

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

Litiérri Razia Garzon

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE BIOLÓGICA E
IDENTIFICAÇÃO DE COMPONENTES DA SECREÇÃO LARVAL DE
Lucilia cuprina E *Sarconesia chlorogaster* (DIPTERA, CALLIPHORIDAE)
FRENTE À PROTOZOÁRIOS E LINHAGENS CELULARES**

Santa Maria, RS
2022

Litiéri Razia Garzon

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE BIOLÓGICA E IDENTIFICAÇÃO DE COMPONENTES DA SECREÇÃO LARVAL DE *Lucilia cuprina* E *Sarconesia chlorogaster* (DIPTERA, CALLIPHORIDAE) FRENTE À PROTOZOÁRIOS E LINHAGENS CELULARES

Tese de Doutorado apresentado ao curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Área de Concentração em Farmacologia Aplicada Produção Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito parcial para a obtenção de grau de **Doutora em Farmacologia**.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Silvia Gonzalez Monteiro

Santa Maria, RS
2022

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Garzon, Litiérri Razia

Avaliação in vitro da atividade biológica e identificação de componentes da secreção larval de *Lucilia cuprina* e *Sarconesia chlorogaster* (diptera, calliphoridae) frente à protozoários e linhagens celulares / Litiérri Razia Garzon.- 2022.

116 p.; 30 cm

Orientadora: Silvia Gonzalez Monteiro
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós Graduação em Farmacologia, RS, 2022

1. Diptera 2. Protozoários 3. Câncer 4. Citotoxicidade
5. HRMS I. Monteiro, Silvia Gonzalez II. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, LITIÉRRRI RAZIA GARZON, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Tese) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Litiérri Razia Garzon

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE BIOLÓGICA E IDENTIFICAÇÃO DE COMPONENTES DA SECREÇÃO LARVAL DE *Lucilia cuprina* E *Sarconesia chlorogaster* (DIPTERA, CALLIPHORIDAE) FRENTE À PROTOZOÁRIOS E LINHAGENS CELULARES

Tese de Doutorado apresentado ao curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Área de Concentração em Farmacologia Aplicada Produção Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito parcial para a obtenção de grau de **Doutora em Farmacologia**.

Aprovado em 16 de dezembro de 2022:

Silvia Gonzalez Monteiro, Dra. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Camila Belmonte Oliveira, PhD. (UFPEL)

Luciana Maria Fontanari Krause, PhD. (UFSM)

Hecson Jesser Segat, Dr. (Unipampa)

Matheus Dellaméa Baldissera, Dr. (UFSM)

Santa Maria, RS
2022

*Aos meus pais, Neusa e Antônio Carlos
e ao meu parceiro de vida, Hugo.
Às pessoas enfermas, que depositam na ciência a esperança de sua cura.*

AGRADECIMENTOS

Neste momento é difícil encontrar as palavras certas para agradecer tantas pessoas especiais que fazem parte da minha trajetória, mas deixo registrado meu profundo agradecimento.

Minha imensa gratidão à Deus, ao meu anjo da guarda e todos santos por me darem força e coragem para chegar até aqui.

Agradeço especialmente aos meus pais pelo apoio incondicional. A minha mãe Neusa, por me divertir e estar sempre disposta a me consolar com palavras de carinho e motivar para continuar na direção dos meus sonhos; ao meu pai Antônio, por me dar apoio e incentivo nesta caminhada e também por me lembrar todos os dias o quanto eu já desejei este momento que vivo hoje.

Ao meu amor, Hugo, pelos dias de plena felicidade e realização onde tu é “sobre ser” e por me impulsionar nessa busca pelo almejado título. Por sempre compreender minha ausência e os dias difíceis. Que junto a família, que agora também é minha, permite viver os melhores dias e me ensinou que amar nunca é demais.

Às minhas amigas-irmãs de uma vida inteira, por saberem a importância de hoje desde que isso era só um futuro distante. E também amigos que chegaram ao longo dessa caminhada e que hoje são essenciais na minha vida, que foram “lar” quando eu mais precisei, por sempre estarem presentes e tornarem meus dias mais leves e completos. Em especial aos que estiveram comigo nesta fase final e por me permitirem entender que “o sangue não significa nada quando o laço maior é o amor”.

A todas os colegas do Laboratório de Parasitologia Veterinária – LAPAVET pelo companheirismo, apoio, carinho e cumplicidade.

Em especial ao Fracasso que nunca largou minha mão, assim com Altevir, doaram tempo, trabalho, dedicação, apoio e sobretudo amizade.

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Silvia Gonzalez Monteiro, por me conceder a oportunidade e colaborar na realização deste trabalho.

Ao CNPq, por possibilitar a execução deste trabalho por meio da bolsa concedida, permitindo minha total dedicação ao Curso de Pós-Graduação;

Ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia UFSM, por permitir a realização de mais uma etapa de minha vida profissional.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor,
mas lutei para que o melhor fosse feito”

Martin Luther King

RESUMO

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE BIOLÓGICA E IDENTIFICAÇÃO DE COMPONENTES DA SECREÇÃO LARVAL DE *Lucilia cuprina* E *Sarconesia chlorogaster* (DIPTERA, CALLIPHORIDAE) FRENTE À PROTOZOÁRIOS E LINHAGENS CELULARES

AUTORA: Litiérri Razia Garzon
ORIENTADORA: Silvia Gonzalez Monteiro

Dípteros da família Calliphoridae desempenham um papel importante em análises forenses, veterinárias e ciência médica. Seu uso em bioterapia é bem conhecido e importante devido à atividade biológica das larvas e aos constituintes da sua secreção que ajudam na cicatrização de tecidos. Uma vantagem do uso da secreção larval, é a baixa toxicidade em células normais, pouco ou nenhum efeito colateral com baixo custo para produção. Este trabalho avaliou a atividade biológica *in vitro* da secreção larval de *L. cuprina* e *S. chlorogaster* em protozoários e linhagens celulares. No primeiro estudo a secreção de *L. cuprina* foi avaliada frente à promastigotas de *L. amazonensis*, epimastigotas de *T. cruzi*, linhagem tumoral B16-F10 e não tumoral HFF-1 para avaliar citotoxicidade e segurança. Os resultados revelaram que a secreção foi eficaz em reduzir a viabilidade dos parasitas e células tumorais. Também mostrou-se segura frente à linhagem de fibroblastos. No segundo estudo foram avaliadas as secreções de *L. cuprina* e *S. chlorogaster* frente à outras linhagens de células tumorais (A549, A375 e Hela), atividade antiproliferativa, clivagem de DNA e identificação dos constituintes por espectrometria de massas. Os resultados mostraram a capacidade de *L. cuprina* em reduzir a viabilidade celular e aumentar de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio frente às linhagens tumorais A549, A375 e HeLa, nas concentrações de 0,1, 0,25, 0,5, 1, 2, 5 e 10%, em todos os testes aplicados VN, ON, MTT, LDH, Aderência e DCFH-DA. Ambas as secreções exerceram atividade antiproliferativa e foram hábeis à clivar DNA plasmidial. Em relação à análise dos constituintes foi possível identificar componentes como ácido graxo, valina cembranoid, estearoil-histidina e tripeptídeo na secreção de *L. cuprina*. Já a secreção de *S. chlorogaster* apresentou estruturas químicas não reconhecidas no banco de dados, sugerindo possibilidade de componentes inéditos. Tomados em conjunto, os resultados apresentados demonstram que a secreção de dípteros torna-se um importante recurso a ser analisado devido a suas propriedades biológicas com ação *in vitro* contra protozoários e carcinomas.

Palavras-chave: Diptera. Protozoários. Câncer. Citotoxicidade. HRMS.

ABSTRACT

IN VITRO EVALUATION OF BIOLOGICAL ACTIVITY AND IDENTIFICATION OF LARVAL SECRETION COMPONENTS OF *Lucilia cuprina* AND *Sarconesia chlorogaster* (DIPTERA, CALLIPHORIDAE) AGAINST PROTOZOANS AND CELL LINES

AUTHOR: Litiérri Razia Garzon
ADVISOR: Silvia Gonzalez Monteiro

Diptera of the *Calliphoridae* family play an important role in forensic analysis, veterinary and medical science. Its use in biotherapy is well known and important due to the biological activity of the larvae and the constituents of their secretion that help in tissue healing. An advantage of using larval secretion is the low toxicity in normal cells, little or no side effects with low production cost. This work evaluated the in vitro biological activity of larval secretion of *L. cuprina* and *S. chlorogaster* in protozoa and cell lines. In the first study, the secretion of *L. cuprina* was evaluated against *L. amazonensis* promastigotes, *T. cruzi* epimastigotes, B16-F10 tumor lineage and HFF-1 non-tumor cell lineage to evaluate cytotoxicity and safety. The results revealed that the secretion was effective in reducing the viability of parasites and tumor cells. It also proved to be safe against the fibroblast lineage. In the second study, secretions of *L. cuprina* and *S. chlorogaster* were evaluated against other tumor cell lines (A549, A375 and Hela), antiproliferative activity, DNA cleavage and identification of constituents by mass spectrometry. The results showed the ability of *L. cuprina* to reduce cell viability and increase reactive oxygen and nitrogen species against tumor cell lines A549, A375 and HeLa in all tests applied VN, ON, MTT, LDH, Adherence and DCFH-DA. Both secretions exerted antiproliferative activity and were able to cleave plasmid DNA. Regarding the analysis of the constituents, it was possible to identify components such as fatty acid, cembranoid valine, stearylhistidine and tripeptide in the secretion of *L. cuprina*. The secretion of *S. chlorogaster* presented chemical structures not recognized in the database, suggesting the possibility of unpublished components. Taken together, the presented results demonstrate that dipteran secretion becomes an important resource to be analyzed due to its biological properties with in vitro action against protozoa and carcinomas.

Keywords: Diptera. Protozoa. Cancer. Cytotoxicity. HRMS.

LISTA DE FIGURAS

REFERENCIAL TEÓRICO

Figura 1 – Fêmea de flebotomíneo ingurgitada – <i>Lutzomyia</i>	23
Figura 2 – Formas evolutivas <i>Leishmania sp.</i> A. Promastigota. B. Amastigota.....	24
Figura 3 – Ciclo biológico das leishmanioses no interior do inseto vetor e do mamífero hospedeiro.....	25
Figura 4 – Ciclo biológico do <i>Trypanosoma cruzi</i> no interior do inseto vetor e do mamífero hospedeiro	31
Figura 5 – Formas evolutivas do <i>Trypanosoma cruzi</i> . A. Tripomastigota de <i>T. cruzi</i> em um esfregaço de sangue fino corado com Giemsa. B. Epimastigota de <i>T. cruzi</i> de cultura. C. Amastigotas de <i>T. cruzi</i> em tecido cardíaco corado com hematoxilina e eosina	32
Figura 6 – Incidência de melanoma. Taxa estimada por Estado/Capital, Brasil – 2020/2022.....	37
Figura 7 – Incidência de neoplasia maligna dos pulmões. Taxa estimada por Estado/Capital, Brasil – 2020/2022	40
Figura 8 – Incidência de neoplasia maligna do colo do útero. Taxa estimada por Estado/Capital, Brasil – 2020/2022	42
Figura 9 – Mosca da espécie <i>Lucilia cuprina</i> (Diptera: <i>Calliphoridae</i>).....	48
Figura 10 – Mosca da espécie <i>Sarconesia chlorogaster</i> (Diptera: <i>Calliphoridae</i>).....	50

ARTIGO

Figure 1. Antiprotozoal activity of larval secretion of <i>L. cuprina</i> in vitro against promastigote forms of <i>L. amazonensis</i>	63
Figure 2. Antiprotozoal activity of larval secretion of <i>L. cuprina</i> in vitro against epimastigote forms of <i>T. cruzi</i>	64
Figure 3. Colorimetric cytotoxicity assays in non-tumor line HFF-1.....	64
Figure 4. Colorimetric cytotoxicity assays in the murine melanoma tumor line B16-F10. Results expressed as a percentage of the negative control (100%).....	65
Figure 5. Fluorimetric assays for quantification of dsDNA and dichlorofluorescein in the murine melanoma tumor line B16-F10	65

MANUSCRITO

- Figure 1. Cell line A549 exposed to different concentrations of *Lucilia cuprina* larval secretion (0.1%, 0.25%, 0.5%, 1%, 2%, 5% and 10%) at incubation 24 hours. The different assays A: Neutral Red; B: Nitric Oxide; C: MTT; D: Lactate dehydrogenase; E: Adherence and F: Dichlorofluorescein. Results expressed as a percentage in relation to the negative control *p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001.....76
- Figure 2. Cell line A375 exposed to different concentrations of *Lucilia cuprina* larval secretion (0.1%, 0.25%, 0.5%, 1%, 2%, 5% and 10%) at incubation 24 hours. The different assays A: Neutral Red; B: Nitric Oxide; C: MTT; D: Lactate dehydrogenase; E: Adherence and F: Dichlorofluorescein. Results expressed as a percentage in relation to the negative control (cells + culture medium) *p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001.....78
- Figure 3. Cell line HeLa exposed to different concentrations of *Lucilia cuprina* larval secretion (0.1%, 0.25%, 0.5%, 1%, 2%, 5% and 10%) at incubation 24 hours. The different assays A: Neutral Red; B: Nitric Oxide; C: MTT; D: Lactate dehydrogenase; E: Adherence and F: Dichlorofluorescein. Results expressed as a percentage in relation to the negative control (cells + culture medium) *p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001.....79
- Figure 4. Cell line A549 exposed to different concentrations of *Sarconesia chlorogaster* larval secretion (0.1%, 0.25%, 0.5%, 1%, 2%, 5% and 10%) at incubation 24 hours. The different assays A: Neutral Red; B: Nitric Oxide; C: MTT; D: Lactate dehydrogenase; E: Adherence and F: Dichlorofluorescein. Results expressed as a percentage in relation to the negative control (cells + culture medium) *p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001.....80
- Figure 5. Cell line A375 exposed to different concentrations of *Sarconesia chlorogaster* larval secretion (0.1%, 0.25%, 0.5%, 1%, 2%, 5% and 10%) at incubation 24 hours. The different assays A: Neutral Red; B: Nitric Oxide; C: MTT; D: Lactate dehydrogenase; E: Adherence and F: Dichlorofluorescein. Results expressed as a percentage in relation to the negative control (cells + culture medium) *p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001.....81
- Figure 6. Cell line HeLa exposed to different concentrations of *Sarconesia chlorogaster* larval secretion (0.1%, 0.25%, 0.5%, 1%, 2%, 5% and 10%) at incubation 24 hours. The different assays A: Neutral Red; B: Nitric Oxide; C: MTT; D: Lactate

	dehydrogenase; E: Adherence and F: Dichlorofluorescein. Results expressed as a percentage in relation to the negative control (cells + culture medium) *p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001.....	82
Figure 7.	Cell lines A. A549, B. A375 and C. HeLa exposed to different concentrations of <i>Lucilia cuprina</i> and <i>Sarconesia chlorogaster</i> larval secretion (0.1%, 0.25%, 0.5%, 1%, 2%, 5% and 10%) at incubation 72 hours. Results expressed as a percentage in relation to the negative control (cells + culture medium) *p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001.....	83
Figure 8.	Plasmid DNA exposed to different concentrations of <i>Lucilia cuprina</i> and <i>Sarconesia chlorogaster</i> larval secretion (0.1%, 0.25%, 0.5%, 1%, 2%, 5% and 10%) at incubation 72 hours. Results expressed as a breaks /kpb to the negative control (DNA + Tris-HCl) *p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001.	84
Figure 9.	Results expressed for mass spectrum of larval secretion of the dipteran <i>Lucilia cuprina</i> obtained by mass spectrometry – HRMS.....	85
Figure 10.	Results expressed for mass spectrum of larval secretion of the dipteran <i>Lucilia cuprina</i> obtained by mass spectrometry – HRMS.	85

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO

Table 1. Identification of the chemical compounds present in <i>Lucilia cuprina</i> and <i>Sarconesia chlorogaster</i> larval secretions by ESI-ToF-MS (positive ionization mode, [M-H] ⁺).....	86
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
BNZ	Benznidazol
CA	Câncer
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
cm	Centímetros
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CO ₂	Dióxido de Carbono
DC	Doença de Chagas
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNDi	<i>Drug for Neglected Disease initiative</i>
DTNs	Doenças Tropicais Negligenciadas
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
ER	Espécies Reativas
H	Hidrogênio
H	Horas
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LIT	<i>Liver Infusion Triptose</i>
MS	Ministério da Saúde
mg/L	Miligrama/litro
mL	Mililitros
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
N	Nitrogênio
NF	Nifurtimox
O	Oxigênio
°C	Graus Celsius
OH	Radical Hidroxil
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>

pH	Potencial Hidrogeniônico
RPMI	<i>Roswel Park Memorial Institute Medium</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
SL	Secreção Larval
TL	Terapia Larval
UFSM	Universidade Federal de Santa Maria
µg	Microgramas
µL	Microlitros

SUMÁRIO

	APRESENTAÇÃO.....	16
1	INTRODUÇÃO.....	17
2	JUSTIFICATIVA.....	19
3	OBJETIVOS.....	20
3.1	OBJETIVO GERAL.....	20
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
4	REFERENCIAL TEÓRICO.....	21
4.1	LEISHMANIOSES.....	21
4.1.1	Vetor, hospedeiro, ciclo biológico e transmissão.....	23
4.1.2	Diagnóstico e tratamento.....	26
4.2	DOENÇA DE CHAGAS (DC).....	28
4.2.1	Vetor, hospedeiro, ciclo biológico e transmissão.....	29
4.2.2	Diagnóstico e tratamento.....	32
4.3	CÂNCER (CA): ASPECTOS GERAIS.....	34
4.3.1	Melanoma: doença, incidência e tratamento.....	35
4.3.2	Câncer de pulmão: doença, incidência e tratamento.....	38
4.3.3	Câncer de colo de útero: doença, incidência e tratamento.....	40
4.4	DÍPTEROS E A SECREÇÃO LARVAL.....	42
4.4.1	<i>Lucilia cuprina</i>.....	46
4.4.2	<i>Sarconesia chlorogaster</i>.....	48
5	PRODUÇÃO CIENTÍFICA.....	51
5.1	ARTIGO I – IN VITRO ACTIVITY OF LARVAL SECRETIONS FROM LUCILIA CUPRINA AGAINST LEISHMANIA AMAZONENSIS, TRYPANOSOMA CRUZI AND CELL LINES.....	51
5.2	MANUSCRITO I – BIOLOGICAL ACTIVITY, ANTITUMOR POTENTIAL AND CONSTITUENTS OF LARVAL SECRETION EXTRACTED FROM LUCILIA CUPRINA AND SARCONESIA CHLOROGASTER.....	69
6	DISCUSSÃO.....	96
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	100
	REFERÊNCIAS.....	101

APRESENTAÇÃO

Esta tese de doutorado está estruturada da seguinte forma: Introdução, Justificativa, Objetivos, Referencial Teórico, Produção Científica, Discussão Geral, Considerações Finais e Referências.

Os Resultados estão apresentados sob a forma de publicações científicas, composto por um artigo e um manuscrito, os quais se encontram no item Produção Científica. As seções Material e Métodos, Resultados, Discussão e Referências encontram-se no próprio artigo e manuscrito.

O item Referências, ao final da tese, refere-se somente às citações que aparecem nos itens Introdução, Referencial Teórico e Discussão Geral.

1 INTRODUÇÃO

A Leishmaniose e doença de Chagas (DC) estão inclusas na lista de doenças tropicais negligenciadas (DTNs) emitida pela Organização Mundial de Saúde (OMS/WHO), as quais afetam milhões de pessoas no mundo todo, sendo endêmicas na América latina, continente onde são consideradas um problema de saúde pública grave. Essas endemias afetam crescentemente o mundo de forma incisiva e o Brasil é um dos países que mais sofre com o descaso dessas enfermidades. Contudo, a globalização, migração populacional, viajantes e alteração demográfica acabam contribuindo para a expansão dessas parasitoses também para regiões não endêmicas (BATISTA, 2010; BRASIL, 2017; SOUZA, 2019).

Tal importância epidemiológica não reflete o empenho em desenvolver novos fármacos para o tratamento dessas protozooses, uma necessidade, já que os fármacos disponíveis, apresentam ineficácia, efeitos colaterais e alta toxicidade. O tratamento introduzido para Leishmaniose na década de 40, utilizando antimoniais pentavalentes, ainda hoje, é tido como o de primeira escolha, (BRASIL, 2017; FURINI, 2016; ROTTINI et al., 2015; SAADI et al., 2020; TUNES, 2019) e no Brasil, apesar da grande demanda, apenas o Benznidazol® (BNZ) está disponível para o tratamento da DC. Apesar da eficácia comprovada na fase aguda da doença, o tratamento com estes compostos apresentou problemas como toxicidade, ineficácia na fase crônica e necessidade da administração por longo período de tempo. Além disso, há registro de cepas do *Trypanosoma cruzi* que apresentam resistência natural ou selecionada pelo uso prolongado desse fármaco (BRASIL, 2017; MENEZES, 2013; SILVA, 2016; SOUZA, 2019; TUNES, 2019).

Mesmo que existam avanços realizados nos últimos anos na questão da quimioterapia, os fármacos atualmente disponíveis possuem limitações como via de administração, uso prolongado, alto custo para o Sistema Único de saúde (SUS), toxicidade, eficácia e resistência tanto para essas protozooses como no tratamento do câncer (CA). Este que também tem impacto na área da saúde pelos mesmos motivos, agravado por ser a segunda maior causa de morte no mundo. Tendo em vista que a maior parte das drogas antineoplásicas produzidas são de origem natural ou de seus derivados (NEWMAN; CRAGG, 2016), evidencia-se o potencial dos metabólitos oriundos de plantas no desenvolvimento de novos fármacos. Os primeiros medicamentos antineoplásicos derivados de produtos naturais, como o paclitaxel (Taxol®) (EID et al., 2015) e o etoposídeo (Etopophos®) comprovam a aplicabilidade e eficácia desses metabólitos no tratamento do CA, assim como tantos outros compostos naturais que apresentam

atividade antiproliferativa em linhagens tumorais, além dos efeitos antioxidante, antiinflamatório e desinfetante (DUGASANI et al., 2010; KAUR; VERMA, 2015).

As altas taxas de incidência, morbidade e mortalidade são os pontos em comum das doenças em questão. Embora os resultados das pesquisas voltadas para esses tratamentos estejam em evolução, acabam sendo insuficientes quando comparados ao amplo espectro de manifestações clínicas. Sabe-se que para a aprovação de uma nova droga é necessário um perfil de segurança nos ensaios clínicos, muitas vezes à custa de centenas de milhões de dólares, envolvendo milhares de pacientes e um período de tempo que não se tem para salvar uma vida (ARROWSMITH, 2011; CFF, 2019; INCA, 2020; ZHANG; CHEN, 2012).

Considerando as etapas da pesquisa experimental e da pesquisa clínica, o tempo total de desenvolvimento de um novo medicamento pode ultrapassar 10 anos. Podemos dizer que de cada 10.000 moléculas testadas, apenas uma se torna um medicamento que será comercializado. Não surpreendentemente, poucas drogas conseguem emergir como promissor candidato para a quimioterapia de leishmanioses, DC e CA (ALI; BHATTACHARYA, 2014; BRASIL, 2017; CFF, 2019; INCA, 2020; TUNES, 2019).

Neste contexto, é importante ressaltar que o uso de larvas de dípteros no tratamento de diversos tipos de feridas na pele e nos tecidos moles já é amplamente utilizado pois as mesmas, secretam um amplo espectro de substâncias que estão intimamente envolvidas na cicatrização das lesões (CRUZ-SAAVEDRA et al., 2016; DÍAZ-ROA et al., 2018; POLAT et al., 2012).

Essas moscas têm se tornado promissoras em bioterapia devido à atividade biológica das suas larvas e aos constituintes da sua saliva com potencial bactericida, antiprotozoária, antiparasitária e fungicida. Além disso, estudos recentes comprovaram a capacidade da secreção larval agir também sobre linhagem celular de diversas doenças (AL-SAEED; MAHMOOD, 2012; ARRIVILLAGA; RODRÍGUEZ; OVIEDO, 2008; BEXFIELD et al., 2004; MUMCUOGLU, 2001; POLAT et al., 2012; SANEI-DEHKORDI et al., 2016; SHERMAN 2014; THOMAS et al., 1999; YI et al., 2014).

