of Soft Tissue Wounds Is Associated with Decreased Rates of Postoperative Infection.** *Clinical Infectious Diseases*, 39 (7), 1067-1070.

Sherman RA 2014. **Mechanisms of Maggot-Induced Wound Healing: What Do We Know, and Where Do We Go from Here?** *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014, 1-13.

Sousa AGP, Ferraz ACP, Nascimento ALO, Coelho VMA 2010. **Alternative natural diet for the creation of immature oriental latrine flies under controlled conditions.** *Revista Brasileira de Zootecias* 12 (2): 133-140.

Tabouret, G, Bret-Bennis L, Dorchie Ph, Jacquiet P 2003. **Serine protease activity in excretory–secretory products of *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae) larvae.** Vet. Parasitol., 114: 305–314.

Tang Y, Ward RD 1998. **Sugar feeding and fluid destination control in the phlebotomine sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae).** Medical and Veterinary Entomology. n. 12, p. 13-19.

Tappel AL 1955. **Unsaturated lipid oxidation catalyzed by hematin compounds.** The Journal of Biological Chemistry, 217: 721-733.

Tellam RL 1996. **The peritrophic matrix.** In MJ Lehane, PF Billingsley (eds), *Biology of the Insect Midgut*, Chapman & Hall, London, p. 86-114.

Tellam RL & Bowles VM. 1997. **Control of blowfly strike in sheep: current strategies and future prospects.** Int J Parasitol. 27:26173.

Terra WR, Ferreira C, Bianchi de AG 1979. **Distribution of digestive enzymes among the endo and ectoperitrophic spaces and midgut cells of *Rhynchosciaria americana* and its physiological significance.** Journal of Insect Physiology. n. 25, p. 487-494.

Terra W R 1988. **Physiology and biochemistry of insect digestion: an evolutionary perspective.** Brazilian Journal of Medical and Biological Research. n. 21, p. 657-734.

Terra WR 1990. **Evolution of digestive systems of insects.** Annual Review of Entomology. n. 35, p. 181-200.

Terra WR & Ferreira C 1994. **Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function.** *Comparative Biochemistry and Physiology*. n. 109b, p. 1-62.

Terra WR & Regel R 1995. **pH buffering in *Musca domestica* midguts.** Comp. Biochem. Physiol. Vol. 112A, n.3/4, pp. 559-564.

Terra WF, Jordão C, Dillon BR. 1996. **Digestive enzymes.** In: **Lehane, M. Billingsley, P. (Eds.) Biology of Insect Midgut.** Chapman & Hall. The University Press, Cambridge, p.153-186.

Thomas S, Andrews A, Jones M, Church J. 1999 **Maggots are useful in treating infected or necrotic wounds.** BMJ; 318:807–8.

Thyssen PJ, de Souza CM, Shimamoto PM, Salewski, TB & Moretti TC. 2014. **Rates of development of immatures of three species of *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) reared in different types of animal tissues: implications for estimating the postmortem interval.** **Parasitology Research**, v. 113, n. 9, p. 3373–3380.

Undeen AH 1979. **Simuliid larval midgut pH and its implication for control.** *Mosquito News*. n. 39, p. 391-392.

Vale V F Do, Periera M H, Gontijo NF 2007. **Midgut pH profile and protein digestion in the larvae of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae).** *Journal of Insect Physiology JCR*, v. 53, p. 1151-1159.

Vale VF, Moreira BH, Moraes CS, Pereira MH, Genta FA, Gontijo NF 2012. **Carbohydrate digestion in *Lutzomyia longipalpis* larvae (Diptera Psychodidae).** *Journal of Insect Physiology JCR*, v. 58, p. 1314-1324.

Vermelho, A.B.; Bastos, M.C.F 2008.**Bacteriologia geral.** Ed. Guanabara.

Von Zuben CJ, Stangenhuis G, Godoy WAC 2000. **Competição larval em *Chrysomya megacephala* (F.) (DIPTERA: CALLIPHORIDAE): Efeitos de diferentes níveis de agragação larval sobre estimativas de peso, fecundidade e investimento reprodutivo.** *Rev. Brasil. Biol.*, 60 (2):195-203.

Yang, Y. J., & Davies, D. M. 1971. **Trypsin and chymotrypsin during metamorphosis in *Aedes aegypti* and properties of the chymotrypsin.** *Journal of Insect Physiology*, 17 (1), 117–131.

Yeates DK & Wiegmann BM 2005. **The evolutionary biology of flies.** New York: Columbia University Press, 440 p.

Young AR, Meeusen EN, Bowles VM. 1996. **Characterization of ES products involved in wound initiation by *Lucilia cuprina* larvae.** *Int J Parasitol*; 26:245–52.

Wang, Z-Z, Zhan, L-Q, Chen, X-X 2018 **Two types of lysozymes from the whitefly *Bemisia tabaci*: Molecular characterization and functional diversification.** *Developmental and Comparative Immunology*.

Wells JD & Kurahashi H 1994. ***Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera:Calliphoridae) development: Rate, variation, and the implications for forensic entomology.** *Japanese Journal of Sanitary Zoology*, 45(4):303-309.

Zhao JM, Qiu LH, Ning XX, Chen AQ, Wu HF and Li CH. 2010. **Cloning and characterization of an invertebrate type lysozyme from *Venerupis philippinarum*.** *Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol.* 156 56–60.

Zumpt F 1965. **Myiasis in man and animals in the Old World.**, London, Butterworths 267p.