A grande vantagem do uso de compostos naturais, como a secreção larval, é a baixa toxicidade, pouco ou nenhum efeito colateral além de ter baixo custo para produção. Vantajosa também pela fácil manutenção das colônias de dípteros. Nessa perspectiva, devido à grande versatilidade, propriedades farmacológicas demonstradas e considerando que a busca por um tratamento mais específico e menos tóxico é incentivada, a secreção larval de dípteros como *Lucilia cuprina* e *Sarconesia chlorogaster* torna-se um importante recurso a ser analisado por suas características e constituintes, ainda não elucidados claramente, justificando nossa investigação.

2 JUSTIFICATIVA

Leishmanioses e DC são doenças parasitárias com grande impacto para a humanidade por serem antropozoonoses negligenciadas de elevada prevalência e expressiva morbimortalidade. Além disso, é crescente o número de casos de cânceres no mundo, outra enfermidade relevante devido a sua malignidade e alta taxa de mortalidade. Apesar de bem estabelecida e dos importantes avanços nos últimos anos, as terapias usuais ainda são realizadas com os mesmos fármacos há décadas, e estes, possuem limitações como variabilidade de resposta terapêutica, refratariedade, baixa eficácia em alguns casos, graves efeitos colaterais, longa duração, dificuldade de administração e toxicidade.

Nesse contexto, a busca por terapias eficazes e menos tóxicas são fortalecidas e a realização de estudos com esse enfoque pode oferecer opções de tratamento com pouco ou nenhum efeito colateral. Baseado em estudos que atribuem aos dípteros potencial terapêutico, este trabalho reforça a importância de investigar a secreção larval de *L. cuprina* e *S. chlorogaster* na descoberta de novas substâncias bioativas que possam desempenhar importante papel como recurso terapêutico no controle e tratamento de protozooses e carcinomas.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade biológica e identificar componentes da secreção larval de *L. cuprina* e *S. chlorogaster*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Cultivar colônias de *L. cuprina* e *S. chlorogaster* em condições de laboratório;
- Extrair a secreção larval de terceiro ínstar;
- Estabelecer o cultivo *in vitro* de formas promastigotas de *L. amazonensis* e epimastigotas de *T. cruzi*;
- Avaliar a atividade antiprotozoária *in vitro* da secreção larval de *L. cuprina* frente à *L. amazonensis* e *T. cruzi*;
- Avaliar a citotoxicidade, a segurança e investigar indícios sobre possíveis mecanismos envolvidos na atividade da secreção larval de *L. cuprina* frente à linhagem tumoral B16F10 de melanoma e linhagem não tumoral HFF-1 de fibroblasto humano *in vitro*;
- Avaliar a atividade citotoxicidade e antiproliferativa de *L. cuprina* e *S. chlorogaster* frente à linhagem celular tumoral A549, A375 e HeLa;
- Avaliar a capacidade de clivagem do DNA plasmidial das secreções larvais de *L. cuprina* e *S. chlorogaster*;
- Identificar os componentes das secreções larvais de *L. cuprina* e *S. chlorogaster* por meio de uma varredura através de espectrometria de massa- HRMS.

4 REFERENCIAL TEÓRICO

4.1 LEISHMANIOSES

As leishmanioses são um complexo de doenças infecciosas com importante diversidade clínica e epidemiológica, cuja transmissão envolve diversas espécies de hospedeiros mamíferos, além de seus vetores, causadas por protozoários flagelados da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae do gênero *Leishmania*. São parasitos obrigatórios e possuem ciclo biológico heteroxênico, necessitando de um hospedeiro vertebrado e outro invertebrado (BRASIL, 2017; MONTEIRO, 2017).

São antropozoonoses consideradas um grande problema de saúde pública e representam um complexo de doenças com importante espectro clínico e diversidade epidemiológica. A OMS estima que cerca de 350 milhões de pessoas estejam expostas aos flagelados, com registro aproximado de dois milhões de novos casos das diferentes formas clínicas ao ano no mundo todo. As estimativas mostram casos, mas não levam em consideração as deformidades e consequências causadas pelas formas cutâneas e mucocutâneas, que muitas vezes deixam sequelas físicas e psicossociais (BRASIL, 2017; WHO, 2013).

Entre outras parasitoses, as leishmanioses fazem parte da lista de doenças tropicais negligenciadas (DTNs) que prevalecem em condições tropicais e subtropicais em 149 países. Nesse sentido vale ressaltar que é uma doença de notificação compulsória na maioria dos países. Entretanto, estima-se que muitas pessoas e animais infectados não sabem que possuem a doença por falta de um diagnóstico adequado (BRASIL, 2017).

Embora seja muito disseminada, o controle desta doença ainda caracteriza um desafio mundial, principalmente dentro de áreas endêmicas onde muitas vezes as condições precárias e o quadro de desigualdade social aumentam o risco das pessoas contraírem a infecção e a gravidade do quadro clínico (BRASIL, 2017; REIMANN, 2018). Uma vez que o real fardo social e econômico da atual situação da leishmaniose é subestimado, já que os estudos de levantamento de dados leva em consideração a notificação e apenas os gastos com o tratamento dos pacientes, enquanto na verdade a maioria das pessoas afetadas vive em áreas remotas e não busca ou não tem acesso à assistência médica (OPAS, 2019; WHO, 2013).

Sabe-se que a patogenicidade e a apresentação clínica da doença variam conforme a espécie envolvida, a carga parasitária e o estado imunológico do hospedeiro (CASTRO, 2010; SILVA, 2009). Consta que 20 espécies de *Leishmania sp.* são tradicionalmente classificadas pela sua sintomatologia clínica (BERN; MAGUIRE; ALVAR, 2008), espécie e imunidade do

hospedeiro, variando de formas cutâneas (disseminada, difusa ou mucosa) a forma visceral (COUTINHO et al., 2001).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) classifica as leishmanioses em quatro formas clínicas: cutânea, mucosa, difusa e visceral. As formas tegumentares são traduzidas clinicamente por úlceras no ponto da inoculação - Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) - ou formas viscerais – Calazar (LV) (BRASIL, 2017; SAMPAIO, 2017; SOUZA, 2012).

A LV é a forma mais grave da doença, acomete órgãos internos gerando febre, perda de peso e hepatoesplenomegalia, e se não tratada é fatal. Não raro, após o tratamento, pode evoluir para uma forma cutânea dérmica (WHO, 2013). Diferentemente da LV, a LTA não é uma doença letal. No entanto, a sua importância reside nas consequências e no quadro clínico gerado no hospedeiro, pois é deformante e traumática resultando em grande impacto tanto no campo sanitário, social e econômico (AUWERA; DUJARDIN, 2015; BRASIL, 2017; GARBIN et al., 2017).

As principais formas clínicas encontradas nas Américas são: cutânea, cutânea-mucosa, cutânea-difusa. No Brasil, as formas cutâneas são mais comuns. As principais espécies de vetores encontrados aqui são causadoras de leishmaniose tegumentar, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis* *Leishmania (Viannia) guyanensis* (ARAÚJO, 2014; LAINSON; SHAW, 1998).

No Brasil, a LTA é uma das afecções dermatológicas que merece mais atenção, devido à sua magnitude, assim como pelo risco de ocorrência de deformidades que pode ocasionar e também pelo envolvimento psicológico, com reflexos no campo social e econômico, uma vez que, na maioria dos casos, pode ser considerada uma doença ocupacional (BRASIL, 2017; TUNES, 2019).

A forma clínica da lesão inicial é caracterizada por uma pápula no local da inoculação, geralmente braços, pernas e face, com um período de incubação que pode variar de semanas, meses até um ano, que progride lentamente para um nódulo, ainda com a epiderme intacta onde há a presença de muitos parasitos e macrófagos. As lesões se restringem a pele e a quantidade de lesões depende das múltiplas picadas do flebotomíneo, geralmente apresentam uma única lesão inicialmente pequena, consistente eritematosa podendo agravar-se formando uma úlcera (3 a 12 cm) caracterizando a clássica borda em moldura com borda elevada, grosseira e fundo com tecido de granulação, que sangra facilmente (ARAÚJO, 2014; GONTIJO; CARVALHO, 2003).

No Brasil, a LTA apresenta-se em fase de expansão geográfica. Nas últimas décadas, estudos epidemiológicos de LTA têm sugerido mudanças no comportamento epidemiológico

da doença. Em Santa Maria, RS, a situação é ainda mais preocupante. De acordo com a Superintendência de Vigilância em Saúde, de janeiro a novembro de 2019, o setor recebeu nove notificações de veterinários, de animais que apontaram positivo no primeiro teste feito em consultórios particulares. A Vigilância encaminhou amostras de sangue desses cães, para análise no Laboratório Central de Saúde Pública do Rio Grande do Sul (Lacen/RS) para confirmação. Em 2017, foram registradas 97 notificações, das quais 20 retornaram do laboratório com a confirmação da doença (PIEGAS, 2019).

Outro agravante é a não existência de dados robustos acerca do número de casos de LTA e LV, na nossa região, enfraquecidos pela pandemia que vivemos. Por conta disso, a cidade e os municípios da região são consideradas uma área de transmissão de leishmaniose canina (JOHAN, 2021).

4.1.1 Vetor, hospedeiro, ciclo biológico e transmissão

A transmissão dos parasitos ocorre pela picada de flebotomíneos, da ordem Diptera: Psychodidae, da Subfamília Phlebotominae. Nas Américas, a principal espécie de flebotomíneo envolvida é *Lutzomyia longipalpis*, insetos pequenos, de 2 a 4 mm de comprimento, de cor palha ou marrom claro popularmente conhecido no Brasil como “mosquito palha” anjinho, cangalhinha, birigui, flebóti, entre outros (Figura 1) (BRASIL, 2017; MONTEIRO, 2017; WHO, 2010).

Figura 1 – Fêmea de flebotomíneo ingurgitada – *Lutzomyia*

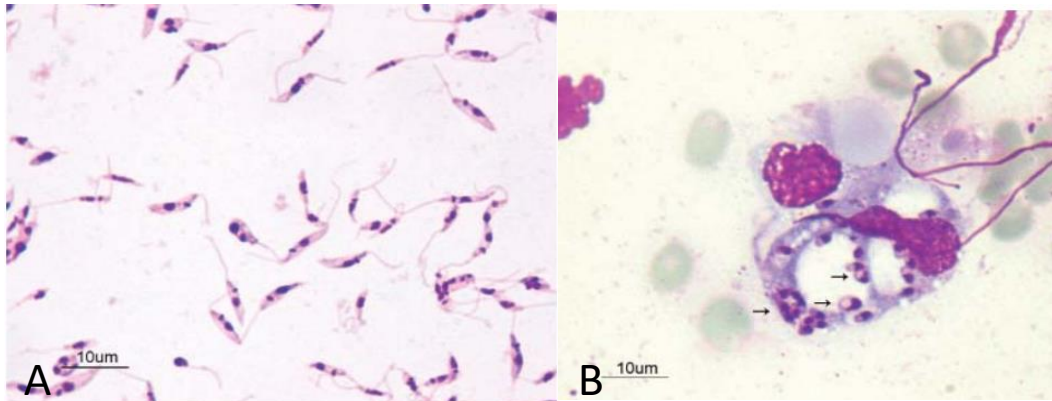


Fonte: IOC - Fiocruz, Brasil, 2017.

Várias espécies de mamíferos domésticos ou selvagens podem ser infectados com *Leishmania* e podem ser considerados reservatórios da doença. Reservatórios são aqueles indispensáveis para a manutenção do parasito no ambiente e transmissão ao homem, hospedeiros é quem pode se infectar, mas não tem papel fundamental na manutenção do ciclo (TUNES, 2019). Segundo Ministério da Saúde (BRASIL, 2015b) é qualquer espécie animal que consiga manter a *Leishmania sp.* circulante no seu organismo e na natureza em determinado tempo e espaço, portanto, encontrar somente o DNA da *Leishmania sp.* não é suficiente para considerá-lo um reservatório pois é preciso manter o parasito na natureza (BRASIL, 2015a).

Durante o ciclo de vida, os parasitos são encontrados no tubo digestivo do inseto vetor que inocula formas promastigotas (que é flagelada e móvel) (Figura 2A). A forma amastigota (Figura 2B), ovalada e sem flagelo, fica nos fagolisossomos de macrófagos do hospedeiro vertebrado. Embora macrófagos sejam o principal tipo de célula infectada, outras como fibroblastos e neutrófilos também estão susceptíveis e desempenham papel fundamental no controle da infecção (MONTEIRO, 2017; OPAS, 2019).

Figura 2 – Formas evolutivas *Leishmania sp.* A. Promastigota. B. Amastigota

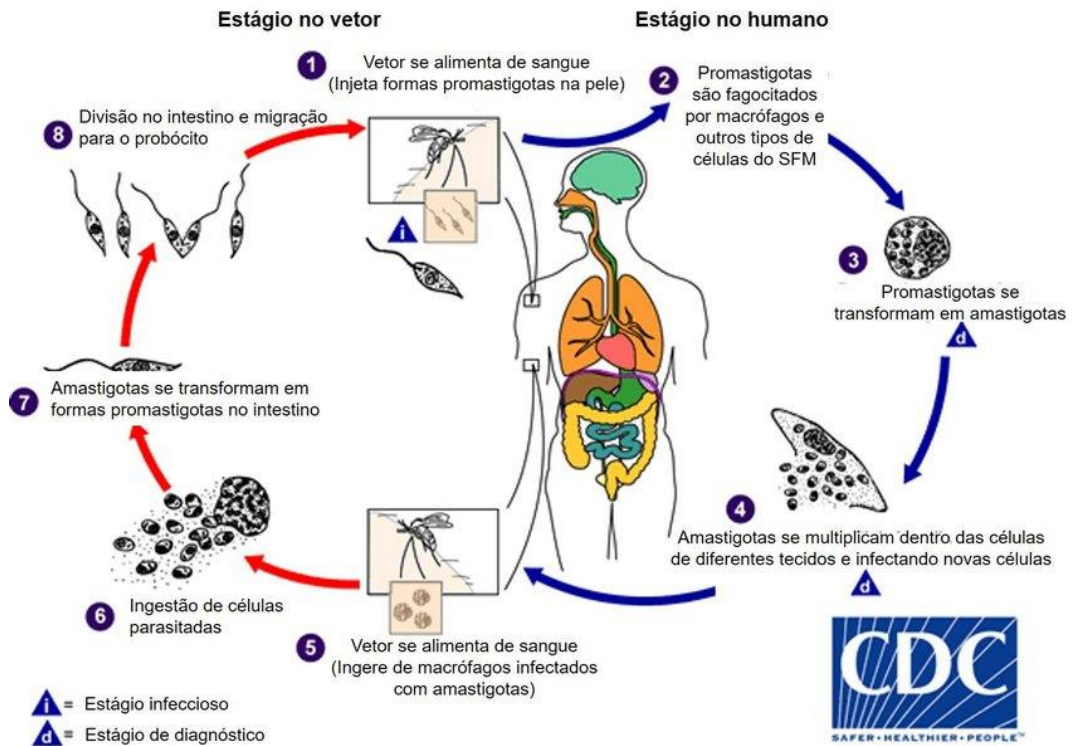


Fonte: adaptado CLIOC – IOC – Fiocruz, Brasil, 2017.

As formas promastigotas migram em direção a probóscida do inseto e são regurgitadas durante o repasto sanguíneo na pele do hospedeiro. São fagocitadas por macrófagos, transformam-se em amastigotas, multiplicam-se por divisão binária até o rompimento da célula para liberação dos parasitos e nova infecção de células. O ciclo se completa quando os flebotomíneos ingerem sangue contendo macrófagos infectados com amastigotas que no

interior do inseto se transformam novamente em promastigotas (Figura 3) (BRASIL, 2017; MEIRELES et al., 2017).

Figura 3 – Ciclo biológico das leishmanioses no interior do inseto vetor e do mamífero hospedeiro



Fonte: adaptado CDC - Center of Disease Control and Prevention, 2020.

Após a inoculação, as promastigotas precisam sobreviver aos mecanismos inatos de defesa do hospedeiro. As mudanças bioquímicas ocorridas nesse momento conferem às promastigotas uma resistência aumentada em relação à lise movida pelo sistema complemento. Quando as promastigotas são introduzidas na pele, encontram neste local algumas células do sistema imune com linfócitos T e B, macrófagos residentes, células de Langerhans e mastócitos, que formam um compartimento de defesa bastante específico, o sistema imune da pele. Por um mecanismo ainda não totalmente esclarecido, envolvendo receptores e ligantes em ambas as superfícies, o parasito adere-se à superfície dos macrófagos e células de Langerhans passando para o meio intracelular por meio de um processo de fagocitose, em que se transforma na forma amastigota, característica do parasitismo nos mamíferos (BRASIL, 2017; NEVES et al., 2019; OPAS, 2013).

Nos macrófagos, os parasitos internalizados, por fagocitose, ficam dentro de um vacúolo parasitóforo (fagolisossoma). Embora os macrófagos sejam células fagocitárias especializadas no combate a agentes infecciosos, as *Leishmanias* desenvolvem mecanismos de defesa. Aquelas formas promastigotas que não forem internalizadas serão destruídas no meio extracelular pela resposta inata e provavelmente neste momento, características como intensidade e qualidade da resposta imune são definidas, influenciando assim a evolução da doença para cura espontânea, formas autolimitadas ou formas progressivas (BRASIL, 2015a; OPAS, 2013).

4.1.2 Diagnóstico e tratamento

Muitas vezes é possível realizar o diagnóstico da LTA baseado na epidemiologia e clínica quando há lesões sugestivas de leishmaniose, porém, sinais e sintomas não são específicos para serem conclusivos, sendo necessário o diagnóstico laboratorial com técnicas sorológicas, parasitológicas ou moleculares (LEATTE et al., 2014). A utilização de técnicas laboratoriais além de confirmarem a positividade são fontes de informações epidemiológicas para que se possa estabelecer um controle da leishmaniose. Os testes laboratoriais devem ser escolhidos de acordo com o tempo de evolução da doença, complexidade e viabilidade do teste (BRASIL, 2017; GOMES et al., 2014; TUNES, 2019).

O teste intradérmico de Montenegro (IDRM) é o principal exame para complementar o diagnóstico de LTA, já existe há mais de 90 anos e baseia-se na reação de hipersensibilidade tardia. Contudo, testes sorológicos têm sua sensibilidade e especificidade variada dependendo do método empregado. Reações de imunofluorescência indireta (IFI), ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) e Western Blot são as mais relatadas, porém são técnicas complexas e de custo elevado (SZARGIKI et al., 2009; ZEYREK; KORKMAZ; ÖZBEL, 2007).

Já a Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) indica o exame parasitológico direto pois é rápido, a amostra é facilmente coletada e o diagnóstico é confirmado se a amastigota é encontrada. Nas primeiras semanas e meses da infecção quando a parasitemia é alta a sensibilidade aumenta, porém decresce conforme a evolução da doença (BRASIL, 2017; CERUTTI et al., 2017). O exame histopatológico é amplamente utilizado no diagnóstico, a biópsia deve ser feita nas bordas da lesão pois a carga parasitária nesse local é maior. O método de maior sensibilidade é o molecular, no entanto, o PCR têm um alto custo e a técnica é complexa, muitas vezes seu uso diagnóstico é limitado em rotina laboratorial, mas comumente utilizado em pesquisas (BOGGILD et al., 2008; BRASIL, 2013).

O tratamento recomendado pela OMS é uso de Antimoniais pentavalentes que foram, por décadas, o único agente anti-leishmania disponível (POLONIO; EFFERTH, 2008), sendo disponibilizados nas formas comerciais Pentostam® e Glucantime® (Antimoniato de meglumina e estibogluconato de sódio). No Brasil somente este último é comercializado, porém na maioria dos casos não é eficaz e está associado a efeitos adversos graves (BRASIL, 2017; WHO, 2010).

O mecanismo de ação não está totalmente elucidado, mas sabe-se que atua na forma amastigota do parasito, inibindo o metabolismo da tripanotona e a ação tripanotona redutase, comprometendo o potencial redox intracelulares aumentando o estresse oxidativo, inibe a glicólise e a oxidação de ácidos graxos. Estudos recentes sugerem que antimoniais geram fragmentação do DNA da *Leishmania*, podendo ocorrer morte por apoptose (TUNES, 2019; WYLLIE; CUNNINGHAM; FAIRLAMB, 2004).

Além dos efeitos colaterais, que incluem cardiotoxicidade, pancreatite, hepatotoxicidade, nefrotoxicidade, artralgia, mialgia, inapetência, cefaléia, febre, náuseas, tontura, inchaço no local da aplicação e anormalidades no eletrocardiograma, esses remédios estão sendo questionados por apresentarem redução da eficácia. A resposta ao tratamento varia de acordo com a forma clínica, espécie envolvida e sistema imunológico do hospedeiro ao longo do tempo, sendo necessário o aumento gradual de sua concentração até que se atinja o limiar máximo de toxicidade, inviabilizando a continuação de muitos tratamentos (VANAERSCHOT et al., 2014; ZHUANG et al., 2017).

Concomitantemente, a Anfotericina B, com os nomes comerciais Fungizone® e AmBisome®, foi introduzida no tratamento, sendo que a maior segurança na sua formulação e maiores taxas de cura propiciaram sua adoção nos centros de saúde. É um antibiótico antifúngico do grupo dos macrolídeos poliênicos e seu mecanismo de ação está ligado à interação com o ergosterol, um esteroide presente na membrana da *Leishmania*, promovendo aumento da porosidade da membrana. Eficaz, porém tóxico, esse medicamento pode ocasionar febre, calafrios, náuseas, vômitos, dispneia, taquicardia e nefrotoxicidade que frequentemente levam à interrupção do tratamento (BRASIL, 2017; BURZA et al., 2014; NEVES et al., 2011).

Muitos anos se passaram desde os primeiros relatos desse parasito, e novos medicamentos foram licenciados para o tratamento como a miltefosina e pentamidinas, no entanto, ainda nos deparamos com os mesmos problemas de reações adversas e variação nos resultados de tratamento. As leishmanioses têm se expandido para regiões antes consideradas indenes e também têm sido diagnosticadas em viajantes que retornam a seus países de origem, porque, apesar do grande número de grupos de pesquisas, instituições e países envolvidos no

estudo das leishmanioses, ainda temos dificuldades para realizar e melhorar diagnóstico, tratamento e controle da infecção (BRASIL, 2013; SANTOS et al., 2018).

4.2 DOENÇA DE CHAGAS (DC)

Trypanosoma cruzi pertence à Ordem Kinetoplastida e família *Trypanosomatidae*, e é o agente etiológico da DC, descoberto por Carlos Justiano Ribeiro Chagas em 1909 (CHAGAS, 1909) durante uma campanha sanitária, enquanto coordenava as atividades de combate à malária, no interior do estado de Minas Gerais. Esse parasito foi isolado de insetos hematófagos, popularmente conhecidos como “barbeiros” encontrados picando pessoas na região, fato considerado um marco na história da medicina devido ao descobrimento simultâneo do vetor, do protozoário, agente etiológico da doença, e sua patologia (BRASIL, 2020).

Essa doença, faz parte do grupo de DTNs, assim como as leishmanioses, por acometer, em sua grande maioria, pessoas de países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, para as quais empresas farmacêuticas têm pouco interesse em financiar a pesquisa de novos medicamentos, principalmente na América Latina (BRASIL, 2017; OPAS; OMS, 2010).

É uma antropozoonose de elevada prevalência e expressiva morbimortalidade decorrente do deslocamento dos vetores de seus habitats silvestres, devido à ação do homem no meio ambiente. Embora o vetor do *T. cruzi* esteja bem distribuído pelo continente americano, é especificamente a América Latina que se encontra endêmica. São 21 países, aproximadamente 12 milhões de portadores da doença crônica - cerca de 2 a 3 milhões no Brasil – e, a cada ano, 20-28.000 novos casos e mais de 10.000 mortes (BRASIL, 2017; CASTRO, 2018).

A patogênese da doença está basicamente envolvida em três processos patológicos que o parasito induz nos vertebrados: a resposta inflamatória, as lesões celulares e a fibrose. Estes processos podem ocorrer em diversos órgãos e tecidos dos vertebrados, aparecendo com maior frequência e intensidade no coração, tubo digestivo e sistema nervoso. Na fase inicial da infecção o parasito penetra, preferencialmente, em fibroblastos e macrófagos, aumentando os focos de inflamação, predominando processo inflamatório com fenômenos vasculares e degenerativos necróticos, sendo o exsudato celular constituído predominantemente por esses macrófagos e linfócitos (BRASIL, 2020; TUNES, 2019). Na fase crônica, o ciclo se repete com repetidas invasões celulares, porém em intensidade muito menor, em razão da repressão que as defesas do hospedeiro passam a exercer sobre o *T. cruzi*, ocorrem desde alterações mínimas e reversíveis até necroses extensas como o processo fibrótico corresponde a uma das mais

características e mais tardia das alterações da doença na fase crônica, principalmente ao nível do coração (BRASIL, 2013, 2018; SANTANA, 2015).

A DC apresenta duas fases clínicas bem distintas: aguda e crônica. A fase inicial, aguda, dura de 4 à 8 semanas, é na maioria dos casos assintomática ou podem ocorrer sintomas que variam de acordo com a forma de infecção, a parasitemia e como o sistema imune reage. Apesar de não ter nenhum sinal patognomônico, é típico deste tipo de infecção, o chagoma de inoculação, que se desenvolve pela reação da pele do hospedeiro pelo contato com a saliva do inseto no momento da picada. Alguns sintomas que podem ocorrer nessa fase são: febre, mal estar e dores musculares, sintomas comuns em várias patologias que dificultam o diagnóstico correto. Nesta fase menos de 10% dos casos são diagnosticados. Muitos indivíduos não desenvolvem a forma clínica da doença, sendo portadores da forma indeterminada com ausência de sinais e sintomas perceptíveis, ou demais evoluem para fase crônica (BRASIL, 2018; DNDi, 2019; NEVES et al., 2019).

A fase crônica tem por característica redução da parasitemia e elevados níveis de anticorpos, ocorrendo lenta destruição das células infectadas pelo parasito, além do tropismo por tecidos ricos em macrófagos, fibras musculares e miocardiócitos com estabelecimento de uma fase benigna que perdura por anos. Entretanto, uma pequena porcentagem evolui para fase crônica sintomática, que pode apresentar-se de várias formas: a forma cardíaca, causando a cardiomiopatia chagásica crônica, a forma digestiva, conhecida como mega colón e ainda a associação levando a forma cardiodigestiva. Nessa fase, o parasito causa alterações nas inervações intestinais e por consequência diminui o peristaltismo o que culmina no acúmulo de fezes e aumento do órgão. O impacto econômico da fase crônica em sua forma cardíaca é elevado, na qual os custos estimados para implantes de marcapasso e cirurgias corretivas atingiriam aproximadamente US\$ 750 milhões anuais na América Latina, impactando como um problema de saúde pública (ALMEIDA et al., 2009; BRASIL, 2020; CARVALHO; GOLDENBERG; CARVALHO, 2017; MENEZES et al., 2017; NEVES et al., 2019).

4.2.1 Vetor, hospedeiro, ciclo biológico e transmissão

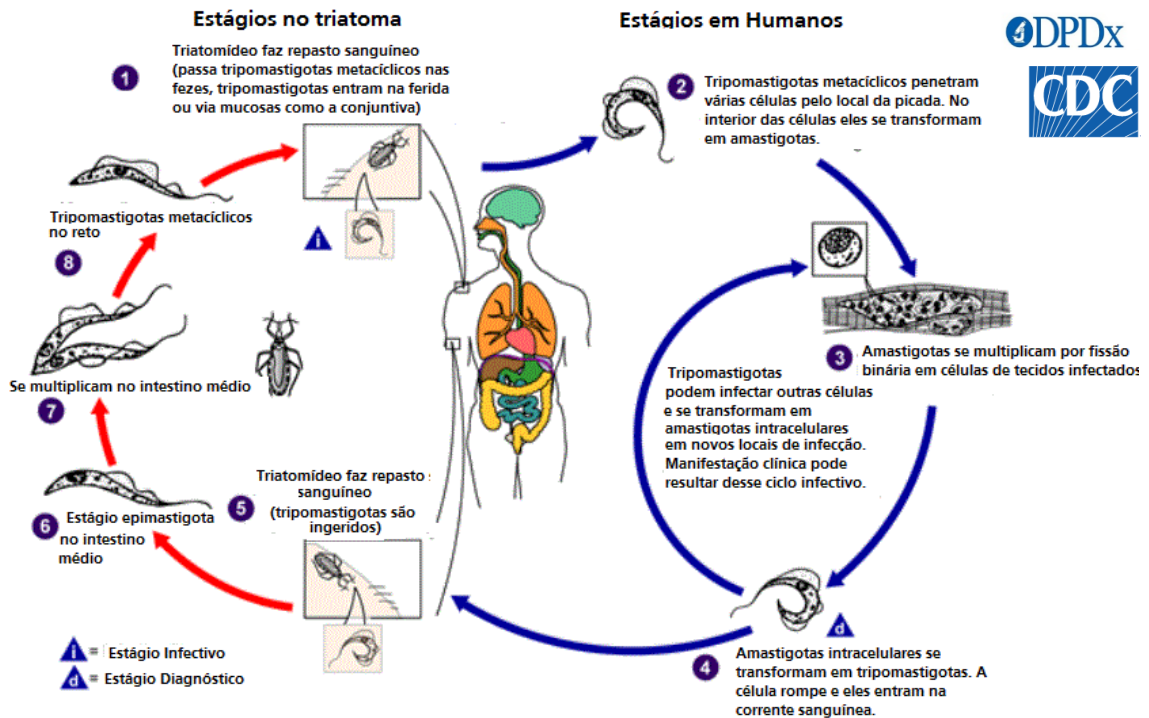
A rota primária de transmissão do *T. cruzi* está relacionada ao repasto sanguíneo de triatomíneos. Embora mais de 130 espécies de triatomíneos tenham sido identificados, apenas alguns vetores são hábeis, como os gêneros *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus*, são os hospedeiros intermediários e os vetores do *T. cruzi* para os mamíferos (FIOCRUZ, 2013; MONTEIRO, 2017; NEVES et al., 2019).

Esses vetores são insetos que possuem tamanho variando de 0,5 a 4 cm de comprimento, apresentam em geral hábitos noturnos e metamorfose parcial com cinco estágios evolutivos, adquirindo asas apenas no último, quando chega a fase adulta. Em média vivem entre 1 e 2 anos, com evolução de ovo a adulto de 3 a 8 meses. São insetos lentos, pouco agressivos, de voo difícil, possuem grande capacidade reprodutora e uma enorme capacidade de resistência ao jejum (RASSI JR.; RASSI; REZENDE, 2012; FIOCRUZ, 2013).

Nos hospedeiros mamíferos são observadas as formas amastigotas nos tecidos e as formas tripomastigotas no sangue, enquanto que nos hospedeiros invertebrados ocorrem as formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas (Figura 5) (BRENER, 2000). A forma tripomastigota (forma circulante) do *T. cruzi* apresenta forma de “C”, aproximadamente 25 µm, extremidades pontiagudas, membrana ondulante e flagelo livre, além disso, caracteriza-se pela existência de um cinetoplasto volumoso localizado próximo ao flagelo, que contém o DNA mitocondrial (BRASIL, 2013; CARVALHO; GOLDENBERG; CARVALHO, 2017). Já a forma amastigota, possui formato arredondado ou ovalado, aproximadamente 5 µm, núcleo grande e flagelo reduzido, inaparente e ausência de membrana ondulante. A forma epimastigota se caracteriza pelo cinetoplasto anterior ao núcleo, membrana ondulante curta e flagelo livre bem desenvolvido, com 20 a 40 µm de comprimento (BRASIL, 2020; NEVES et al., 2019).

A transmissão vetorial é considerada o mecanismo de transmissão de maior relevância epidemiológica. Entretanto, o perfil epidemiológico da doença no Brasil vem apresentando um novo cenário devido à ocorrência de casos e surtos relacionados à infecção oral pela ingestão de alimentos contaminados como caldo de cana, açaí e bacaba, destacando-se especialmente na região da Amazônia Legal (DNDi, 2019; FIOCRUZ, 2013).

Figura 4 – Ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi* no interior do inseto vetor e do mamífero hospedeiro



Fonte: adaptado CDC - Center of Disease Control and Prevention, 2020.

Além dessas formas, ainda se destacam a infecção sexual (RIBEIRO et al., 2016), via materno fetal (FRACASSO et al., 2019), transfusional (CASTRO, 2009) e infecção por acidente com materiais perfurocortantes contaminados. No período de 2000 a 2011, foram registrados mais de 1.200 casos: 70% por transmissão oral, 7% por transmissão vetorial e 23% sem identificação do modo de transmissão (KINOSHITA-YANAGA et al., 2009).

O ciclo do protozoário é heteroxênico, mantido entre insetos e mamíferos silvestres e tem início quando o triatomíneo ingere formas tripomastigotas durante repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado infectado. Essas formas são conduzidas à porção anterior do estômago do hospedeiro invertebrado, onde se transformam em epimastigotas, multiplicam-se no intestino se transformando em tripomastigotas metacíclicas (formas infectantes para o hospedeiro vertebrado), ficando aderidas à cutícula que reveste o epitélio do reto e do saco retal do inseto para serem eliminadas nas fezes do barbeiro durante o próximo repasto. A penetração do parasito pode se dar diretamente pela mucosa, por feridas na pele ou ocasionada pelo ato de coçar o local da picada. Essa forma é fagocitada pelas células do sistema mononuclear fagocitário (SMF), que assumem uma forma amastigota, provocam a lise da membrana do vacúolo e, então, se multiplicam no citoplasma da célula. Após a replicação, transformam-se

em tripomastigotas que são liberadas no meio extracelular, onde podem migrar pela corrente sanguínea e procurar outras células para nova multiplicação. A lise da célula hospedeira pode ocorrer antes da total diferenciação de amastigota para tripomastigota, o que gera o aparecimento das duas formas no meio externo, e assim, ambas as formas podem invadir novas células (Figura 6). Durante o hematofagismo do vetor, ocorre a ingestão das formas tripomastigotas do parasito, presentes na circulação do hospedeiro mamífero, recomeçando o ciclo (BRASIL, 2020; NEVES et al., 2019; SANTANA, 2015).

Figura 5 – Formas evolutivas do *Trypanosoma cruzi*. A. Tripomastigota de *T. cruzi* em um esfregaço de sangue fino corado com Giemsa. B. Epimastigota de *T. cruzi* de cultura. C. Amastigotas de *T. cruzi* em tecido cardíaco corado com hematoxilina e eosina



Fonte: adaptado - CDC - *Center of Disease Control and Prevention*, 2019.

4.2.2 Diagnóstico e tratamento

Os exames laboratoriais indicados para o diagnóstico da DC dependem da fase em que o paciente se encontra, podendo ser parasitológicos, sorológicos e moleculares. Na fase aguda da doença é realizado pela detecção microscópica de tripomastigotas no sangue, o exame parasitológico direto é considerado o “padrão ouro” para diagnóstico da DC. Os testes mais utilizados são o exame a fresco, gota espessa e esfregaço (NEVES et al., 2019; TUNES, 2019).

Já na fase crônica o diagnóstico clínico se dá a partir das anormalidades vistas em eletrocardiograma. O método parasitológico indireto, como a hemocultura, apresenta baixa sensibilidade e costuma ser empregado apenas na fase crônica da infecção, onde a pobreza de formas tripomastigotas no sangue periférico torna difícil a demonstração diretamente do líquido biológico. Com a baixa parasitemia o ideal é detectar a presença de anticorpos IgG contra *T. cruzi* (BRASIL, 2013, 2020).

Para o diagnóstico sorológico são utilizados testes imunológicos juntamente à evidências indiretas da presença do parasito, deduzindo-se que o mesmo existe por detecção de anticorpos anti-*T. cruzi*. A presença de anticorpos da classe IgM anti-*T. cruzi* no sangue indica doença aguda quando associada a fatores clínicos e epidemiológicos compatíveis; enquanto que na crônica, os indivíduos apresentam anticorpos IgG anti-*T. cruzi*. Os métodos sorológicos mais usados são Elisa (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), imunofluorescência indireta e a hemaglutinação direta. Porém, quando testes sorológicos são inconclusivos, as diretrizes recomendam o uso de testes moleculares. Então, emprega-se a reação de polimerização em cadeia (PCR) como diagnóstico laboratorial complementar. A PCR apresenta alta sensibilidade e especificidade quando respeitados os parâmetros de padronização e controle de qualidade dos reagentes utilizados, só não é mais difundida pelo alto custo (ALVES et al., 2019; BRASIL, 2018).

O tratamento etiológico tem como objetivos curar a infecção, prevenir lesões orgânicas ou a evolução delas e diminuir a possibilidade de transmissão do *T. cruzi*. Porém está restrito a duas drogas, os nitroderivados, introduzidos nas décadas de 1960 e 1970. O Benznidazol (Rochagan® e Radanil®, Roche; LAFEPE Benznidazol®) e o Nifurtimox (Lampit®, Bayer). Desde a década de 1980, o Nifurtimox teve a sua comercialização interrompida no Brasil, Argentina, Chile e Uruguai pelos efeitos colaterais severos como anorexia, excitabilidade, sonolência e alterações psíquicas relevantes (BRASIL, 2013; FIOCRUZ, 2013; TUNES, 2019).

Benznidazol passou a ser o único medicamento preconizado, cujo mecanismo de ação envolve a formação de radicais livres e metabólitos que fazem ligações com o DNA, além de inibir síntese de RNA e proteínas. Entretanto, o potencial benefício na eliminação do parasita com esses tratamentos é discutível e depende da fase da doença, da idade do paciente e de condições associadas. O tratamento é recomendado nos casos agudos e que seja iniciado o mais rápido possível após confirmação do diagnóstico, pois nessa fase a droga tem se mostrado eficaz na diminuição da parasitemia. Os casos de infecção congênita devem ser tratados como fase aguda, assim como as infecções acidentais. O tratamento também é indicado em caso de chagásico receptor ou doador de órgãos e em pacientes imunossuprimidos, sujeitos à reativação da infecção (BRASIL, 2020; FIOCRUZ, 2013).

Já na fase crônica o tratamento é insatisfatório, a eficiência do Benznidazol de 60-80% na fase aguda cai para 5-20% e passa ser apenas paliativo, uma vez que as formas tripomastigotas evoluem para amastigotas e nesse estágio os medicamentos não conseguem atuar eficientemente (BERN, 2015; BERN et al., 2011; RASSI JR.; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

Ademais, há inúmeros relatos e literatura contendo informações sobre a toxicidade dos nitroderivados, devido à sua comprovada mutagenicidade e oncogenicidade e também efeitos colaterais, como cefaléia, anorexia, desconforto gástrico, dermatite e neuropatia periférica. Podem ocorrer ainda distúrbios visuais e mentais e convulsões (SILVA, 2011a; SOUSA, 2012).

4.3 CÂNCER (CA): ASPECTOS GERAIS

O processo de mudança demográfica, denominado de “envelhecimento” da população, relacionado à transformação nas relações entre as pessoas e seu ambiente, trouxe alterações importantes no perfil de morbimortalidade. Conduzindo as doenças como CA, comum em países onde a expectativa de vida é alta, para o centro das atenções dos problemas de doença e morte da população. De acordo com a *International Agency for Research on Cancer (IARC)*, uma agência da OMS especializada em CA, a doença é uma crescente ameaça global à saúde, correspondendo a segunda maior causa de mortes no mundo todo (BRASIL, 2014; BRAY et al., 2018; INCA, 2020).

Mesmo com recentes melhorias nas taxas de sobrevivência, devido aos avanços na detecção precoce e a qualidade do tratamento disponível, o CA continua a representar um grande risco para a vida da população, demandando dos gestores de saúde um imenso esforço para oferecer uma atenção adequada aos doentes. Esta perspectiva deixa clara a necessidade de grande investimento na promoção de saúde para minimizar os danos decorrentes dessa patologia. Neste contexto, de acordo com o Instituto Nacional de Câncer (INCA) e a IARC estima-se que tenha registrado mais de 18 milhões de novos casos em 2018, sendo responsável por cerca de 9,6 milhões de mortes (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2012; BRAY et al., 2018; INCA, 2018; OPAS, 2019).

Desses 18 milhões de casos novos, o CA de pulmão é o mais incidente no mundo (2,1 milhões), seguido pelo CA de mama (2,1 milhões), cólon e reto (1,8 milhão) e próstata (1,3 milhão). A incidência em homens (9,5 milhões) representa 53% dos casos novos, sendo um pouco maior nas mulheres, com 8,6 milhões (47%) de casos novos. Os tipos de CA mais frequentes nos homens foram o CA de pulmão (14,5%), próstata (13,5%), cólon e reto (10,9%), estômago (7,2%) e fígado (6,3%). Nas mulheres, as maiores incidências foram CA de mama (24,2%), cólon e reto (9,5%), pulmão (8,4%) e colo do útero (6,6%) (BRAY et al., 2018).

Sabe-se que essa patologia é oriunda da falha de genes que regulam a sobrevivência e a proliferação das células, resultando em um desenfreado crescimento das mesmas. CA é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que correspondem a um conjunto distinto e

multifatorial de doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células, que invadem tecidos e órgãos (VIANA, 2018; WEN et al., 2013).

A manifestação inicial de uma célula tumoral se dá pelo acúmulo sucessivo de eventos mutacionais herdados em célula normal. Cada célula sadia possui informações de como devem crescer e se dividir e qualquer erro nestas instruções pode gerar uma anormalidade que, ao se proliferar, causará CA. Essas transformações causam desordem na expressão de genes envolvidos na apoptose, na diferenciação e na proliferação celular criando um microambiente favorável ao seu desenvolvimento. Dessa maneira, ao longo dessa transformação, uma célula normal expressa proteínas em níveis anormais e/ou novas proteínas que até então não eram expressas, perdendo o controle dos processos celulares vitais (BRASIL, 2020; BRAY et al., 2018; ZHANG et al., 2015; ZHAO et al., 2016).

4.3.1 Melanoma: doença, incidência e tratamento

O melanoma é a forma mais agressiva de CA de pele, sendo uma neoplasia maligna que acomete os melanócitos, e que pode aparecer em qualquer parte do corpo, na pele ou mucosas, na forma de manchas, pintas ou sinais (CROSBY et al., 2000; FERLEY et al., 2018; VIANA, 2018).

Apesar de não corresponder ao tipo mais frequente de neoplasia, ele possui uma taxa de mortalidade expressiva devido ao seu potencial metastático e as dificuldades no tratamento por ser resistente, em alguns casos, a agentes anticancerígenos convencionais (BRASIL, 2014; CARBONELL et al., 2019; INCA, 2020). O Melanoma representa menos de 5% de todos os casos de câncer de pele, contudo, causa a grande maioria das mortes, chegando a 80% apresentando o maior crescimento na última década (BERTOLOTTI, 2013). A incidência de melanoma maligno tem aumentado a uma taxa constante em populações de pele clara, em todo o mundo, ao longo dos anos (Figura 7) (GRIMALDI et al., 2014).

A metástase é a principal causa de morte por melanoma, o que reforça esse fenômeno é a produção de algumas citocinas quimiotáticas, as quais facilitam a migração celular. Assim, os órgãos que possuem células que expressam receptores para essas moléculas acabam por atraí-las, facilitando a metástase, alterando o microambiente, estimulando a angiogênese e consequentemente inibindo a resposta imune (MONTEAGUDO et al., 2011; SANTOS, 2019). Cerca de 20% dos indivíduos com melanoma desenvolvem rapidamente metástases e para os doentes diagnosticados com doença metastática, o prognóstico permanece obscuro, com uma

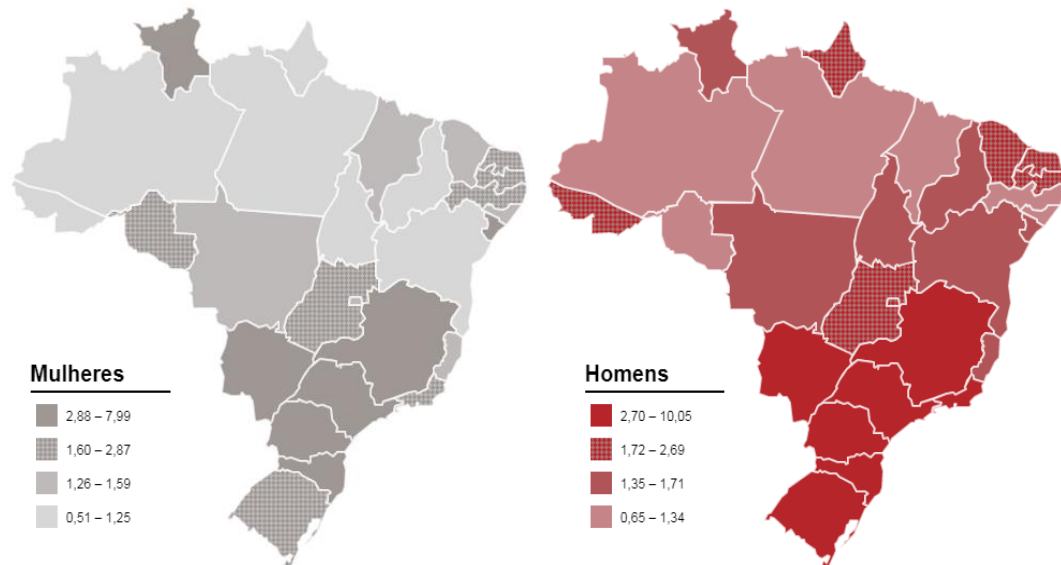
sobrevivência média máxima de 6 a 9 meses e taxas de sobrevivência de 5 anos, inferior a 15% (ROCHA et al., 2013).

De acordo com a literatura, nos últimos tempos, tem-se procurado a origem do melanoma cutâneo, através de explicações genéticas sobre o seu crescimento. O estudo dessa patologia tem levado os pesquisadores a correlacionar as mutações gênicas com os primórdios da doença (FAURI et al., 2010). As neoplasias cutâneas estão relacionadas a alguns fatores de risco químico, radiação ionizante, processo irritativo crônico e principalmente à exposição aos raios ultravioletas do sol, mas também mutações hereditárias, hormônios, condições imunológicas e mutações decorrentes do metabolismo (FERNANDES; CALMON, 2011; INCA, 2018, 2020).

Especialmente no Brasil, a população do Rio Grande do Sul, em particular, têm maior propensão ao desenvolvimento do melanoma, devido a maior proporção de indivíduos de pele clara em relação a outros estados em virtude da sua colonização histórica, além da alta concentração de UVA ambiental decorrente da localização geográfica e de hábitos culturais, como a exposição solar nas praias durante o verão (BONFÁ et al., 2011; BRASIL, 2014).

A terapia antineoplásica para o melanoma continua sendo objeto de constantes estudos no intuito de otimizar seus resultados e descobrir agentes capazes de inibir com maior especificidade o crescimento das células malignas. O aumento do número de casos nos últimos anos potencializa a necessidade de desenvolvimento de novas metodologias terapêuticas devido a sua incidência e malignidade buscando uma melhora na qualidade de vida das pessoas acometidas dessa enfermidade (SHRIKHANDE et al., 2015).

Figura 6 – Incidência de melanoma. Taxa estimada por Estado/Capital, Brasil – 2020/2022.



Melanoma maligno de pele. Representação espacial das taxas de incidência ajustadas de incidência por 100 mil homens e 100 mil mulheres, estimadas para o triênio 2020/2022, segundo Unidade da Federação.

Fonte: INCA. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil.

As pesquisas voltadas para esses tratamentos podem ser consideradas em alguns aspectos satisfatórios, porém insuficientes quando comparados à evolução da doença em questão. Mesmo com todos esses avanços no tratamento, para muitos pacientes as opções terapêuticas ainda são limitadas, por isso a prevenção e promoção da saúde estão hoje entre as principais ações dos profissionais da saúde. Além disso, nas últimas décadas a qualidade de vida do paciente com neoplasia vem sendo melhorada em decorrência dos avanços tecnológicos e terapêuticos (ROCHA, 2014; SANTOS, 2019).

Diante da complexidade dessa neoplasia, o grande desafio para combatê-la reside no fato de fazer a diferenciação entre as células saudáveis e malignas, visto que ambas possuem semelhanças. A maioria dos fármacos antitumorais disponíveis têm como alvo as células que estão se multiplicando frequentemente, não sendo específicos à neoplasia e caracterizam-se por interagir com o DNA ou seus precursores, inibindo a síntese de novo material genético ou ocasionando lesão irreparável (PINTO et al., 2012; YAP; WORKMAN, 2012).

Entre as drogas mais utilizadas no tratamento do melanoma está a Dacarbazina® (DTIC), um pró-fármaco que precisa ser convertido no fígado a 5-(3-metil-1-triazeno)imidazole-4-carboxamida; ele representa o fármaco padrão para melanoma metastático desde 1972. Outro medicamento muito utilizado é a Temozolomida® (TMZ), que, ao contrário, é

administrada via oral e não requer a conversão hepática. Tanto a DTIC quanto a TMZ são exemplos de fármacos Triazenos (TZCs) com o mecanismo de ação baseado na alquilação do DNA comercialmente disponíveis (YANG; CHAPMAN, 2009).

Apesar do uso clínico, esses medicamentos apresentam uma série de efeitos colaterais que incluem nefrotoxicidade, ototoxicidade, neurotoxicidade e toxicidade gastrointestinal como náuseas e vômitos (GAMA et al., 2011; GASSER; OTT; METZLER-NOLTE, 2011; NEVES; VARGAS, 2011).

Segundo o Instituto Nacional de Câncer, a cirurgia é o tratamento mais indicado para o melanoma. A radioterapia e a quimioterapia também podem ser utilizadas dependendo do estágio do câncer, ainda são as principais terapias adjuvantes. Quando há metástase, o melanoma torna-se de difícil cura, na maioria dos casos. No geral, historicamente a sobrevivência tem sido baixa para pacientes com doença metastática distante e a resposta à quimioterapia convencional não tem sido frequente (BALCH et al., 2009). A estratégia de tratamento para a doença avançada deve ter como objetivo postergar a evolução da doença, oferecendo chance de sobrevida mais longa a pacientes que anteriormente tinham um prognóstico negativo (INCA, 2020; OPAS, 2019).

4.3.2 Câncer de pulmão: doença, incidência e tratamento

No mundo, o câncer de pulmão configura-se entre os principais em incidência, ocupando a primeira posição entre os homens e terceira posição entre as mulheres (BRAY et al., 2018). No Brasil, o CA de pulmão é o segundo principal responsável por mortes por CA em homens (após câncer de próstata) e o quarto em mulheres - sendo o Rio Grande do Sul o segundo estado brasileiro com maior incidência de casos de CA. Estimam-se, para cada ano do triênio 2020-2022, 17.760 casos novos de CA de pulmão em homens e 12.440 em mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 16,99 casos novos a cada 100 mil homens e 11,56 para cada 100 mil mulheres (INCA, 2020).

Por se tratar de doença multifatorial, várias são as causas que podem corroborar no desenvolvimento do câncer de pulmão e somente uma taxa de 5 a 10 % de todos os cânceres são resultantes de alterações genéticas hereditárias, sendo os fatores ambientais os agentes que mais contribuem na promoção da carcinogênese (BENASSI, 2021; FERLAY et al., 2018).

Outros fatores como os químicos (tabagismo e alcoolismo), agentes físicos (raio ultravioleta) e agentes biológicos (infecção por vírus, envelhecimento e dieta) também influenciam na desordem celular. Dentre os fatores de risco destacam-se o tabagismo

(responsável cerca de 90 % das mortes de câncer de pulmão em mulheres e 80% em homens) devido aos compostos carcinogênicos do tabaco (ANAND et al., 2008; RIDGE; MCERLEAN; GINSBERG, 2013).

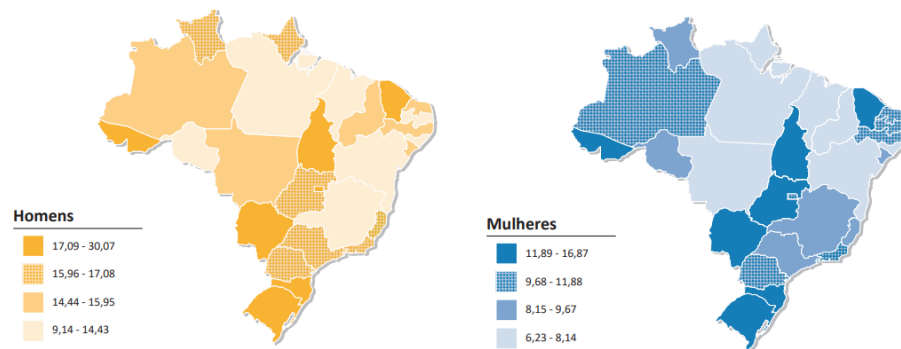
Além disso, o radônio, pode ter seu efeito potencializado pelo sinergismo com a inalação do tabaco quando os indivíduos são exposto aos solos contaminados, entre outros químicos como sílica, cromo, cádmio, níquel, arsênico e berílio já são relacionados à fatores de risco. Assim como os portadores de HIV e a inalação passiva do tabaco através da convivência com fumantes também estão caracterizados como fator de risco da doença. Alguns outros fatores como inflamação, falhas a nível molecular e sinalizações intercelulares alteradas, são desencadeadoras ou auxiliadoras na patogênese do câncer (BENASSI, 2021; BRAY et al., 2019; ENGELS et al., 2008).

No caso do CA de pulmão, os tratamentos iniciais considerados são a cirurgia, de acordo o estágio inicial da doença, posteriormente, conforme grau de evolução da doença para quimioterapia e radioterapia. Em tumores de não-pequenas células, responsável pela maioria de todos cânceres de pulmão (85%), o objetivo é a cura em estágio I e II, enquanto em estágios mais avançados, o objetivo é paliativo a fim de prolongar a vida do paciente. Os tumores de pequenas-células, representam aproximadamente 15 % dos casos sendo doença maligna com metástases precoces. O tratamento desses pacientes se direciona de acordo com o estágio, mas incluem radioterapia e quimioterapia com combinação de fármacos como cisplastina, etoposídeo, doxorubicina e vincristina intercalados com irradiações (GADGEEL; RAMALINGAM; KALEMKERIAN, 2012).

A doxorubicina é um fármaco muito utilizado no tratamento de diversos tipos de cânceres (pulmão, mama, próstata, gástrico, intestino, fígado, ovário, leucemias (TACAR; DASS, 2013; ZHENG et al., 2015) sendo considerado uma das drogas mais potentes dentre os quimioterápicos aprovados pelo *Food and Drug* (FDA) (CARVALHO et al., 2019). Este medicamento apresenta como mecanismo de ação a inibição da topoisomerase I e II, intercalando-se ao DNA e impedindo a divisão celular bem como a geração de radicais livres e espécies reativas de oxigênio (SABUNCUOGLU, 2014).

Tal quimioterápico se trata de uma antraciclina não-seletiva que resulta em apoptose, necrose e senescência celular (TACAR; DASS, 2013). Apesar de seu amplo uso em diversos tumores, apresenta resistência ao tumor e dose com toxicidade limitante, mas a associação desse quimioterápico com produtos naturais evidenciaram a reversão dessa resistência, potencializando o efeito da droga em A549 em estudos preliminares (POORNIMA et al., 2014; SILVA et al., 2022; STOLL, 2018).

Figura 7 – Incidência de neoplasia maligna dos pulmões. Taxa estimada por Estado/Capital, Brasil – 2020/2022



Representação espacial das taxas ajustadas de incidência por 100 mil mulheres e para cada 100 mil homens estimadas para o triênio 2020/2022, segundo Unidade da Federação (neoplasia maligna da traqueia, dos brônquios e dos pulmões).

Fonte: INCA. Estimativa de 2020: incidência de câncer no Brasil.

4.3.3 Câncer de colo de útero: doença, incidência e tratamento

O CA de colo de útero, conhecido também como CA cervical ou adenocarcinoma de cérvix, é uma doença prevenível, curável, pois quando diagnosticado e tratado na fase inicial tem elevado índice de cura (SANTANA, 2016). É um importante problema de saúde pública no mundo e ocupa a terceira posição entre as neoplasias mais comuns entre as mulheres. No Brasil, para o triênio 2020-2022, será de 16.710, com um risco estimado de 16,35 casos a cada 100 mil mulheres. Ele é responsável por 311 mil óbitos por ano no mundo, sendo a quarta causa mais frequente de morte por câncer em mulheres. Apesar de tudo isso, estudos demonstram deficiência do conhecimento, atitude e prática das mulheres em relação à sua prevenção (FALCÃO, 2022; INCA, 2020).

Devido a sua recorrência, a comunidade científica buscou pontuar seus fatores de risco e dentre eles a infecção pelo Papiloma Vírus Humano (HPV) é a principal causa da doença, estando presente em 70 a cada 100 casos de câncer cérvico-uterino, com destaque para os subtipos virais 16 e 18 (TALLON et al., 2020).

O HPV é um vírus de ácido desoxirribonucleico (DNA) que possui alta afinidade por mucosas e epitélios. Sua transitoriedade infecciosa oferece menos riscos para o desenvolvimento carcinogênico, porém sua atuação crônica nas células do cérvix uterino gera alterações a nível molecular precursoras de neoplasias. O principal mecanismo patogênico para a alteração morfológica e multiplicativa das células de revestimento dessa porção do útero é a

adesão do material genético do vírus ao material genético da célula, com posterior expressão de proteínas virais de caráter oncogênico (ADORNO et al., 2020).

Nesse sentido, após o estabelecimento irreversível das lesões nas células, provocadas pelo HPV, conforme a predisposição genética, imunológica, o subtipo do vírus infectante e o tecido, as lesões neoplásicas variam suas nomenclaturas: carcinoma espinocelular, carcinoma adenoescamoso e adenocarcinoma cervical. Quanto à invasão das neoplasias nos tecidos, ou seja, de acordo com o nível de progressão e interiorização do câncer nas camadas de células, adquirem outra classificação referente ao grau: Grau I, Grau II e Grau III (ADORNO et al., 2020).

Contudo, há outros fatores associados ao desenvolvimento dessa enfermidade como a influência da idade, sexarca precoce, número de filhos, aspectos socioeconômicos, serviços de saúde disponíveis, hábitos de vida, prática de exercícios e comorbidades (PRIMO; SPECK; ROTELI-MARTINS, 2020; ROZARIO et al., 2019). A OMS recomenda que a população-alvo para as práticas de testagem sejam mulheres entre 25 e 64 anos, e que a cobertura dessa população deva chegar a pelo menos 80% para, por meio de um diagnóstico e tratamento corretos, ser possível reduzir o desenvolvimento invasivo desse CA em até 90% (SILVA et al., 2021).

Entretanto, sua mortalidade ainda é elevada, atingindo principalmente mulheres com maior dificuldade de acesso aos serviços de saúde, cenário comum em países em subdesenvolvidos ou em desenvolvimento (SILVA, 2016). O número de casos, anualmente, tem aumentado expressivamente, não sendo, estes números, distribuídos de maneira uniforme entre todos os países. Esta diferença de incidência se dá devido aos programas de rastreamento existentes, além de programas de vacinação contra HPV nos países mais ricos e com maior investimento em saúde (HU; MA, 2018).

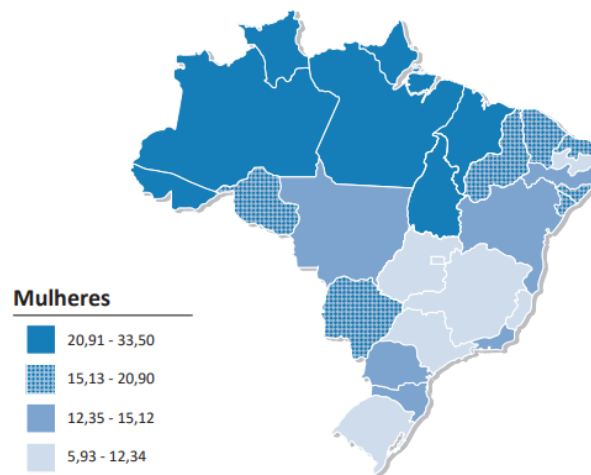
A escolha do tratamento depende de uma variedade de fatores individuais, onde podem ser incluídas as características patológicas e moleculares específicas do câncer, sua localização, extensão da doença e o estado de saúde do paciente. O objetivo final da quimioterapia consiste em destruir todas as células cancerígenas e, ao mesmo tempo, infligir danos mínimos no tecido normal. Isso pode ser alcançado de várias maneiras, seja diretamente ou indiretamente, privando as células cancerígenas dos sinais necessários para a proliferação celular ou estimulando a resposta do sistema imunológico (FALCÃO, 2022; SILVA et al., 2021).

De acordo com o INCA, os tratamentos mais comuns e com maior taxa de sucesso para o CA de colo uterino são cirurgia e radioterapia, porém, a melhor escolha, depende de alguns fatores, como estágio da doença, tamanho do tumor e idade. A quimioterapia é indicada

juntamente com a radioterapia para tratamento de tumores mais volumosos, sendo a terapêutica mais eficiente e indicada nesses casos (CORREIA et al., 2018; INCA, 2020).

Vale destacar que quando o diagnóstico da neoplasia é precoce, maiores são as chances de sucesso no tratamento. Os métodos terapêuticos podem ser utilizados em conjunto ou isoladamente, a escolha de qual recurso utilizar dependerá das questões pessoais da mulher (exemplificando, desejo de engravidar e idade) e às questões de risco relacionadas ao tumor (tamanho, invasão linfática, entre outros) (CORREIA et al., 2020).

Figura 8 – Incidência de neoplasia maligna do colo do útero. Taxa estimada por Estado/Capital, Brasil – 2020/2022



Neoplasia maligna do colo do útero. Representação espacial das taxas de incidência ajustadas de incidência por 100 mil mulheres, estimadas para triênio 2020/2022, segundo Unidade da Federação.

Fonte: INCA. Estimativa de 2020: incidência de câncer no Brasil.

4.4 DÍPTEROS E A SECREÇÃO LARVAL

O parasitismo por insetos é um assunto de grande importância nos países tropicais, onde as condições climáticas favorecem o desenvolvimento dos mesmos. Dentre os parasitos de importância podemos destacar dípteros, como as moscas, que devido ao seu grau de sinantropismo estão em contato direto com os seres humanos e animais. Estes insetos possuem hábitos biontófagos e necrófagos que acarretam prejuízo econômico por serem veiculadoras de

patógenos causadores de importantes doenças infecciosas, parasitárias e miíases (PORTO, 2016).

A Ordem Diptera distingue-se prontamente de outros insetos por possuir somente um par de asas, correspondente ao par anterior, devido às asas posteriores serem modificadas em forma de halteres e funcionarem apenas como estabilizadores de voo. Algumas famílias de dípteros estão associadas a matéria em decomposição, dentre estas estão Calliphoridae, Muscidae, Fanniidae, Phoridae, Piophilidae, Sarcophagidae e Stratiomyidae, todas com importância forense (CARVALHO; MELLO-PATIU, 2008; MARTINS, 2013).

Os insetos da família Calliphoridae são robustos, de tamanho médio à grande, possuem colorido metálico acobreado, azul ou verde, principalmente no abdômen, sendo conhecidas popularmente no Brasil por moscas varejeiras, com distribuição mundial encontrados em todas as regiões zoogeográficas. Constituem uma família heterogênea com mais de 1.000 espécies e 150 gêneros (AL-SAEED; MAHMOOD, 2012; KOSMANN, 2013). Suas larvas podem produzir miíase primária (obrigatória) e secundária (facultativa) no homem e outros animais, desempenhando assim um importante papel na área médica e veterinária. Também são relevantes para a entomologia forense, pois a presença dos mesmos em cadáveres humanos pode ser utilizada na estimativa do intervalo pós-morte (BULLINGTON, 2013; CORDEIRO, 2014; KOSMANN, 2013; SOUZA; ESPOSITO; CARVALHO, 2010).

As varejeiras possuem quatro estádios de desenvolvimento: ovo, larva, pupa e adulto. O desenvolvimento larval é dividido em três, e em cada um a larva muda seu tegumento para permitir o crescimento para o próximo estágio. A pupa é a transição entre larva e adulto, resultante do endurecimento e escurecimento do tegumento da larva de terceiro ínstar. Os ovos são brancos em forma elíptica e usualmente colocados em grupos. As larvas que eclodem dos ovos são brancas e apresentam um par de ganchos para se fixar enquanto se alimenta e para se mover por extensões e contrações do seu corpo. O inseto, presente no interior do pupário, é branco pálido, não se alimenta ou se move e possui estruturas rudimentares como pernas, antenas e asas. As moscas recém emergidas são inicialmente pálidas, macias ao toque e com asas enrugadas e recolhidas, posteriormente, as asas se expandem e os dípteros adquirem cores acobreadas, esverdeadas ou azuladas (AMENDT et al., 2011; BULLINGTON, 2013; HALL, 2014; MARTINS, 2013; MONTEIRO, 2017).

Essas moscas apresentam uma estreita relação com o ambiente antropogênico, permitindo que carregem mecanicamente inúmeros microrganismos patogênicos à diferentes indivíduos. Essa vetorização de patógenos acontece porque as moscas se desenvolvem em substratos orgânicos produzidos pela atividade humana e animal, especialmente fezes, resíduos

vegetais, lixo e outras matérias em decomposição e quando adultas, se deslocam para nossos ambientes, contaminando as superfícies e alimentos (CHAIWONG et al., 2014; KOSMANN, 2013).

O parasitismo ocasionado por insetos é um grande problema em muitos países, especialmente o tropical, onde as condições climáticas favorecem o desenvolvimento do mesmo. Em alguns casos, a convivência com essas moscas pode gerar incômodo e riscos à saúde pública. Os califorídeos já foram descritos carreando agentes etiológicos de doenças diarréicas agudas, malária, leishmaniose, febre amarela, filariose, disenterias bacilares, cólera, botulismo, febre tifóide, brucelose, poliomielite, varíola, giardíases, eimerioses, ancilostomoses, helmintoses, tuberculoses, dentre outros (AMENDT et al., 2011; GREENBERG, 1971).

Têm importante função na natureza, pois participam da cadeia alimentar e reciclagem da biomassa e possuem importância médico-sanitária e veterinária devido ao desenvolvimento de suas larvas em matéria orgânica em decomposição. Atuam como agentes mecânicos e/ou biológicos de microrganismos e vários estudos comprovam sua atividade biológica, especialmente estágios larvais (AL-SAEED; MAHMOOD, 2012; SILVA, 2013). A secreção de enzimas produzidas por esses insetos é responsável pelo estabelecimento e sua sobrevivência nos hospedeiros e no ambiente insalubre em que normalmente habitam, motivo de vários estudos já realizados (MARTINS, 2013; MUHARSINI et al., 2000).

Nas moscas varejeiras, o estágio larval é o principal período em que ocorre competição por nutrientes, (GOODBROD; GOFF, 1990; REIS et al., 1994, 1995) onde cada larva procura ingerir o máximo de alimento, no menor intervalo de tempo, antes da completa exaustão dos recursos alimentares (DE JONG, 1976; LOMNICKI, 1988; VON ZUBEN et al., 2000). A agregação larval neste período gera um desafio pela sobrevivência, aumentando as secreções produzidas pelos insetos, com aumento na eficiência do processo de alimentação e, conseqüentemente, aceleração do desenvolvimento larval (DAY, 2006; FENTON et al., 1999; GOODBROD; GOFF, 1990; HOBSON, 1931; O'FLYNN, 1983; YOUNG et al., 1996).

No Brasil, poucos estudos foram realizados com essas espécies e ainda pouco se sabe dos constituintes presentes na saliva dos insetos responsáveis pelas atividades descritas. Estudos demonstraram que a secreção larval tem capacidade de suprimir a proliferação de linfócitos e a produção de anticorpos em modelo experimental (KERLIN; EAST, 1992). Sabe-se também que algumas das enzimas e substâncias secretadas pelos 2º e 3º estágios das larvas de *Lucilia sp.* e do gênero *Sarconesia* apresentam efeitos bacteriostáticos e bactericidas (POLAT et al., 2012).

Devido a essa importância e a suas propriedades bactericidas, esse inseto tem sido utilizado em terapia larval (TL), uma técnica milenar, que é a aplicação de larvas de dípteros vivas em feridas necróticas com propósito de auxiliar em seu desbridamento (limpeza), desinfecção e/ou cicatrização. Esse tratamento é realizado há vários séculos, tendo caído em desuso com a introdução dos antibióticos na década de 1940. Contudo, com o crescente aparecimento de variantes de espécies bacterianas multirresistentes aos antibióticos disponíveis, o uso da TL tem sido repensado (MUMCUOGLU, 2001). No Brasil, a aplicação da técnica para o tratamento de feridas em humanos tem sido feita em caráter experimental, mas a extensão do uso é uma realidade cada vez mais próxima, a partir da divulgação e aplicação entre e pelos profissionais da saúde (AQUINO, 2017; DÍAZ-ROA et al., 2018).

A literatura atribui essa atividade a uma das principais formas de proteção utilizadas por insetos de forma geral. Essa proteção é a produção de peptídeos e enzimas, produzidos pelo corpo gorduroso, ou por hemócitos, em resposta à infecção microbiana, ou outro tipo de injúria, sendo então secretados rapidamente na hemolinfa. Dessa forma, são capazes de chegar a qualquer parte do corpo do inseto. Sabe-se que muitas dessas proteínas têm ação inibitória sobre fungos e bactérias (DÍAZ-ROA et al., 2018; LOURENÇO, 2008; RATCLIFFE et al., 2015; YI et al., 2014).

Alguns estudos avaliaram, caracterizaram e quantificaram a estrutura dessa secreção na busca por explicação da sua atividade, evidenciando que os insetos podem produzir uma variedade de peptídeos e proteínas antimicrobianos (AMPs). Peptídeos antiparasitários e peptídeos antimaláricos foram relatados recentemente por Bell (2011) e Pretzel et al. (2013).

Cerovsky e colaboradores identificaram uma nova defensina larval, a Lucifensina, um desses peptídeos, encontrados em Dípteros da espécie de *Lucilia cuprina*, ricos em cisteína, purificado a partir de extratos de vários tecidos como intestino, glândulas salivares, corpo e hemolinfa das larvas em todos os seus estágios evolutivos (ČEŘOVSKÝ et al., 2010; ČEŘOVSKÝ; BÉM, 2014; VALACHOVÁ et al., 2013).

O potencial bactericida das secreções larvais de dípteros já está bem estabelecido em literatura há mais de uma década (BEXFIELD et al., 2004; MUMCUOGLU, 2001; SHERMAN, 2014; THOMAS et al., 1999). As larvas são protegidas contra a infecção por um espectro de peptídeos antimicrobianos (DÍAZ-ROA et al., 2018; EL SHAZELY et al., 2013) e já há estudos avaliando seu potencial antiprotozoário, em especial com *Leishmania* e *T. cruzi* (ARRIVILLAGA; RODRÍGUEZ; OVIEDO, 2008; CRUZ-SAAVEDRA et al., 2016; GARZON et al., 2021; POLAT et al., 2012; SANEI-DEHKORDI et al., 2016; TUNES, 2019).

Arrivillaga, Rodríguez, e Oviedo (2008) fizeram uma avaliação preliminar aplicando larvas de *Lucilia sp.* diretamente sobre feridas cutâneas causadas por *L. amazonensis* em hamsters. Foi observado que as lesões apresentaram tecido de granulação sadio e taxa de cicatrização total variando entre 80 a 100% em um período de 24h após a aplicação das larvas estéreis. Polat et al. (2012) também analisaram o efeito da secreção de *Lucilia sp.* em reduzir a parasitemia e lesão frente à formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania sp.*, *in vitro* e *in vivo*, respectivamente (ARRIVILLAGA; RODRÍGUEZ; OVIEDO, 2008; CRUZ-SAAVEDRA et al., 2016; POLAT et al., 2012).

Mais recentemente, Cruz-Saavedra et al. (2016) usaram larvas e secreção larval de uma espécie de *Lucilia sp. in vivo*, previamente à infecção e também como tratamento de feridas causadas por *Leishmania panamensis* em hamsters. Este estudo evidenciou a melhora nas úlceras causadas pelo parasito em todos os tratamentos. O estudo verificou que a secreção, além de tratar, apresentou também um efeito protetor ao desenvolvimento de feridas causadas pelo parasito (CRUZ-SAAVEDRA et al., 2016). Outro estudo recente, Laverde-Paz et al. (2018), evidenciou a atividade antileishmanicida e de também a citotoxicidade, frente a promastigotas e amastigotas, da secreção larval derivada de *Calliphoridae in vitro*.

4.4.1 *Lucilia cuprina*

O gênero *Lucilia* é cosmopolita e possui grande diversidade com mais de 27 espécies, mas acredita-se que o número de espécies ainda desconhecidas é muito grande. Possui como característica principal o hábito sinantrópico, muitas espécies são saprófagas criando-se também em carcaças e organismos em decomposição, e alguns, especialmente machos, alimentam-se de néctar. Apresenta ciclo biológico holometabólico, com fases de ovo, larva, pupa e adulto, em que as larvas se caracterizam por seus hábitos alimentares necrófagos (CORDEIRO, 2014; MONTEIRO, 2017).

Dentre elas, a *Lucilia cuprina*, é conhecida como varejeira, pertencendo a uma das famílias de insetos mais comuns do mundo, com larga distribuição mundial, comumente encontrada em ambiente urbano e florestado no Brasil (Figura 10). Em geral, ocorrem com mais frequência no meio rural entre animais de criação (PESSANHA, 2013; RATCLIFFE et al., 2015).

Do ponto de vista sócio-econômico, a espécie *Lucilia cuprina* é uma das principais causadoras de miíase primária superficial em ovinos na África, Austrália e na Nova Zelândia, sendo responsável pela perda de milhões de dólares anuais pela indústria da lã e da carne. Esse

inseto é atraído por lã suja e com urina, mas alimenta-se apenas da superfície da pele e de exsudatos de lesão, não penetrando profundamente nos tecidos do hospedeiro. No Brasil, dentre os exemplos de moscas-varejeiras que utilizam substratos discretos e efêmeros para alimentação e postura dos ovos, destaca-se a espécie, que é importante do ponto de vista médico-veterinário, por ser, em várias regiões, responsável por casos de miíase secundária, principalmente em ovinos, gerando prejuízos (PESSANHA, 2013; SACKETT et al., 2006).

Em nosso país, pelo fato de ser sinantrópica e comumente encontrada em lixo urbano, substratos em decomposição, frutos caídos, néctar de flores e fezes humanas, é vetora em potencial, de enteropatógenos para o homem. O mecanismo de infestação se dá por meio da deposição de ovos em cadáveres, em feridas negligenciadas e supuradas, ou ainda, em particular, sobre a lã de ovelhas que possam estar sujas com urina, fezes ou sangue. Conhecida principalmente por sua utilização em terapia larval, alimentando-se de tecido necrosado, é usada também em resposta à busca de métodos adequados para controlar infecções de feridas crônicas por sua atividade antibactericida (SILVA, 2011a; WALL, 2012).

No Brasil, a terapia larval tem sido aplicada, apenas em um hospital universitário no Rio Grande do Norte, vinculado à Universidade Federal do Rio Grande do Norte (PINHEIRO et al., 2015), em caráter ainda experimental, e outras universidades já relatam uso e eficácia em animais (DILLMANN et al., 2022).

Para a terapia larval, devem ser utilizadas as espécies que se alimentam unicamente de tecido necrosado (MARCONDES, 2006). As mais reconhecidas para este fim são as larvas pertencentes à família Calliphoridae (Diptera), especialmente *Lucilia sp.* tendo como vantagem um rápido desenvolvimento, facilidade de criação *in vitro* e de desinfecção (DILLMANN et al., 2022).

Estudos testando a eficácia das secreções larvais de *L. cuprina* frente a bactérias também estão amplamente relatados e demonstraram eficácia sobre colônias de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (ARORA; BAPTISTA; LIM, 2011; DÍAZ-ROA et al., 2018; MASIERO et al., 2016; RAHIMI et al., 2021; TEH et al., 2017).

Já foi observada e caracterizada na excreção das larvas, a Lucifensina, porém sabe-se que existem diferenças de compostos encontrados nas secreções entre os diferentes estágios larvais. Alguns estudos identificaram que há uma modificação no padrão de proteínas durante o desenvolvimento larval de *L. cuprina*, passando de uma predominância de proteínas com alta massa molecular para um com proteínas de massas inferiores à medida que ocorre o desenvolvimento (MARTINS, 2013; TEIXEIRA et al., 2017).

Esses autores também inferiram que o padrão de proteínas secretadas por larvas desta espécie muda dramaticamente e o aparecimento e desaparecimento de certas moléculas refletem a função de estarem em diferentes condições ambientais e alimentares (FERNANDES et al., 2003; MARTINS, 2013; SILVA, 2011b; TEIXEIRA et al., 2017).

Figura 9 – Mosca da espécie *Lucilia cuprina* (Diptera: *Calliphoridae*)



Fonte: acervo pessoal.

4.4.2 *Sarconesia chlorogaster*

A espécie *Sarconesia chlorogaster* (WIEDEMANN, 1830) pertence à família Calliphoridae, possui aparelho bucal do tipo lambedor, tórax acinzentado com estigma respiratório anterior branco ou cinzento, notopleura com duas cerdas e abdome de cor metálica esverdeada (Figura 11). Suas larvas possuem o corpo afilado na parte anterior, com fortes ganchos bucais, e truncado na parte posterior, onde se abrem as placas respiratórias (CORDEIRO, 2014; MONTEIRO, 2017).

Dentre os califorídeos, a espécie *S. chlorogaster*, não possui ampla distribuição, é descrita somente na região sul do Brasil, nos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, e por esse motivo existem poucos estudos acerca deste inseto. São endêmicas da região Neotropical e sua distribuição geográfica ocorre em regiões de clima frio, com registros conhecidos na Argentina, Uruguai, e regiões de altitude próxima a 1000 metros como Bolívia, Peru e Chile (CARVALHO; RIBEIRO, 2000; RATCLIFFE et al., 2015).

No Brasil, em um estudo sobre sinantropia de dípteros, considerou *S. chlorogaster* como uma das espécies sinantrópicas mais frequentes na região de Curitiba, Paraná. Esta mosca é extremamente difícil de captura, ao longo de um ano, somente 7.225 califorídeos no Rio Grande

do Sul, e destes apenas 73 exemplares eram da espécie *S. chlorogaster* apresentando pico de captura no mês de novembro, onde a temperatura era de 18.4 °C e a menor ocorrência foi no mês de março com temperatura média de 23.3°C (PINTO et al., 2014; PORTO, 2016).

Possui hábito alimentar extremamente variável com elevado grau de sinantropia, esses insetos são atraídos por substâncias em processo de decomposição, fermentação, sangue e feridas. Desta forma, podem ser encontrados em abatedouros, frigoríficos, lixos domésticos, aterros sanitários, lixões a céu aberto, estábulos de gado leiteiro, aviários, dentre outros com preferência por áreas urbanas. As larvas de *S. chlorogaster* possuem hábitos necrófagos causando miíases secundárias (AL-SAEED; MAHMOOD, 2012).

Essa espécie também é relevante para a saúde pública devido à sua associação com detritos e resíduos humanos, sendo vetora de agentes causadores de importantes distúrbios entéricos (BAUMGARTNER; GREENBERG 1985; LAOS et al., 2004; QUEIROZ; CARVALHO, 2010). A transmissão de patógenos ocorre predominantemente de forma mecânica através do exoesqueleto, vômito, regurgitação ou fezes da mosca (GREENBERG, 1973). A ausência de saneamento básico, o acondicionamento inadequado de lixo e condições climáticas adequadas, contribui para manutenção e crescimento das populações desses ectoparasitos (PORTO, 2016; TEIXEIRA, 2017).

O ciclo biológico, em média, tem duração média de 20 dias, podendo variar conforme a temperatura. A eclosão da larva de primeiro ínstar ocorre em algumas horas após a postura (BONATTO, 1996). À medida que eclodem, as larvas de primeiro ínstar permanecem dispersas e locomovem-se em várias direções, nitidamente procurando por alimento. Após a primeira muda passam para o segundo ínstar submersas ao alimento, sempre mantendo a extremidade posterior (espiráculos) voltada para cima, em busca de aeração. Embora permaneçam agrupadas, as larvas de segundo ínstar são mais ativas que as de primeiro ínstar. No terceiro ínstar as larvas não ficam mais agrupadas ficando dispersas por toda a alimentação durante 2 ou 3 dias. Quando o terceiro ínstar está completo, as larvas cessam o processo alimentar e vão em direção a um local seco. A fase pré-pupa é caracterizada pela suspensão dos movimentos larvais, retração dos segmentos cefálicos e formação do "pupário branco", que se torna marrom escuro e com consistência rígida devido à esclerotinização do tegumento (FRAENKEL; SHASKARAN, 1973). Após alguns dias, ocorre o nascimento das moscas adultas totalizando 19 dias após a postura. A longevidade dos adultos, tanto machos, quanto fêmeas, é de mais ou menos 25 dias (BONATTO, 1996).

Figura 10 – Mosca da espécie *Sarconesia chlorogaster* (Diptera: Calliphoridae)



Fonte: Arquivo pessoal.

5 PRODUÇÃO CIENTÍFICA

Esta tese de doutorado originou um artigo e um manuscrito. O artigo intitula-se “***In vitro* activity of larval secretions from *Lucilia cuprina* against *Leishmania amazonensis*, *Trypanosoma cruzi* and cell lines**” e está publicado no Periódico *Brazilian Journal of Development* (Qualis B2). O manuscrito intitula-se “**Biological activity, antitumor potential and constituents of larval secretion extracted from *Lucilia cuprina* and *Sarconesia chlorogaster***” e encontra-se submetido ao periódico *Annals of Parasitology* (Qualis A2).

5.1 ARTIGO I – IN VITRO ACTIVITY OF LARVAL SECRETIONS FROM LUCILIA CUPRINA AGAINST LEISHMANIA AMAZONENSIS, TRYPANOSOMA CRUZI AND CELL LINES

***In vitro* activity of larval secretions from *Lucilia cuprina* against *Leishmania amazonensis*, *Trypanosoma cruzi* and cell lines**

Litiérri Razia Garzon^a, Mateus Fracasso^b, Altevair Rossato Viana^d, Marjorie Giacometti^c, Gisele Vaz Aguirre Samoel^c, Letícia dos Santos Petry^c, Matheus Dellaméa Baldissera^a, Luciana Maria Fontanari Krause^d, Silvia Gonzalez Monteiro^c.

^a Post-graduate Program in Pharmacology, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria (SM), Rio Grande do Sul (RS), Brasil (BR).

^b Post-graduate Program in Toxicological Biochemistry, Department of Biochemistry and Molecular Biology, UFSM, SM, RS, Brazil

^c Department of Microbiology and Parasitology, UFSM, SM, RS, BR.

^d Laboratory of Biosciences, Universidade Franciscana (UFN), SM, RS, BR.

*Corresponding author: liti_razia@msn.com; sgmonteiro@uol.com.br

Abstract

Research on natural products presents these valuable resources that are sources of biologically active compounds with activity against a variety of pathogens that affect human and animal health. Dipterans of the species *Lucilia cuprina*, belonging to the *Calliphoridae* family, known as blowflies, are cosmopolitan and have an important function in nature due to the development of their larvae in decomposing organic matter. Studies found that the digestive enzymes secreted by the larvae play crucial roles in the establishment and survival of these parasites in the host and environment. These flies have become promising in biotherapy because of the biological activity of their secretions that have bactericidal, antiparasitic and antifungal activities; nevertheless, there are few studies focusing on these secretions. Therefore, the objective of this work was to measure the activity of *L. cuprina* secretions *in vitro*, extracted from L3 larvae at various concentrations for 24 hours, against *Leishmania amazonensis*, *Trypanosoma cruzi*, and the melanoma tumor line B16-F10 and the human fibroblast line HFF-1. There was a reduction in the viability of *L. amazonensis* promastigotes in treatments with larval secretions of 0.25%, 1% and 2% (viability reduced to 43.33%, 60.00% and 37.33%

respectively). In the assay with *T. cruzi*, concentrations of 0.25% and 0.5% showed decreased viability of epimastigotes to 35.28% and 43.07%, respectively. Larval secretions showed cytotoxic capacity for tumor cells. The effect of 2% was significant in all assays (MTT, neutral red (NR) and crystal violet (CV), reducing viability to 79.3%, 85% and 85.6%, respectively. At 1%, there was a significant difference for both NR (74%) and CV (83.6%) assays. The concentration of 0.5% in the NR decreased viability to 80.6%. In tests with non-tumor lineages, secretion showed low toxicity, demonstrating safety. The fluorometric test performed for quantification of dsDNA (PicoGreen) indicated an increases of 14% to 25%. Fluorimetric results with the 2,7'-dichlorofluorescein marker (DCFH-DA) showed increases of 20% and 22% of reactive species at concentrations of 0.25% and 2%, respectively, suggesting the possible mechanism of cell death by free radicals. These results suggest that larval secretions from *L. cuprina*, at various concentrations, have antiprotozoal and cytotoxic activities in tumor cell lines.

Key words: Dipterans; Biotherapy; *Calliphoridae*; Trypanosomatidae; Tumor cells.

1 Introduction

The search for new therapeutic alternatives to treat parasitic diseases and carcinomas has been the focus of numerous scientific investigations. The discovery and use of drugs for the treatment of various diseases is considered one of the greatest contributions to humanity, allowing the control and cure of various pathologies (Steverding, 2017).

Neglected tropical diseases (NTDs) profoundly impact the world in terms of health, social and economics, and Brazil is an example of a developing country that particularly suffers from the neglect of these diseases; such diseases persist due to a lack of studies (Castro, 2010; Brasil, 2017; Brasil, 2020). American Tegumentary Leishmaniasis and Chagas disease are caused by protozoa of the family *Trypanosomatidae* of the genera *Leishmania* and *Trypanosoma*, respectively (Monteiro, 2017; Silva, 2009; Brasil, 2017; Souza, 2012; Steverding, 2017).

Current therapeutic strategies for leishmaniasis and Chagas disease are restricted (Chatelain and Konar, 2015). For leishmaniasis, treatment relies on pentavalent antimonials, introduced in Brazil in the 40s. These are drugs of choice in many countries, along with Amphotericin B[®], considered the second choice for treatment (Vanaerschot et al., 2014; Tunez, 2019). However, the chemotherapy available is limited and the efficacy is far from ideal, as there is no satisfactory drug therapy for all forms that the disease may present (Moreira, 2012; Fonseca, 2016; Furini, 2016; Garbian, 2017).

For Chagas disease, treatment includes Nifurtimox[®] and Benznidazole[®], which are the only agents allowed in Brazil. Although Benznidazole[®] is the primary drug, and it can produce cures in the acute phase, in the chronic phase, the treatment becomes only palliative, because

the trypomastigote forms evolve to amastigotes and, at this stage, the drugs cannot act efficiently (Brasil, 2020; Lozano, 2015; Silva, 2016; Tunez, 2019).

The drugs used to treat these two endemic diseases are highly toxic, with variable efficacy, the emergence of resistance is significant, and the costs of treatment are high. In recent decades, there has been an intense effort by researchers to develop alternatives to the treatment of these parasites, especially exploring natural products (Ramírez et al., 2012; Saadi et al., 2020; Brazão et al., 2020).

Melanoma is a type of malignant tumor with a high metastatic potential that is resistant to conventional anticancer agents. Although it is not the most frequent type of neoplasia, it has a high mortality rate and is a major global health problem (Inca, 2018; Viana, 2018; Xu and Mao, 2016). Generally, drugs used to treat cancer target cells that are multiplying and are not specific to the type of cancer. They are characterized by side-effects, toxicities, high costs and in some cases, resistance and ineffectiveness. Despite constant efforts and significant advances in research and development of new chemotherapeutic agents, the recurrence of disease due to tumor heterogeneity, resistance to chemotherapeutic agents, adverse reactions, toxicity and permanent damage caused by these treatments remain major problems and challenges in the search for cures (Zellmer et al., 2014; Zhao, 2016). Therefore, the search for new therapies that are more efficient, less toxic and safer is extremely important (Alvez, 2012; Perez, 2012; Brasil, 2015).

Lucilia cuprina is a species of the family *Calliphoridae* that has been used in biotherapy because of its proven biological activity. In Brazil, few studies have been carried out with this commonly found species; therefore, little is known about its constituents and possible activities (Al-saeed and Mahmood, 2012; Teh et al., 2013; Silva, 2013).

The great advantage of using biomolecules, such as larval secretions, is low toxicity, little or no side-effects, as well as characteristics of natural treatment with low production costs. The use of *L. cuprina* larvae is advantageous, as they are easy to breed, maintain and rapidly multiply in a relatively short time (Arrivillaga et al., 2008; Campo, 2017; Rocha, 2018).

Our research group has been conducting extensive screening of biological, phytochemical and synthetic compounds of insects with antiparasitic potential. Among the promising results is the larval secretions of this dipteran. The objective of the present study was to evaluate the *in vitro* biological activity of larval secretions of *L. cuprina* against *Leishmania amazonensis*, *Trypanosoma cruzi* and the cell lines B16F10 and HFF-1.

2 Materials and methods

2.1 Maintenance of the dipteran colony in the laboratory

The flies were kept in entomological cages (30 cm X 30 cm X 30 cm) at 25 ± 1 ° C under a 12 hours light/dark light cycle and 70% relative humidity in the vivarium. The adult flies were fed with honey and water ad libitum. Bovine liver was made available for oviposition. The larvae were kept in ventilated pots for the evolution of larval stages L1, L2 and L3. Subsequently, the L3 larvae were placed in a container with sand where they evolved to the pupal stage and hatched in adult male and female flies (Cossetin et al., 2018).

2.2 Extraction of larval secretions

Before proceeding with secretion collection, the L3 larvae were subjected to antisepsis with rapid washing in running water and 0.5% sodium hypochlorite for 5 minutes followed by rinsing with sterile distilled water. One hundred L3 larvae were used to acquire the secretions, which were incubated with 750 µl of phosphate buffered saline (PBS) for 5 hours at room temperature and protected from light. The larvae were removed from the solution and the material was centrifuged at 1300 g for 7 minutes. Subsequently, the material was filtered through a 0.22-µm filter and the filtered liquid was transferred to sterile Eppendorf tubes (Cruzsaavedra et al., 2016; Sanei-dehkordi et al., 2016).

2.3 Protozoa

The *L. amazonensis* strain (MHOM/BR/77/LTB0016) was purchased from the Protozoology Laboratory belonging to the Department of Microbiology, Immunology and Parasitology (MIP) of the Federal University of Santa Catarina (UFSC), together with that of *T. cruzi* (cepaY). Both were maintained and cryopreserved at the Veterinary Parasitology Laboratory of the Federal University of Santa Maria (LAPAVET-UFSM).

To test the antiprotozoal activity, it was necessary to culture promastigote forms of *L. amazonensis*, which were maintained in Schneider[®] culture medium, supplemented with fetal bovine serum (FBS), human urine, antibiotics; cultivation of *T. cruzi* epimastigote forms was made in LIT medium. Both protozoa were cultured at 37 °C and 5% CO₂, specific for their development.

In order to maintain in vitro cultivation, weekly growing was carried out with variations depending on the confluence of the strain, avoiding media saturation and mortality rate according to Romão et al. (2006) and Castro (2010).

2.4 Evaluation of the in vitro activity of larval secretions of *L. cuprina* in *L. amazonensis* promastigotes and epimastigotes of *T. cruzi*

The tests were performed in 96-well plates, with a final concentration of 5×10^6 parasites/ml in specific medium for each protozoan, incubated at 37 °C in 5% CO₂ in the presence of various concentrations (0.25%, 0.5%, 1% and 2%) of larval secretions (POLAT et al., 2012). As negative and positive controls, dimethyl sulfoxide (DMSO) (2%) and Amphotericin B[®] were used for *L. amazonensis* and for the tests with *T. cruzi*, DMSO (2%) and Benznidazole[®] were used, respectively. After 24 hours of incubation, microscopic counting of active parasites was performed in the Neubauer chamber to verify mortality determined by the method of Brener (1962).

2.5 Cell culture

The melanoma strains B16-F10 and human fibroblast HFF-1 belonging to the Biosciences Laboratory of the Franciscan University (UFN) were acquired from the Rio de Janeiro Cell Bank (BCRJ, Rio de Janeiro, Brazil). The cells were grown in Dulbecco's Modified Eagle Medium[®] (DMEM), supplemented with 10 % of fetal bovine serum and 1% of antibiotics (penicillin/streptomycin), maintained at a temperature of 37 °C, and 5% CO₂, as recommended by the BCRJ. Before reaching the confluence (70–80% of their saturation density) the cells were subjected to subculture to avoid eventual cell death due to excess cells.

For expansion, the cells were mechanically removed from the surface of the 25 cm² bottle with the aid of a cell scraper. Then, the cells with culture medium were transferred to falcon tubes that were centrifuged for 5 minutes at 1300 RPM and the formed pellet was resuspended in culture medium and transferred to a new 75-cm² bottle.

To perform the tests, cells were seeded in 96-well microplates containing complete culture medium at a concentration of 1×10^4 cells/200 µL (well), in triplicate, incubated at a temperature of 37 °C with 5% CO₂. In the positive control, hydrogen peroxide at a concentration of 100 mM (Ourique et al., 2017) was added in the cytotoxicity tests (Park, 2013) in the 2,7'-dichlorofluorescein test. After 24 hours of cell adhesion, the medium was removed and new medium was added with the secretion of *L. cuprina* in concentrations of 0.1%, 0.25%, 0.5%, 1% and 2% and again incubated in the same conditions for tests 2.5.1; 2.5.2; 2.5.3; 2.5.4 and 2.5.5, performed at the UFN Biosciences Laboratory and described below.

2.5.1 Colorimetric assay (MTT)

The colorimetric test was performed according to Mosmann (1983). After the 24 hours incubation period, 20 μL was added to the wells of the sterile solution containing MTT (5 mg/mL 1x PBS) and the plates were again incubated for another 4 hours. Then, the supernatants were carefully removed from the wells and the cells were resuspended in 200 μL of DMSO. The inhibition of cell growth was detected by measuring the absorbances at 570 nm in an ELISA device.

2.5.2 Neutral red colorimetric assay (NR)

The neutral red (NR) colorimetric assay was performed according to Repetto (2008). After 24 hours of incubation of the plate containing medium with the cells and secretions in the various concentrations under analysis, the supernatants were removed and the dye was added at 0.04 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 3 hours. Subsequently, the cells were washed to remove excess dye and then a solution containing 1% acetic acid, 50% ethanol and 49% water was added to disrupt cell structures. The reading was performed on a spectrophotometer with a wavelength of 540 nm.

2.5.3 Crystal violet colorimetric assay (CV)

The CV colorimetric assay was performed according to Feoktistova (2016). To perform violet crystal staining in the 96-well plates, initially the medium containing the cell line and secretions at the various concentrations was discarded and 100 μl of the crystal violet solution (5% crystal violet, 1.7% NaCl, 3% paraformaldehyde in 33.3% ethanol) was added to the wells and maintained for 3 minutes at room temperature. Subsequently, the absorbance was evaluated at 570 nm in a spectrophotometer.

2.5.4 Fluorimetric DNA Quantification Assay using DNA-PicoGreen® reagent

The fluorometric test was carried out according to Ahn et al. (1996). An additional assay was performed from the quantification of the concentration of double-stranded DNA (dsDNA) present or not in the supernatant in the culture plate containing the cell line and the various concentrations of *L. cuprina* secretions. For this analysis, dsDNA PicoGreen® fluorescent dye was used. After 24 hours of incubation, the culture plate was centrifuged and 10 μL of the supernatant was transferred to a new culture plate. Then, 80 μL of 1x tris-EDTA buffer (Tris HCl 10 mmol/L and EDTA 1 mmol/L pH = 7.5) and 5 μL of the PicoGreen reagent were added. The plate was incubated for 5 minutes at room temperature (protected from light) and the

reading was performed at 520 nm emission and 480 nm wavelengths on a fluorimeter (SpectraMax® i3x - Molecular Devices).

2.5.5 2,7'- Dichlorofluorescein (DCF)

The DCF assay was performed according to Esposti (2002), and after the treatment period, 50 μ L of the cell suspension, 65 μ L of 10 mmol/L Tris HCl and 10 μ L DCFH-DA 10 μ M were transferred to new plates, and incubated for 30 minutes, at 37 °C, with 5% CO₂, in a humidified incubator. After that period, the fluorescence was measured in a spectrofluorometer and the results were expressed as fluorescence intensity of the treatments in relation to the control with cells alone.

3 Statistical analysis

The analyses were performed using GraphPad Prism. To compare treatments, one-way analysis of variance (ANOVA) was performed, followed by Tukey's post hoc test. Statistically different values were considered with P <0.05 *, P <0.01 ** and P <0.001 ***.

4 Results

The data obtained in the evaluation of the in vitro antiprotozoal activity of larval secretion demonstrated its capacity to reduce the viability of *L. amazonensis* promastigotes in the 24 hours period. The results are shown in Figure 1, expressed as a percentage of viability of promastigotes due to the assessed concentration of larval secretion. The treatments showed a significant difference at concentrations of 0.25%, 1% and 2% of larval secretions, being efficient in reducing the parasite viability to 43.33%, 60.00% and 37.33%, respectively; this was greatest reduction of viability found in the study with *L. amazonensis*, when compared to the control.

The antiprotozoal activity of larval secretion of *L. cuprina* demonstrated the ability to reduce the viability of *T. cruzi* epimastigotes in vitro after 24 hours (Figure 2). The treatments with the lowest concentrations of larval secretions significantly reduced cell viability in relation to control. The lowest concentration, 0.25%, showed the highest activity in this study in general, with a decrease in the viability of epimastigotes to 35.28%, without dose-dependence, as the concentration of 0.5% showed viability of 43.07%.

The in vitro cytotoxicity assays and the viability of the tumor line B16-F10 and non-tumor HFF-1 were evaluated after 24 hours of exposure to different concentrations of the larval secretion of *L. cuprina* using various methods.

The colorimetric cytotoxicity assays of larval secretion of *L. cuprina* demonstrated low or no toxicity in non-tumor cells after 24 hours of exposure to the studied concentrations (Figure 3). These results serve as a control for safety in their subsequent use in probable test in vivo since, in the MTT test, the larval secretion did not present a decrease in non-tumor cell viability when compared to the negative control (cells + culture medium) at any studied concentration.

In the NR assay, the concentration of 1% was active; the cell viability was 87.6%, showing low cytotoxicity very far from the positive control H₂O₂ (hydrogen peroxide) which reduced the number of viable cells.

In the CV assay, only concentrations of 0.5% and 2% showed activity, with cell viability of 90% and 88.6%, respectively. There was extremely low cytotoxicity, very close to negative control, while the positive control reduced cell viability to 19%.

From the analysis of cytotoxicity with the tumor line, the larval secretions were active, capable of decreasing cell viability (Figure 4). The concentration of 2% reduced the amount of cells in all assays (MTT, NR and CV) reducing viability to 79.3%, 85% and 85.6%, respectively. There was also possible to notice difference in concentration 1% for both NR and CV, with viability to 74% and 83.6%, respectively. In addition, it is observed that at the concentration of 0.5% in the NR test the cell viability was 80.6%.

The fluorometric tests (Figure 5) were performed with the tumor line B16F10 over a 24 hours period. The dsDNA quantification test showed that it was not only possible to identify the cell's genetic material in the extracellular medium at the concentration of 0.25%, but also the treatments 0.1%, 0.5%, 1% and 2% caused high cytotoxicity and there was an increase in the amount of extracellular DNA of 14%, 18%, 15% and 25%, respectively, when compared to the control. In the test that evaluates oxidative stress, DCFH-DA, the results obtained showed an increase in the production of reactive species at concentrations of 0.25% and 2%. This quantification of the increase in reactive species was 20 and 22%, respectively, which can lead to damage to macromolecules like DNA, evidenced in PicoGreen with a significant increase, suggesting that the tests were complementary.

5 Discussion

In the results of the larval secretion activity against *L. amazonensis*, we observed a viability of 37.33%, a very high reduction rate, for the highest concentration tested. Like Rottini et al. (2015), who tested the natural product α -bisabolol, also obtained significant results in the same conditions, showing that about 69% of the promastigotes suffered damage to the mitochondrial membrane after treatment. These important morphological changes, indicating

damage to the organelle, suggest inhibition of the parasite's metabolic activity through the ability to cross membranes, attributed to the presence of the hydroxyl group in this compound. Therefore, we believe that the antileishmanial power of secretion is due to the inhibition of cellular respiration, which interferes with oxygen metabolism and consequently generates reactive species, damaging DNA molecules.

Another hypothesis to explain the antiprotozoal activity is the inhibition of ergosterol biosynthesis. Reported by several authors as Tunez in 2015, for example, who tested naphthoquinones involved in various types of biological activities related to damage caused by structural changes and the potential of the mitochondrial membrane; the authors demonstrated leishmanicidal, trypanocidal and antitumor activities (Rocha, 2018; Sucre et al., 2017; Tunez, 2015).

The results obtained in relation to the viability of *L. amazonensis* are satisfactory when compared to a study by Polat et al. (2012) who also evaluated the larval secretion of dipterans. They demonstrated the activity of *L. sericata* against promastigote forms only with 100% concentration of the secretion directly on the parasite; however, they were unable to verify activity in culture medium. In addition, a study with larval secretion of *Calliphoridae*, also in the period of 24 hours and against promastigote forms, demonstrated efficacy in low concentrations, with significant viability reduction greater than 50%, in agreement with the findings of our study (Laverde-paz et al., 2018).

A study conducted by Arrivillaga et al. (2008) was a preliminary assessment with *Lucilia* spp. in cutaneous wounds caused by *L. amazonensis* in hamsters. They authors reported successful healing of localized lesions after treatment, reducing between 80% and 100% of the lesion area in only 12 h. As the protozoan was completely non-viable, further tests should be carried out to analyze an alternative for the treatment of cutaneous leishmaniasis. The exact mechanism of action of larval secretion in cutaneous leishmaniasis is unknown. It is believed that the presence of proteolytic enzymes liquefies the necrotic tissue, producing ammonia that changes the pH, resulting in unfavorable alkaline conditions for many species (Díaz-roa et al., 2018).

More recently, larval secretions of two species of flies were also tested for cutaneous leishmaniasis. The results showed that both were able to reduce the number of parasites and that *Lucilia* spp. were significantly more effective than *Sarconesiopsis* spp., which also had a better effect in reducing the size of ulcers in BALB/c mice, at a concentration of 5%. In that same study, cytotoxicity for the cell line was found at a concentration of 40% of larval secretion with high toxicity, reducing viability to 20%, while the concentration of 5% did not show any

toxic effect. The concentrations determined by these researchers are much higher when compared to those of the present study, as we showed activity in much lower concentrations of larval secretion, 0.25%, 1% and 2% (Sanei-dehkordi et al., 2016).

In a study by Cruz-saavedra et al. (2016), dipteran larval secretions were tested before and after the appearance of lesions caused by *Leishmania panamensis* in hamsters, demonstrating improvement in ulcers, also presenting protective effect on the development of wounds. In addition, the histopathological examination confirmed that the infection revealed the presence of the parasite in all animals in the study except those that received pretreatment with larval secretions. These results demonstrate that larval secretion activity can be used to treat cutaneous leishmaniasis, which is in accordance with our in vitro results.

The action of larval secretions of *L. cuprina* in the present study showed high toxicity for protozoa and low toxicity for the cells of the mammalian host. This suggests that the secretion is capable of activating the apoptotic process in protozoan cells by alkylating the genetic material and increasing the oxidative stress, by forming reactive species that produce highly electrophilic intermediates that can affect various molecules in the cell (Souza, 2019).

The results obtained in our investigation of larval secretion are promising because bioactive natural products and their derivatives elucidated by Tunez (2019) did not demonstrate an expected trypanocidal capacity in any of the different methods tested in *T. cruzi*. However, a study with an extract of the roots of *Arrabidaea brachypoda* demonstrated significant activity in vitro against *T. cruzi* with treatment for 24 hours, as in our investigation (Rocha et al., 2014).

Another investigation of antiprotozoal activity used the diterpene 12-hydroxy-11,14-diketo-6,8,12-abietatrien-19,20-olide (HABTO) obtained from the aerial parts of *Salvia cuspidata* on *T. cruzi* epimastigotes, with inhibitory effect of the parasite at low concentrations and low cellular toxicity in 24 hours trials, as was the case in our study. They also verified intense vacuolization in the parasite and concluded that the activity of the compound was due to the increase in lipophilicity (Lozano et al., 2015).

Through the analysis of the essential oil of compounds of the *Anacardiaceae* family, we found that the antiprotozoal activity and cytotoxicity were mediated by increased lysosomal capacity and nitric oxide production. The compounds are able to cross the cytoplasmic membrane, affecting the structure of the various layers of polysaccharides, fatty acids and phospholipids, consequently changing permeability. In addition, the production of nitric oxide, which is extremely reactive, is stimulated by protective cytokines such as interferon gamma, causing damage to parasite DNA (Moreira, 2014; Carvalho et al., 2017; Menezes et al., 2017). In view of this, we believe that the antiprotozoal activity of larval secretions is related to the

damage of the cytoplasm by interrupting the metabolic pathways of lipids and proteins, interfering in the potential of mitochondrial membranes, generating an increase in oxidative stress and damage to DNA.

The focus of our investigation is the search for a new anti-trypanosomal agent, with little or no toxicity to host cells, as was the aim of Khraiweh et al. (2012), who investigated 1,4-naphthoquinone and Nifurtimox[®] derivatives replaced by imido group; they were able to demonstrate promising activity against trypanosomes, testing more potent agents than Nifurtimox[®], through derivations in the structure-activity of the compounds. Some of these compounds were not very cytotoxic to a fibroblast cell line, as was the case for our findings in this work.

These new therapeutic targets appear to have great relevance and may serve as possible solutions for the development of new trypanocides. In short, this reflects the importance of assessing larval secretion in a non-tumoral lineage such as fibroblasts, because we detected little or no toxicity, in line with the evaluation of the activity of the extract of the root of *Commelinaceae*, which showed important trypanocidal activity, though against fibroblasts it presented moderate cytotoxicity, suggesting that the secretions may be well tolerated by host cells (Estevam et al., 2016).

In this study, in addition to the antiprotozoal activity, we showed the cytotoxic capacity against a tumor lineage, as did Tunez (2019), who performed a preclinical study with 24 gold (Au) complexes and confirmed these products as metallopharmaceuticals with antileishmanial and antitumor activity. All compounds they tested showed potent activity, mainly in a murine melanoma lineage, caused by oxidative stress, generating reactive oxygen species or generating its accumulation by inhibiting the trypanothione reductase enzyme and causing mitochondrial damage. There were data that corroborate our MTT, NR and CV assays because the larval secretions were active against B16F10. These findings also agree with our fluorimetric assays for quantification of dsDNA and dichlorofluorescein that signal genetic material in the extracellular environment and increases in reactive intracellular species.

Other in vitro studies highlight the effect of destabilizing the lipid bilayer and membrane integrity measured through the fluorescence intensity of the dye that has the ability to penetrate these damaged cells and intercalate with nucleic acid fragments. When diphtheria secretions bind to DNA causing interference, it is suggested that they inhibit intracellular functions, explaining our results expressed in the assay with dsDNA PicoGreen against the tumor line (Díaz-roa et al., 2016; Sousa et al., 2004).

Díaz-Roa et al. (2016) also tested dipteran secretions against non-tumor Vero cells, and the viability was approximately 92%, a result very similar to ours, in which we analyzed safety against a non-tumor fibroblast cell. Viability was 87% in a single concentration of all under analysis in the NR test; in CV, only two concentrations showed cytotoxicity being very close to the negative control, with a 10% and 11% reduction in viability, while the positive control was above 81%. Likewise, we did not show any toxic potential in the MTT assay in any of the concentrations evaluated, which demonstrated safety with 100% viability.

Other studies also show cytotoxicity of natural products against cell lines, such as essential oils of *Eucalyptus benthamii*, and the results indicate that cytotoxic activity probably involved cell death by apoptosis with cell DNA degradation (Döll-boscardin et al., 2012). The production of reactive species in biological systems generates increased oxidative stress that can lead to irreversible damage to macromolecules, such as DNA. It is noteworthy that, in this study, we showed extracellular DNA, reinforcing the possibility that the larval secretion has antitumor activity inducing cell death by the generation of reactive species.

Sousa et al. (2012) found that lemon balm essential oil (*Melissa officinalis*) has cytotoxic activity against some cancer cell lines, including B16F10, and that they are potentially effective in altering the enzymatic activity of mitochondria and starting an injury that leads to cell death, corroborating our study. It has also been reported that these natural products can cause damage to the cell membrane, as they cause depolarization and alter fluidity through free radicals.

The great advantage of using biomolecules is evident, such as larval secretion, with low toxicity, little or no side effects, in addition to being a natural treatment with low cost for production. They are also advantageous also because the insect species in use is easy to maintain and multiply in a relatively short time. In view of the above, the use of larval secretions, considering all the effects provided or modulated by it, can reduce parasitemia and the viability of cancer cells.

There are still few studies on the use of larval secretion of *L. cuprina*; however, we have shown that, even in low concentrations, there was *in vitro* activity against flagellated protozoa (*L. amazonensis* and *T. cruzi*); there was cytotoxic activity in the melanoma tumor line and we also demonstrated safety of its use in normal healthy cells. From these results, we suggest that characterization of larval secretions and testing *in vivo* are necessary to better elucidate their activity for use against *T. cruzi*, *Leishmania* as well as in tumor cells.

Conflicts of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

Financial support

This work was supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

Figures

Figure 1

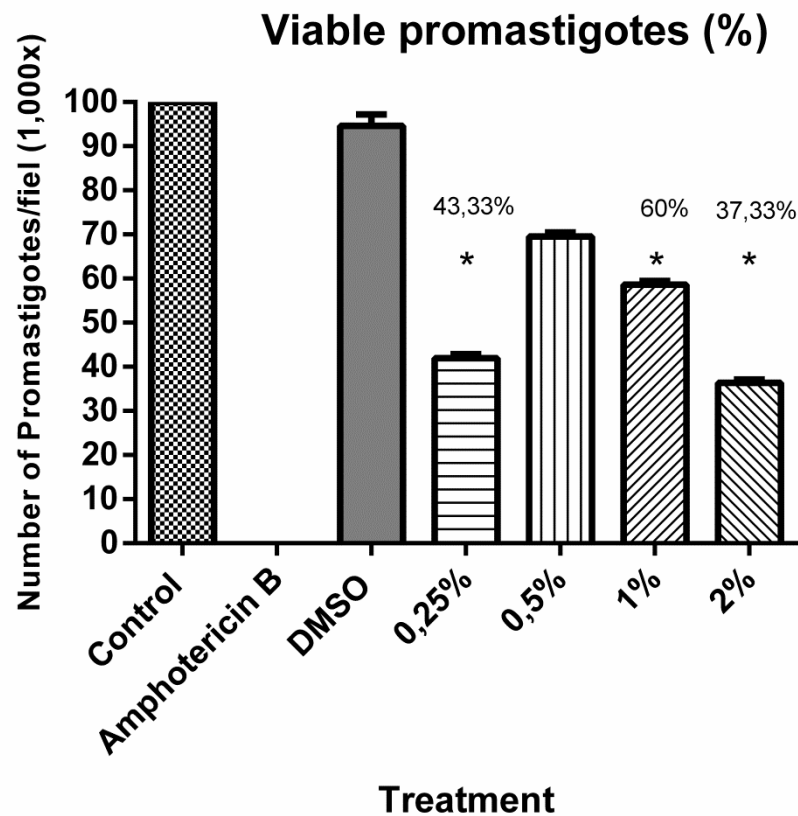


Figure 1. Antiprotozoal activity of larval secretion of *L. cuprina* in vitro against promastigote forms of *L. amazonensis*. Results expressed as a percentage of the negative control (100%). Reading at 24 hours with a final volume of 180 μ l containing 106 promastigotes/ μ l. Percentage of viability of promastigotes due to the concentration of larval secretion (LS). LS 0.25% (43.33), LS 0.5% (71.06), LS 1% (60.0) and LS 2% (37.33). The data represents mean \pm SEM of three independent experiments, analyzed Two-Way ANOVA with post-hoc Tukey test. * $p < 0.05$ (* Control vs LS or *L. amazonensis* or *L. amazonensis* + SL group) (#SL vs Control, *L. amazonensis* or *L. amazonensis* + SL group)

Figure 2

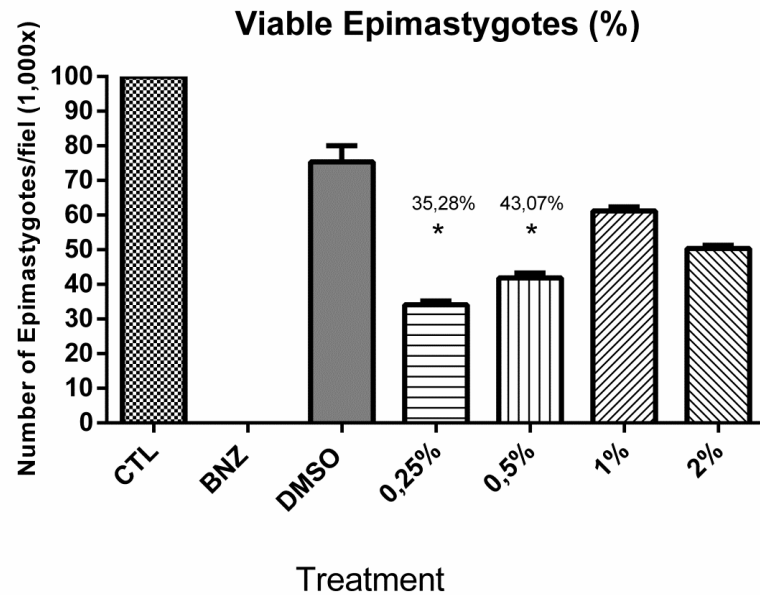


Figure 2. Antiprotozoal activity of larval secretion of *L. cuprina* in vitro against epimastigote forms of *T. cruzi*. Results expressed as a percentage of the negative control (100%). Reading in 24 hours with a final volume of 180 μ l containing 10^6 epimastigotes/ μ l. Percentage of viability of epimastigote forms due to the assessed concentration of larval secretion (LS). LS 0.25% (35.28), LS 0.5% (43.07), LS 1% (64.29) and LS 2% (51.38). The data represents mean \pm SEM of three independent experiments, analyzed Two-Way ANOVA with post-hoc Tukey test. * $p < 0.05$ (* Control vs LS or *T. cruzi* or *T. cruzi* + SL group) (#SL vs Control, *T. cruzi* or *T. cruzi* + SL group).

Figure 3

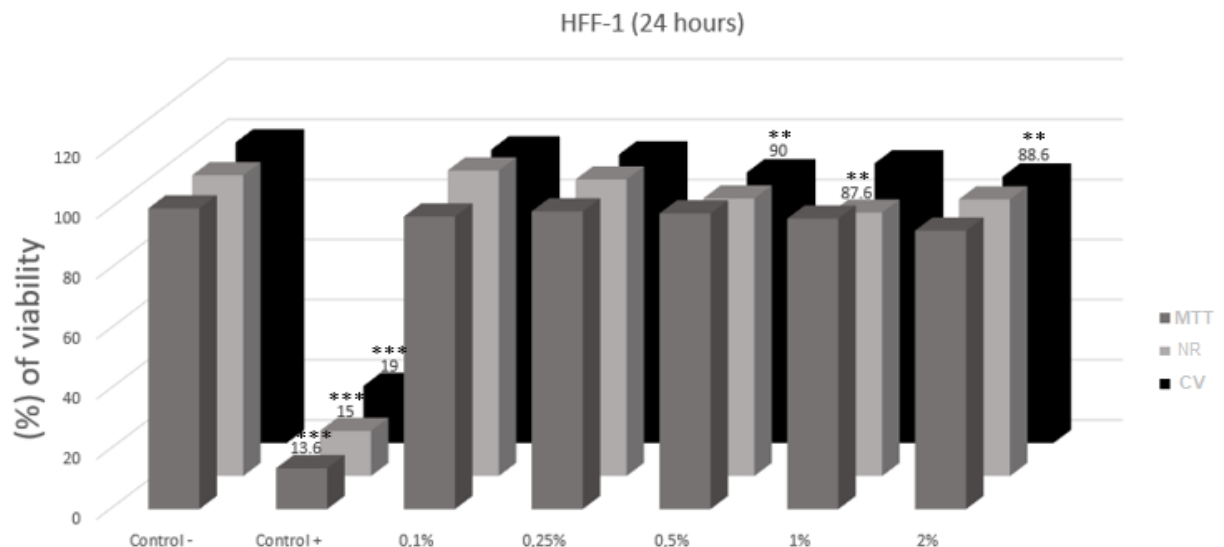


Figure 3. Colorimetric cytotoxicity assays in non-tumor line HFF-1. Results expressed as a percentage of the negative control (100%). Negative control (C-): cells in culture medium (1×10^4 cells/200 μ L/well). Positive control (C+): cells in culture medium and hydrogen peroxide (100 mM). MTT. Neutral red (NR). Crystal violet (CV). Data expressed as mean \pm standard deviation (SD). The means followed by the symbology do not differ statistically. The analyzes were performed by one-way variance (ANOVA), followed by the Tukey post-test. Values with $p < 0.05$ were considered statistically significant. Being * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

Figure 4

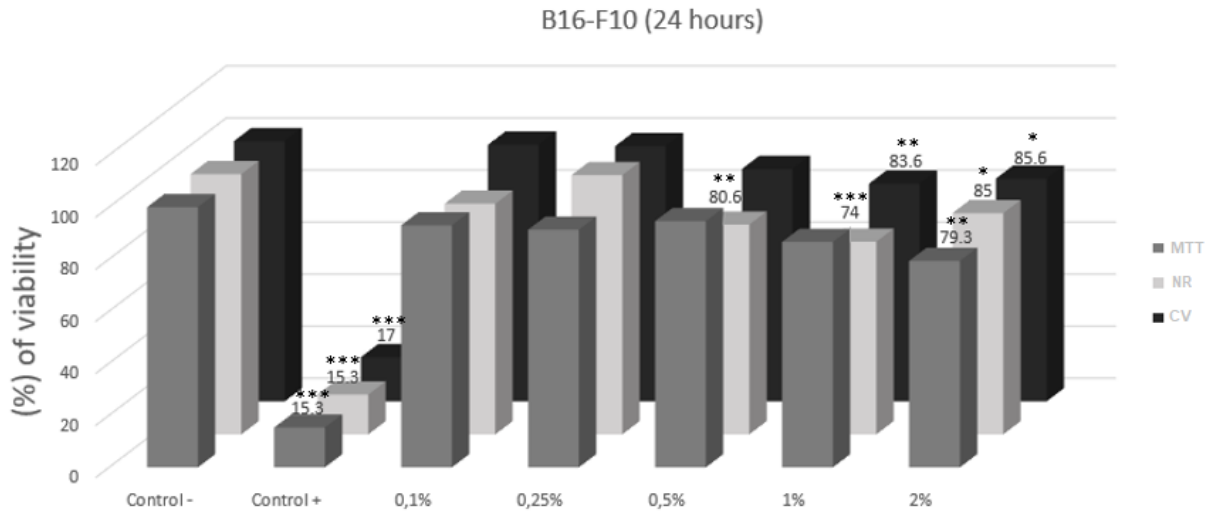


Figure 4. Colorimetric cytotoxicity assays in the murine melanoma tumor line B16-F10. Results expressed as a percentage of the negative control (100%). Negative control (C-): cells in culture medium (1×10^4 cells/200 μ L/well). Positive control (C+): cells in culture medium and hydrogen peroxide (100 mM). MTT. Neutral red (NR). Crystal violet (CV). Data expressed as mean \pm standard deviation (SD). The means followed by the symbology do not differ statistically. The analyzes were performed by one-way variance (ANOVA), followed by the Tukey post-test. Values with $p < 0.05$ were considered statistically significant. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

Figure 5

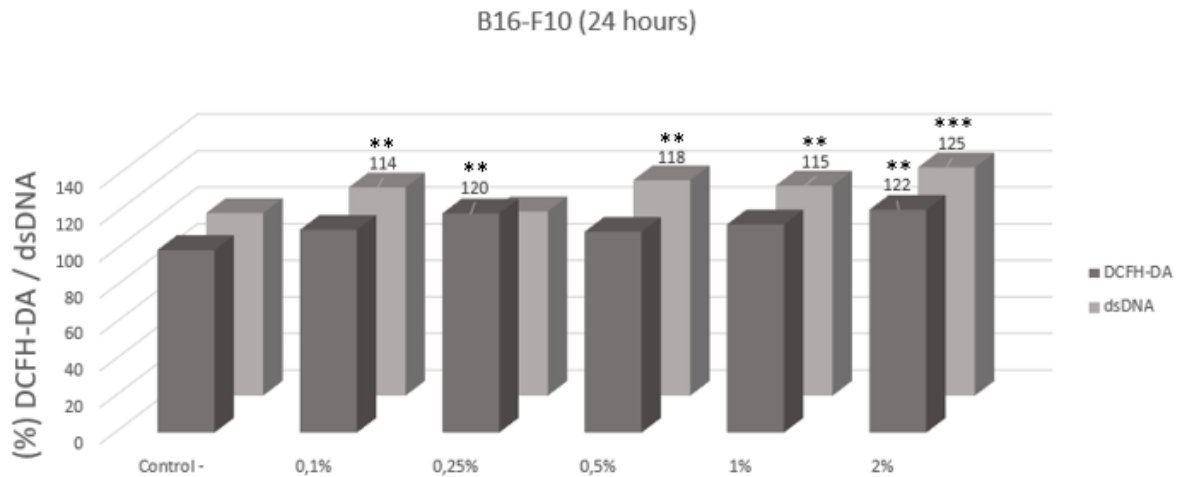


Figure 5. Fluorimetric assays for quantification of dsDNA and dichlorofluorescein in the murine melanoma tumor line B16-F10. Results expressed in fluorescence intensity emitted. Negative control (C-): cells in culture medium (1×10^4 cells/200 μ L/well). Positive control (C+): cells in culture medium and hydrogen peroxide (100 mM). PicoGreen dichlorofluorescein. Data expressed as mean \pm standard deviation (SD). The means followed by the symbology do not differ statistically. The analyzes were performed by one-way variance (ANOVA), followed by the Tukey post-test. Values with $p < 0.05$ were considered statistically significant. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

References

1. AHN, S. J. PicoGreen quantitation of DNA: Effective evaluation of samples pre- or post-PCR. *Nucleic Acids Research*, v. 24, n. 13, p. 2623–2625, 1996.
2. AL-SAEED, W. M.; MAHMOOD, H. J. Effect of Maggot (larva) Secretions on Bacterial Growth. *Rafidain Dent J.* v.12, n. 1, p. 160-164, 2012.
3. ALVEZ, M. C. da S. *et al.* Uso da associação de benznidazol e espiro lactona em camundongos na fase aguda da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. *Ver de Patol Trop.* v. 41, n. 2, p. 179-193, 2012.
4. ARRIVILLAGA, J. Evaluación preliminar en un modelo animal de la terapia con larvas de *Lucilia sericata* para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea. *Biomédica* vol.28 n 2 Bogotá Apr./June 2008, ISSN 0120-4157
5. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar/Ministério da Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Brasília: Ministério da Saúde, 2017.
6. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de vigilância da Doença de Chagas Aguda no Brasil: série histórica 2013/ Ministério da Saúde, Depa de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Brasília: Ministério da Saúde, 2015.
7. BRAZÃO, V. *et al.* *T. cruzi* infection among aged rats: Melatonin as a promising therapeutic molecule. *Experimental Gerontology*, 110922.doi:10.1016/j.exger.2020.110922 url to share this paper:sci-hub.tw/10.1016/j.exger.2020.11092
8. BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, 1962, v.4, p.389-396
9. CARVALHO, C. E. S. *et al.* Anti-Leishmania activity of essential oil of *Myracrodruon urundeuva* (Engl.) Fr. All.: Composition, cytotoxicity and possible mechanisms of action. *Experimental Parasitology*, v. 175, p. 59-67, abr. 2017.
10. CASTRO, N. J. C. Estudo do microcultivo *in vitro* para o isolamento de *Leishmania* sp no Estado do Pará. 2010. 72 p. Dissertação (Mestrado em doenças tropicais)-Universidade Federal do Pará, 2010.
11. CHATELAIN, E.; KONAR, N. Translational challenges of animal models in Chagas disease drug development: a review. *Drug Design, Development and Therapy* 2015;9 4807–4823
12. COSSETIN, L. F. *et al.* *In vitro* Safety and Efficacy of Lavender Essential Oil (Lamiaceae) as an Insecticide Against Houseflies (Diptera: *Muscidae*) and Blowflies (Diptera: *Calliphoridae*). *Journal of Economic Entomology*. v.3, p.1-9, 2018.
13. CRUZ-SAAVEDRA, L. *et al.* Theeffectof *Lucilia sericata*-and *Sarconesiopsis magellanica*-derived larval therapy on *Leishmaniapanamensis*. *Acta Tropica* 164, 280–289, 2017.
14. DÍAZ-ROA, A. *et al.* *Sarconesin*: *Sarconesiopsis magellanica* Blowfly Larval Excretions and Secretions with Antibacterial Properties. *Frontiers in Microbiology*, v. 9, p. 2249, 2018. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02249.
15. DÖLL-BOSCARDIN, P. M. *In Vitro* Cytotoxic Potential of Essential Oils of *Eucalyptus benthamii* and Its Related Terpenes on Tumor Cell Lines. *Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* Volume 2012, Article ID 342652, 8 pages. doi:10.1155/2012/342652
17. ESPOSTI, M. D. Measuring mitochondrial reactive oxygen species. *Methods*, v.26, p.335-340, 2002. doi:10.1016/s1046-2023(02)00039-7
18. ESTEVAM, E.B.B. *et al.* Avaliação das atividades antibacteriana, tripanocida e citotóxica
19. FEOKTISTOVA, M. Crystal Violet Assay for Determining Viability of Cultured Cells. *Cold Spring Harb Protoc*; 2016; doi:10.1101/pdb.prot087379

20. FONSECA, F.R.M. Influência da carga parasitária e do sítio de inoculação na imunopatogênese da Leishmaniose cutânea por *Leishmania braziliensis* em hamsters. 2016. 90 f. Dissertação (mestrado em Patologia) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.
21. FURINI, J. Estratégias terapêuticas usando o ácido ursólico sobre infecções determinadas por tripanosomatídeos. 2016. 145f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto- Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.
22. GARBAN, C. A. S., *et al.* Multiprofessional approach in the diagnosis of leishmaniasis: a case report. *Ar Heal Inv.* v. 6, n. 8, p. 59-362, 2017.
23. INCA (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER). Estimativas 2018. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/estimativa/2018/estimativa-2018.pdf> (acesso em: 30 mai de 2020).
24. KHRAIWESH, M.H. *et al.* Atividades anti-timpanossômicas e citotoxicidade de alguns novos derivados 1,4-naftoquinona imidosubstituídos. *Arch Pharm Res.* 2012; 35 (1): 27-33. doi: 10.1007
25. LAVERDE-PAZ, M. J. *et al.* Evaluating the anti-leishmania activity of *Lucilia sericata* and *Sarconesiopsis magellanica* blowfly larval excretions/secretions in an in vitro model. *Acta Tropica*, 177, 44–50. doi:10.1016/j. 2018
26. LOZANO, E. S. *et al.* An abietane diterpene from *Salvia cuspidata* and some new derivatives are active against *Trypanosoma cruzi*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 25(23), 5481–5484. doi:10.1016/j.bmcl.2015.10.082
27. MENEZES, C.A.S. *et al.*, A resposta imunológica dos portadores da doença de Chagas. Resposta Imune. LIVRO ONLINE. Portal Doença de Chagas, Fiocruz. Acesso em 28 junho em: <http://chagas.fiocruz.br/resposta-imune/> 2017.
28. BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Doença de Chagas: 14 de abril – Dia Mundial. *Bol Epidemiol*, 2020
29. MONTEIRO, S. G. Parasitologia na Medicina Veterinária. 2. ed. Rio de Janeiro: Roca Ltda: 2017.
30. MOREIRA, B. O. Estudo químico e avaliação das atividades biológicas de *Schinopsis brasiliensis* (Anacardiaceae) e quantificação dos bioativos de *Cenostigma macrophyllum* (Leguminosae). Tese (Doutorado)- Pós-Graduação em Química do Instituto de Química da Universidade Federal da Bahia, 262 f, 2014.
31. MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983
32. OURIQUE, A. *et al.* Evaluation of Stability and In Vitro Security of Nanoemulsions Containing *Eucalyptus globulus* Oil. *Bio Med Research International*, doi.org/10.1155/2017/2723418, 2017.
33. PARK, W. H. H₂O₂ inhibits the growth of human pulmonary fibroblast cells by inducing cell death, GSH depletion and G1 phase arrest. *Molecular Medicine Reports*, v.7, p.1235-1240, 2013.
34. PEREZ, H. A. G. Diagnóstico, caracterização molecular e epidemiologia de tripanossomas. 2012. Tese (Doutorado em Parasitologia) Universidade de São Paulo, 2012.
35. POLAT, E. *et al.* Detection of anti-leishmanial effect of the *Lucilia sericata* larval secretions in vitro and in vivo on *Leishmania tropica*: First work. *Experimental Parasitology*, v. 132, n. 2, p. 129-134, oct. 2012.
36. RAMÍREZ, I. *et al.* Estudos *in vitro* e *in vivo* da atividade tripanocida de quatro derivados terpenóides contra *Trypanosoma cruzi*. *Am J Trop Med Hyg.* 2012; 87 (3): 481-8. doi: 10.4269

37. REPETTO, G. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature protocols*, vol.3 n.7. 2008
38. ROCHA, C. et al. Dimeric flavonoids from Arrabidaea brachypoda and assessment of their anti-Trypanosoma cruzi activity. *Journal of Natural Products*, v. 77, n. 66, p. 1345-1350, 2014.
39. ROCHA, C. M. R. Avaliação dos efeitos tóxicos de novas substâncias bioativas: detecção de estresse oxidativo e mutagênico. 2018. 104 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia da Escola de Engenharia de São Carlos – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018.
40. ROMÃO, P. R., et al. Glutathione and the redox control system trypanothione/trypanothione reductase protection of *Leishmania* spp. Against nitrosothiol-induced cytotoxicity. *Bra Jour of Med and Biol Reser.* v. 39, p. 355-63, 2006.
41. ROTTINI, M. M. et al. *In vitro* evaluation of (–) α -bisabolol as a promising agent against *Leishmania amazonensis*. *Experimental Parasitology*, v. 148, p. 66-72, jan. 2015.
42. SAADI, E. L. et al. On the sylvatic transmission of *T. cruzi*, the parasite causing Chagas disease: a view from an agent-based model. *Ecological Modelling*, 423, 109001. doi: 10.1016/j.ecolmodel.2020.109001 url to share this paper: scihub.tw/10.1016/j.ecolmodel.2020.
43. SANEI-DEHKORDI A. et al. Anti Leishmania activity of *Lucilia sericata* and *Calliphora vicina* maggots in laboratory models. *Experimental Parasitology*: v.170, p. 59-65, 2016.
44. SILVA, E. da C. Aspectos demográficos de *Chrysomya albiceps* (W.) (Diptera: Calliphoridae): análise de sensibilidade dos fatores de mortalidade no estágio imaturo e parâmetros demográficos de adultos. 2013. 76 f. Dissertação - (Universidade Estadual Paulista) 2013. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/108746>>.
45. SILVA, F. H. G da. Novas abordagens na pesquisa de alvos terapêuticos frente à infecção por *Trypanosoma cruzi*. Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2016. Bibliografia: f. 48-60
46. SILVA, R. N. Leishmaniose visceral: Estudo da carga parasitária em cães submetidos a tratamento com Miltefosine (Hexadecilfosfolina). Dissertação (Mestre em ciência e saúde), Teresina, Universidade Federal do Piauí- UFPI, 2009.
47. SOUSA, A. C. D. S. et al. “Melissa officinalis L. Essential oil: antitumoral and antioxidant activities,” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 52, no. 9, pp. 2485–2489, 2004.
48. SOUZA, A.L de. Produtos naturais e sua eficácia contra o *Trypanosoma cruzi*: uma abordagem teórica (2014-2018). 2019. 55 f. Monografia (Graduação em Farmácia) - Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2019.
49. SOUZA, M. A. Leishmaniose Visceral Humana: do Diagnóstico ao Tratamento. *Rev. Cien. Saúde.* v. 10, n. 2, p. 61-9, 2012.
50. STEVERDING, D. A história da leishmaniose - *Vetores de Parasitas*, 10(2017) pp.1 - 10, 10.1186 / s13071-017-2028-5.
51. SUCRE, A.P. et al. Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 11(12), e0006052. doi: 10.1371/journal.pntd.0006052 .2017
52. TEH, C.H., et al. Determination of antibacterial activity and minimum inhibitory concentration of larval extract of fly via resazurin-based turbidometric assay. *BMC Microbiol* 17, 36 (2017) doi:10.1186/s12866-017-0936-3
53. TUNEZ, L.G. Estudo pré-clínico de complexos de ouro (AuI) como metalofármacos antileishmania e antitumoral. 2019. 125 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde)- Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, 2019.

54. VANAERSCHOT, M. *et al.* Treatment failure in leishmaniasis: drug-resistance or another (epi-) phenotype? Expert review of anti-infective therapy, 12(8): 937–946. 2014.
55. CAMPO, V. A. Comparative effects of histone deacetylases inhibitors and resveratrol on *Trypanosoma cruzi* replication, differentiation, infectivity and gene expression. International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance, Volume 7, Issue 1, 2017, Pages 23-33, <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2016.12.003>.
56. XU, J.; MAO, W. Overview of Research and Development for Anticancer Drugs. Journal of Cancer Therapy, v. 7, n. 10, p. 762–772, out. 2016.
57. ZELLMER, V. R. *et al.* Evolving concepts of tumor heterogeneity. Cell & Bioscience, v. 4, n. 1, p. 69, nov. 2014.
58. ZHAO, J. Cancer stem cells and chemoresistance: The smartest survives the raid. Pharmacology & therapeutics, v. 160, p. 145–58, abr. 2016.

5.2 MANUSCRITO I – BIOLOGICAL ACTIVITY, ANTITUMOR POTENTIAL AND CONSTITUENTS OF LARVAL SECRETION EXTRACTED FROM LUCILIA CUPRINA AND SARCONESIA CHLOROGASTER

BIOLOGICAL ACTIVITY, ANTITUMOR POTENTIAL AND CONSTITUENTS OF LARVAL SECRETION EXTRACTED FROM *Lucilia cuprina* AND *Sarconesia chlorogaster*

Litiéri Razia Garzon ^a, Mateus Fracasso ^b, Altevir Rossato Viana ^c, Talissa Santos ^b, Ariely Rodrigues ^b, Luciana Maria Fontanari Krause ^c, Vitoria Hagemann Cauduro ^d, Paola de Azevedo Mello ^d, Erico Marlon Moraes Flores ^d, Bruno Stefanello Vizzotto ^c, Silvia Gonzalez Monteiro ^b

^a Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria (SM), Rio Grande do Sul (RS), Brasil (BR).

^b Departamento de Microbiologia e Parasitologia, UFSM, SM, RS, BR.

^c Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular UFSM, SM, RS, BR.

^d Departamento de Química, UFSM, SM, RS, BR.

*Autor correspondente: liti_razia@msn.com

RESUMO

Os dados disponíveis sobre atividade da secreção larval e a descrição dos seus constituintes, em especial de dípteros *L. cuprina* e *S. chlorogaster* são escassos e incompletos. O tratamento de pessoas com câncer mesmo após anos de pesquisas, com uma melhora na qualidade de vida do paciente e aumento nas taxas de sobrevivência, ainda permanece com resultados insatisfatórios devido a toxicidade sistêmica, a resistência ao tratamento e a baixa seletividade dos fármacos. Desta forma, este estudo avaliou potencial citotóxico e antiproliferativo *in vitro* da secreção larval de *L. cuprina* e *S. chlorogaster*, extraída de L3 em diferentes concentrações, frente às linhagens tumorais humanas A549, A375 e HeLa. Também foi analisado efeito genotóxico através da capacidade de clivagem de DNA plasmidial e realizada a identificação dos seus constituintes por espectrometria de massa de quadrupolo-tempo de vóo. Os resultados mostram que as secreções larvais foram ativas frente as linhagens avaliadas de câncer de pulmão, melanoma e colo do útero, através dos testes MTT, ON, VN, LDH, Aderência e DCFH-DA, em diferentes concentrações, demonstrando citotoxicidade no período de 24h. No entanto, todas

as linhagens mostraram-se mais sensíveis aos tratamentos propostos para a secreção de *L. cuprina*. Também ambas secreções mostraram capacidade antiproliferativa nas diferentes concentrações avaliadas, em 72h. Além disso, foi possível comprovar que há interações das secreções com moléculas de DNA, resultando na sua degradação gradual até total, demonstrando atividade genotóxica, em 72h. A identificação dos constituintes foi realizada uma varredura por espectrometria de massa de alta resolução que detectou possíveis moléculas de ácido graxo, valina, cembranoid, um derivado de estearoil-histidina e um tripeptídeo. Considerando todos os efeitos proporcionados ou modulados pela secreção de dípteros, abordando seu potencial terapêutico, baixo custo e fácil manejo em laboratório, os resultados sugerem ser uma alternativa promissora para o desenvolvimento futuro de novos tratamentos de câncer. Resultados como deste estudo podem ampliar o conhecimento sobre a atividade biológica e potencial terapêutico, justificando os efeitos frente às linhagens celulares e clivagem do DNA. Entretanto, os mecanismos envolvidos na mediação dos efeitos, bem como o desempenho destas espécies ainda não foram totalmente elucidados

Palavras-chave: Díptera; *Calliphoridae*; Toxicidade; Clivagem de DNA; HRMS.

ABSTRACT

The available data on the activity of larval secretion of dipterans, especially *L. cuprina* and *S. chlorogaster*, are scarce and incomplete; the description of their constituents also remains unclear. As in cancer, which after years of research, even with an improvement in the patient's quality of life and an increase in survival rates, systemic toxicity, resistance to treatment and low selectivity also lead to unsatisfactory results. Results such as this work can expand the knowledge about the biological activity and therapeutic potential, justifying the effects on cell lines and DNA cleavage. However, the mechanisms involved in the mediation of these effects, as well as the performance of these species have not yet been fully elucidated. Thus, this study evaluated the cytotoxic and antiproliferative potential of the in vitro larval secretion of *L. cuprina* and *S. chlorogaster*, extracted from L3 at different concentrations for a period of 24h and 72h, consequently, against human tumor lines A549, A375 and HeLa. The genotoxic effect was also analyzed through the cleavage capacity of plasmid DNA and the components were identified by quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. The results show that the larval secretions were active against the evaluated strains of lung cancer, melanoma and cervix, through the MTT, ON, VN, LDH, Adherence and DCFH-DA tests. They were active at different concentrations, demonstrating cytotoxicity, however, all strains were more sensitive to the proposed treatments for *L. cuprina* secretion. Both secretions also showed antiproliferative capacity at the different concentrations evaluated. In addition, it was possible to prove that there are interactions of secretions with DNA molecules, resulting in their gradual to total degradation, demonstrating genotoxic activity. In order to identify the constituents, a high resolution mass spectrometry scan was performed, which showed classes of molecules as possible compounds: a fatty acid, valine, cembranoid, a estearoil-histidine derivative, a tripeptide. Considering all the effects provided or modulated by the secretion of Diptera, addressing its therapeutic potential, low cost and easy handling in the laboratory, the results suggest a promising alternative for the future development of new cancer treatments.

Keywords: Diptera; *Calliphoridae*; Toxicity; DNA cleavage; HRMS.

1. INTRODUCTION

Calliphoridae family is composed by a heterogeneous and cosmopolitan group of flies and that are in direct contact with humans and animals. Popularly known as blowflies, these flies exert an important role in the nature due to its participation on food chain and biomass decomposition, acting like mechanical carries of various pathogens (MONTEIRO, 2017; MOSCARELLI *et al.*, 2014; NASSER *et al.*, 2021).

The dipteran from *Lucilia cuprina* and *Sarconesia chlorogaster* species are characterized by ability to reproduce into decaying matter, presenting ecological, veterinary, medical and forensic importance (MARTINS, 2013; PORTO, 2016; FLISSAK, 2017, COSSETIN *et al.*, 2018). Several studies verified that production on enzymes secreted by the larvae are responsible by establishment and survival of this parasite in the hosts (ARRIVILLAGA *et al.*, 2008; AL-SAEED; MAHMOOD, 2012; TEH *et al.*, 2013; SILVA, 2013).

Larvae stages have been employed in the medicine for treatment of injured human and animal tissues, a process known as larvae therapy or biotherapy. This occurs because the larvae selectively clean the necrotic tissue of lesion, stimulating the production of granulation tissue and consequently the wound healing (WIEDEMANN, 1819; ECHEVERRI, *et al.*, 2010; CRUZ-SAAVEDRAA *et al.*, 2016; PINHEIRO, 2020). Study conducted by GARZON *et al.* (2021) revealed that *L. cuprina* larval secretion possess *in vitro* cytotoxic activity against tumor cells. This larval secretion presents low toxicity against physiological cells (non-tumor cells), and is important to emphasize that is a natural treatment with low cost of production and easy maintenance (BRENZAN *et al.*, 2012; MEDINA *et al.*, 2012; TUNEZ, 2015; SANEI-DEHKORDI *et al.*, 2016; GARZON *et al.*, 2021).

Due to its possibility to contribute as a new treatment source against many diseases, exist an interest in the investigation of larval secretion in different biological systems (GARZON *et al.*, 2021; DILLMANN *et al.*, 2022). In this sense, research has identified a vast number of molecular signaling pathways linked to an aggressive tumor phenotype (proliferation, invasive growth, angiogenesis and metastasis), as well as adaptive metabolic changes, genomic instability, and drug resistance (CRAWFORD 2014; BRAY *et al.*, 2018; HANAHAN; WEINGERG 2021).

Usual treatments for neoplasia, like chemotherapy and radiation, shown many adverse effects and high costs, as well as refractoriness. Due its reasons, the search for preventive and/or adjuvant therapies is highly encouraged (KRAAG *et al.*, 2012; INCA, 2018; STOLL *et al.*, 2018; TACKETT, 2019 BRUCKMANN *et al.*, 2021). Thus, the aim of this study was to

investigate the possible cytotoxic effect of larval secretion of *L. cuprina* and *S. chlorogaster* against tumor lines A459, A375 and HeLa *in vitro*, as well as the potential genotoxic effect through DNA cleavage and identification of its constituents by HRMS in order to understand its mechanism action for a possible use in human and animal health.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Laboratory colony maintenance

The flies were maintained in entomological cages ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) under a light/dark cycle. The adult flies were fed with honey and water *ad libitum*, and for oviposition was available beef liver. The larvae were maintained in ventilated cages for evolution of larval stages from L1, L2 to L3. Finally, the L3 larvae were placed in a cage containing sand for evolution to pupa stage and posteriorly hatch to adult flies (COSSETIN *et al.*, 2018; GARZON *et al.*, 2021).

2.2 Extraction of larval secretion

For secretion collection, asepsis of L3 larvae were performed through quick wash in running water, sodium hypochlorite (0.5 % by 5 min) and rinse with sterile distilled water. One hundred L3 larvae were incubated with 750 μl of phosphate buffer saline (PBS) for 5 h at room temperature and protected from light. After, the larvae were removed from the solution and the material was centrifuged at $1300 \times g$ during 7 min. Posteriorly, the material was filtrated (0.22 μm), and the filtrated liquid was transferred to sterile microtubes (CRUZ-SAAVEDRA *et al.*, 2016; SANEI-DEHKORDI *et al.*, 2016; GARZON *et al.*, 2021).

2.3 Cell culture

The A375, A549 e HeLa cell lineages used in this study belong to *Laboratório de Biociências da Universidade Franciscana* (UFN) and were acquired from *Banco de células do Rio de Janeiro* (BCRJ, Rio de Janeiro, Brazil). All cell lineages were cultured using *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) supplied with fetal bovine serum and antibiotics (penicillin and streptomycin), and maintained in a 5 % CO_2 /95% air atmosphere at 37°C , seeded in 96-well plates (1.10^4 cells per well, in triplicate) 24 h before the application of the samples. After 24 h, the medium was retired and a new medium containing *L. cuprina* e *S. chlorogaster* larval secretion were added at concentrations of 0,1%, 0,25%, 0,5%, 1%, 2%, 5% e 10%, being incubated under the same conditions cited above to perform the following measurements: 3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5- diphenyl tetrazolium bromide (MTT), neutral red (NR), Lactate Dehydrogenase (LDH), adhesion assay, nitric oxide (NO),

), 2,7'-diclorofluoresceín (DCFH-DA) and antiproliferative assay. For the cleavage assay, concentrations within the range of lower and higher concentration were selected.

2.3.1 Neutral red (NR) assay

To perform the NR colorimetric assay, after 24 h of incubation, the supernatant was retired and was added the dye at concentration of 0.04 µg/mL during 3 h. Posteriorly, the cells were washed to remove the excess of dye and a solution containing 1 % of acetic acid, 50 % ethanol and 49 % water was added for disruption of cellular structures. The reading was performed in a spectrophotometer using a wavelength of 540 nm (VIANA et al., 2021).

2.3.2 Nitric oxide (NO)

Nitrite levels were determined using Griess method. Initially, 100 µL of supernatant (cells containing different concentrations of larval secretion) were incubated with 100 µL of Griess reagent and the absorbance was measured at 540 nm. Total nitrite levels were determined in percentage in relation to the negative control (culture medium + cells) (GRIESS, 1864; VIANA et al., 2022).

2.3.3 MTT assay

This colorimetric assay was performed after 24 h of incubation, where 20 µL of a sterile solution of MTT was added in each well (5 mg/mL) being incubated for more 4 h. Posteriorly, the supernatant was removed and cells were suspended in 200 µL de DMSO. Cell growth inhibition was detected by measuring absorbance at 570 nm (VIANA et al., 2022).

2.3.4 LDH activity

The colorimetric assay was conducted according to the manufacturer recommendations of "CytoTox 96[®] Non-Radioactive Cytotoxicity Assay" (Promega). After 24 h of treatment, 100 µL of the supernatant (cells containing different concentrations of larval secretions) was collected and transferred to another 96-well plate containing the reagent. After half an hour incubation at room temperature and protected from light, the reading was performed at wavelength of 492 nm (BRUCKMANN et al., 2021).

2.3.5 Adhesion assay

The cells were incubated in 48- well plates during 2 h with the treatment in the CO₂ incubator. The supernatant was discarded to remove death cells and the culture medium

containing larval secretion. Finally, the adhered cells were fixed with 4 % paraformaldehyde for 10 minutes and stained with 0.5% crystal violet (diluted in methanol). For release of adhered dye, acetic acid was used during 5 min. The reading was performed at 570 nm (CAPPELLARI *et al.*, 2012).

2.3.6 DCFH-DA assay

The DCFH-DA assay was conducted following the protocol determined by Esposti (2002). After incubation period, the supernatants of treatments were transferred for black plaques containing 50 μ L of cell suspension, 65 μ L of Tris HCl 10 mmol/L and 10 μ L DCFH-DA 10 μ M, that was maintained for 30 min at 37 °C with 5 % CO₂. After this period, the fluorescence was measured spectrophotometrically and the results were expressed through fluorescence of treatments in relation to the control (cells without treatments) (FRANCO *et al.*, 2022).

2.3.7 Antiproliferative assay

For quantification of *PicoGreen* DNA, the cells were trypsinized with 400 μ L trypsin (0.25 %) at 37 °C during 10 min and were posteriorly pelletized by centrifugation (200 x g; 10 min). The pellets were lysed through freeze-thaw cycles in 1 mL DNA-free deionized water frozen at -80°C overnight. The samples were incubated with 1 ml of *PicoGreen* work solution (Invitrogen), dilution 1:200, by 5 min at environment temperature and protected from light. The fluorescence of samples was measured in 12-well plates using wavelengths of 485 nm (excitation) and 535 nm (emission) (KEE *et al.*, 2005). The fluorescence of the negative control was considered 100% and was compared to the other treatments.

2.4 Cleavage of plasmid DNA

The ability to cleave DNA was evaluated from conversion of plasmid supercoiled (FI) form into relaxed open circular form (FII). For this study, 300 ng of pCMUT (1762 pb; diluted in Tris-HCl 10 Mm, pH 7) was used as sample to evaluate genotoxicity. Different concentrations (0,1%; 1%; 5% e 10%) of larval secretion from *L. cuprina* e *S. chlorogaster* were used in this test. The negative control was composed only by DNA mixed with buffer. The time of exposure of the test was 1 h in order to quantify the simple ribbon breaks (SRB). The reactions were executed after addition of 2 μ L of carrier solution (50 mM Tris-HCl pH 7.5; 0.01 % bromophenol blue; 50 % glycerol; EDTA 250 mM) and posteriorly submission to

migration of 0.8% agarose gel electrophoresis containing gel red at 100v for 3h in 0.5x TBE buffer (44.5 mM Tris pH 8.0, 44.5 mM boric acid and 1 mM EDTA) (VIZZOTTO et al., 2020).

2.5 Screening of chemical compounds present in larval secretion by mass spectrometry (HRMS-ESI-ToF-MS)

The extracts of *L. cuprina* e *S. chlorogaster* were characterized via high resolution electrospray positive-mode electrospray time-of-flight mass spectrometry screening analysis in UHPLC (*Ultrahigh performance liquid chromatography*, ESI-ToF-MS, model Xevo G2 Qtof, Waters Inc., Milford, EUA). The extracts were diluted in 1.5 ml of a mixture 1:1 (v/v) acetonitrile and ultrapure water containing formic acid. The spectra were measured (range of 50-1000 Da) by direct infusion of the extracts at a sample injection rate, being applied the following conditions: capillary voltage of 2 kV; extraction cone voltage of 40 kV; sampling cone gas flow rate of 10Lh-1(N₂), and dissolution gas flow rate of 500 Lh-1(N₂). The software MassLynx V4.1 was used to control de operations in the equipment. The possible molecular formula was determined based on the reference data of mass spectra, and possible structures were assigned based on combinations in the Reaxys™ database (Elsevier Life Sciences IP Limited, 2021, available at: <https://www.reaxys.com/>). It is important to emphasize that, due to the concentration of PBS in the samples, a dilution factor of less than 20 x was not possible, since matrix effects were observed. Thus, it was not possible to obtain sufficiently high intensities for the fractionation of mass fragments in MS/MS mode.

3. STATISTICAL ANALYSIS

All assays were conducted in triplicate and analyzed using the software *GraphPad Prism* version 5. In the experiments involving cleavage of plasmid DNA, the quantification of DNA bands was conducted using the software *ImageJ*. The data were evaluated using one-way or two-way analysis of variance (ANOVA) following the *Tukey post hoc* test considering statistically significant values with $P < 0.05^*$, $P < 0.01^{**}$ and $P < 0.001^{***}$.

4. RESULTS

The data obtained in the cytotoxic activity against A549 cell lineage at concentrations of 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 and 10% from *L. cuprina* larval secretion in different methods were presenter in the **Figure 1**. The treatments presented significant difference at concentrations of 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 and 10% of larval secretion, being efficient to reduce the cell viability through RN assay to 87, 85.6, 83.6, 84 and 83% respectively, when compared to

control (Figure 1A). The larval secretion at concentration of 5.0 % caused an elevation on NO levels (108.3%) compared to control (Figure 1B). The MTT colorimetric assay of *L. cuprina* larval secretion demonstrated toxicity for tumor cell after 24h exposure at concentrations of 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 and 10% via reduction of cell viability to 86.6 72.6, 74.6, 78, 89 and 90.3% compared to control (Figure 1C). Regarding LDH activity, the concentration of 1.0 % presented an increase on LDH activity (108 %) compared to control (Figure 1D). In the evaluation of cellular adhesion (Figure 1E), the secretion at concentration of at 10% presented a significant reduction on adhesion (89.6 %) compared to control. The production of reactive oxygen species was significant major at concentrations of 2.0, 5.0 and 10% compared to control group, increasing 18.3, 13.6 and 20.3%, respectively (Figure 1F).

Figure 1:

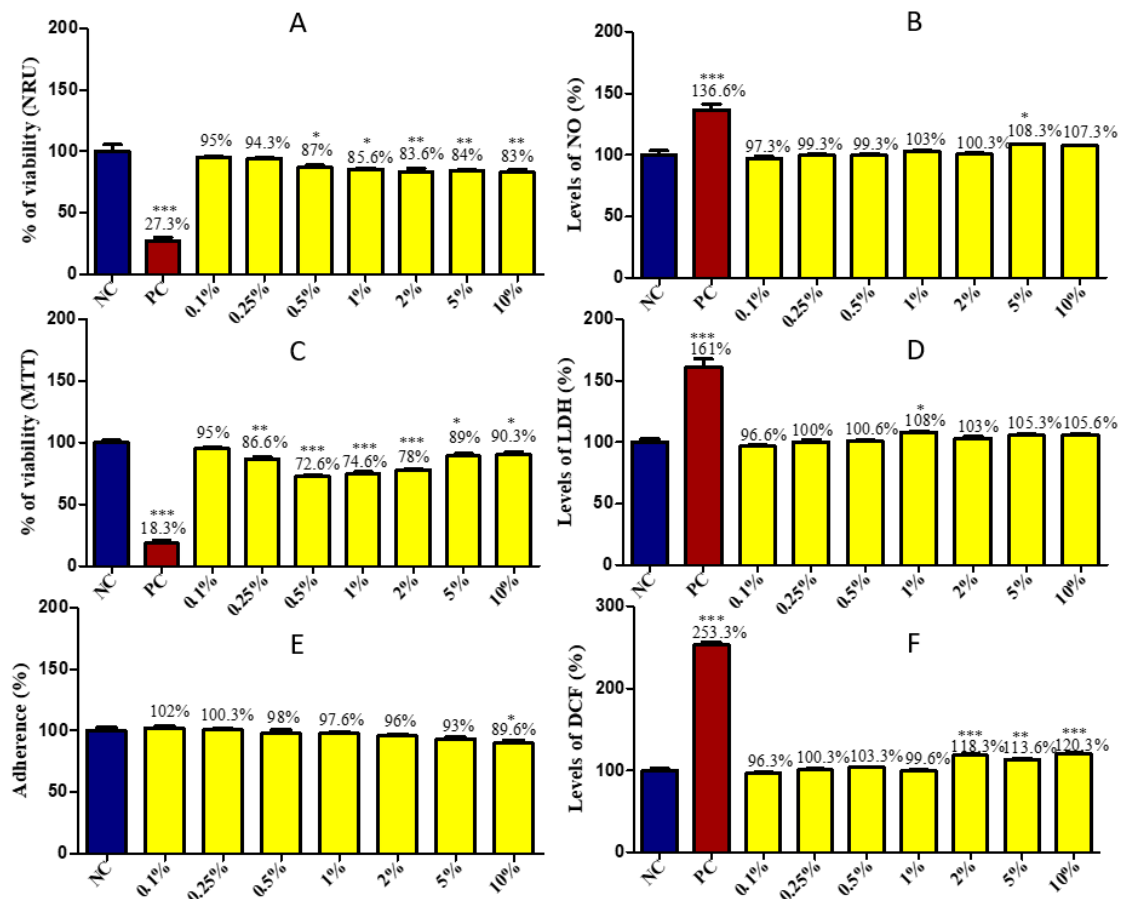


Figure 1. Cell line A549 exposed to different concentrations of *Lucilia cuprina* larval secretion (0.1%, 0.25%, 0.5%, 1%, 2%, 5% and 10%) at incubation 24 hours. The different assays A: Neutral Red; B: Nitric Oxide; C: MTT; D: Lactate dehydrogenase; E: Adherence and F: Dichlorofluorescein. Results expressed as a percentage in relation to the negative control * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

The data obtained in the cytotoxic activity against A375 cell line at concentrations of 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 and 10% from *L. cuprina* are presented in the Figure 2, and the results expressed in viability compared to control.

The Figure 2A revealed a significant difference in almost all evaluated concentrations (0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 and 10%) being efficient in to reduce the cell viability by NR assay to 83.3, 79.3, 69.3, 66, 44.3 and 56.6%, respectively, compared to control group. In the Figure 2B, the secretion caused an increase on NO levels at concentrations of 0.25, 0.5 and 1.0% (106.3%, 107.6% and 707.3%) compared to control group. The MTT assay revealed cytotoxicity at concentrations of 0.1, 0.25, 0.5, 2.0 and 5.0 and 10% after 24 h exposure through reduction on cell viability to 88.6, 89, 86.6, 68.3, 61.3 and 44.6%, respectively, compared to control (Figure 2C).

Using the LDH assay, the *L. cuprina* larval secretion at concentrations of 0.5, 1.0, 5.0 and 10% caused damage to tumor cell membranes confirmed by elevations on LDH levels for 103.6, 105, 107 and 108% (Figure 2D). Regarding adhesion test, the major concentration (10%) caused a significant decrease on viability (reduction in 85.3%) compared to control (Figure 2E). Moreover, was observed a significant increase at 10.6, 16.5, 17% and 10.3%, respectively, in the production of reactive species at concentrations of 0.1, 0.25, 0.5 and 1.0% (Figure 2F).

Figure 2:

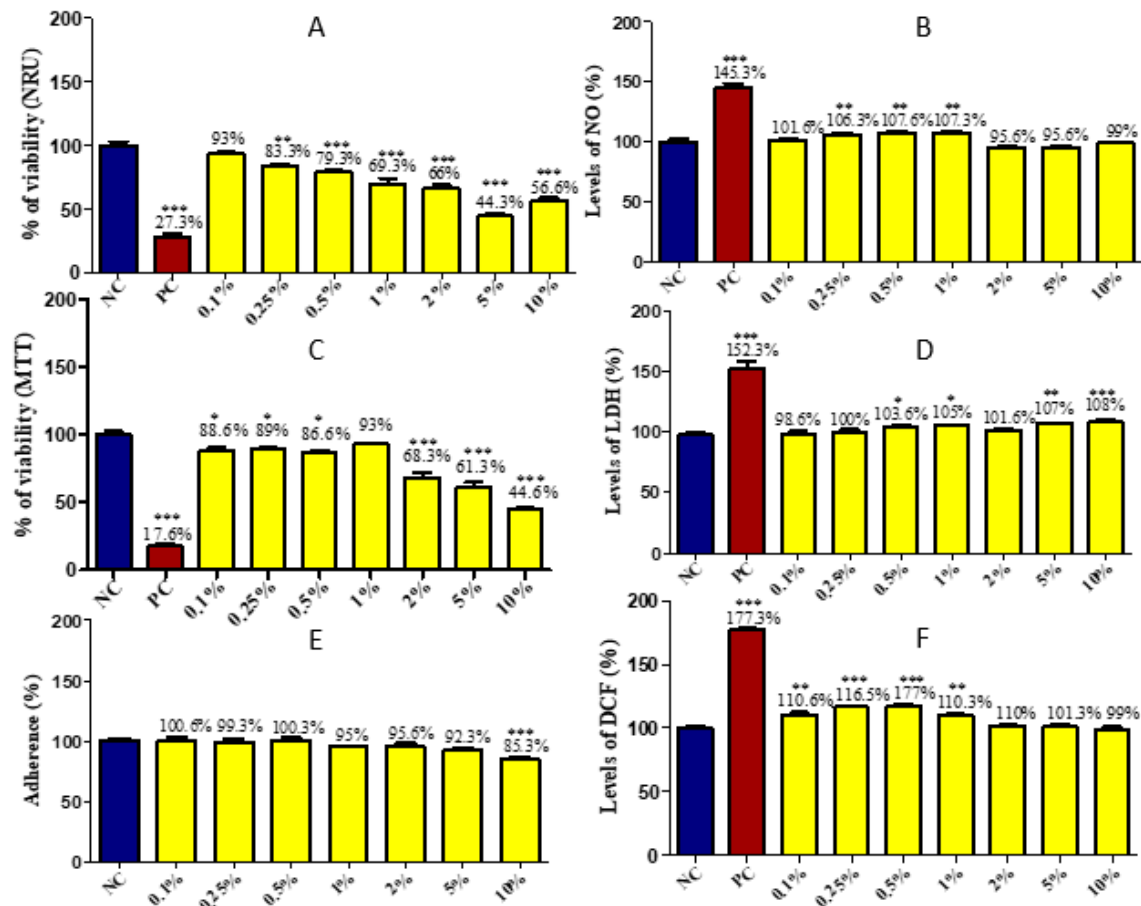


Figure 2. Cell line A375 exposed to different concentrations of *Lucilia cuprina* larval secretion (0.1%, 0.25%, 0.5%, 1%, 2%, 5% and 10%) at incubation 24 hours. The different assays A: Neutral Red; B: Nitric Oxide; C: MTT; D: Lactate dehydrogenase; E: Adherence and F: Dichlorofluorescein. Results expressed as a percentage in relation to the negative control (cells + culture medium) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

The data obtained in the cytotoxic activity against HeLa cell line at concentrations of 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 and 10% from *L. cuprina* are presented in the Figure 3, and the results expressed in viability compared to control.

The treatments presented significant difference in almost all evaluated concentrations, where the concentrations of 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 and 10% reduced cell viability through NR assay to 87, 75, 64.6, 57.6, 44 and 23.3%, respectively, compared to control group (Figure 3A). The larval secretion promoted an increase on NO levels in 8.3% and 10%, respectively, at concentrations of 1.0% e 2.0% compared to control group (Figure 3B). The MTT assay revealed a reduction on cell viability to 93, 63.3, 55, 55, 48.3, 36.6 and 21.3%, respectively (Figure 3C). Larval secretion was also evaluated for cytotoxicity by colorimetric quantification of LDH, as shown in Figure 3D. *Lucilia cuprina* larval secretion against HeLa tumor cell at concentration of 10% caused damage to tumor cells due to elevated levels of LDH (110.3%). The concentrations of 1.0, 2.0, 5.0 and 10% reduced cell adhesion to 84.3, 85, 83 and 76,

respectively. In the cell adhesion test, the concentrations of 1.0, 2.0, 5.0 and 10% reduced cell viability to 84.3, 85, 83 and 76% (Figure 3E). No significant difference was observed between groups regarding DCFH-DA levels (Figure 3F).

Figure 3

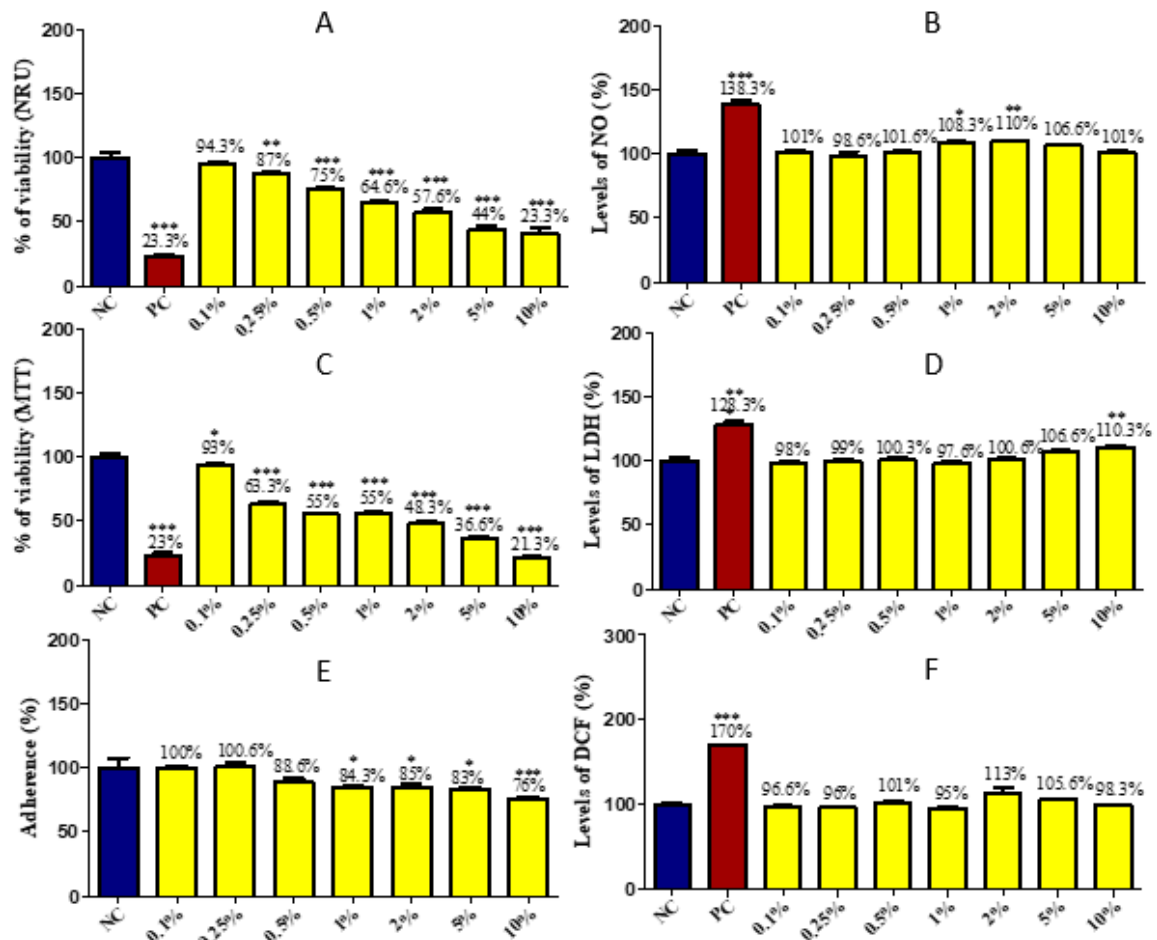


Figure 3. Cell line HeLa exposed to different concentrations of *Lucilia cuprina* larval secretion (0.1%, 0.25%, 0.5%, 1%, 2%, 5% and 10%) at incubation 24 hours. The different assays A: Neutral Red; B: Nitric Oxide; C: MTT; D: Lactate dehydrogenase; E: Adherence and F: Dichlorofluorescein. Results expressed as a percentage in relation to the negative control (cells + culture medium) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

The data obtained in the cytotoxic activity against A549 cell line at concentrations of 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 and 10% from *S. chlorogaster* are presented in the Figure 4, and the results expressed in viability compared to control.

The concentrations of 5.0 % and 10% reduced to 68% and 55%, respectively, the cell viability using the NR assay (Figure 4A). No significant difference was observed between groups regarding NO levels (Figure 4B). The MTT assay revealed toxicity at concentrations of 2.0, 5.0 and 10%, where these concentrations reduced viability to 88.6, 81.6 and 73.6% after 24 h exposure, as exposed in the Figure 4C. No significant difference was observed regarding

LDH assay (Figure 4D). Regarding cell adhesion, larval secretion at concentrations of 2.0 and 10% reduced cell viability to 86.6% and 8.3%, respectively (Figure 4E). The DCFH-DA assay revealed an increase on production of reactive species at concentration of 2.0, 5.0 and 10% compared to control group (increase in 12%, 20% and 32% of reactive species production) (Figure 4F).

Figure 4:

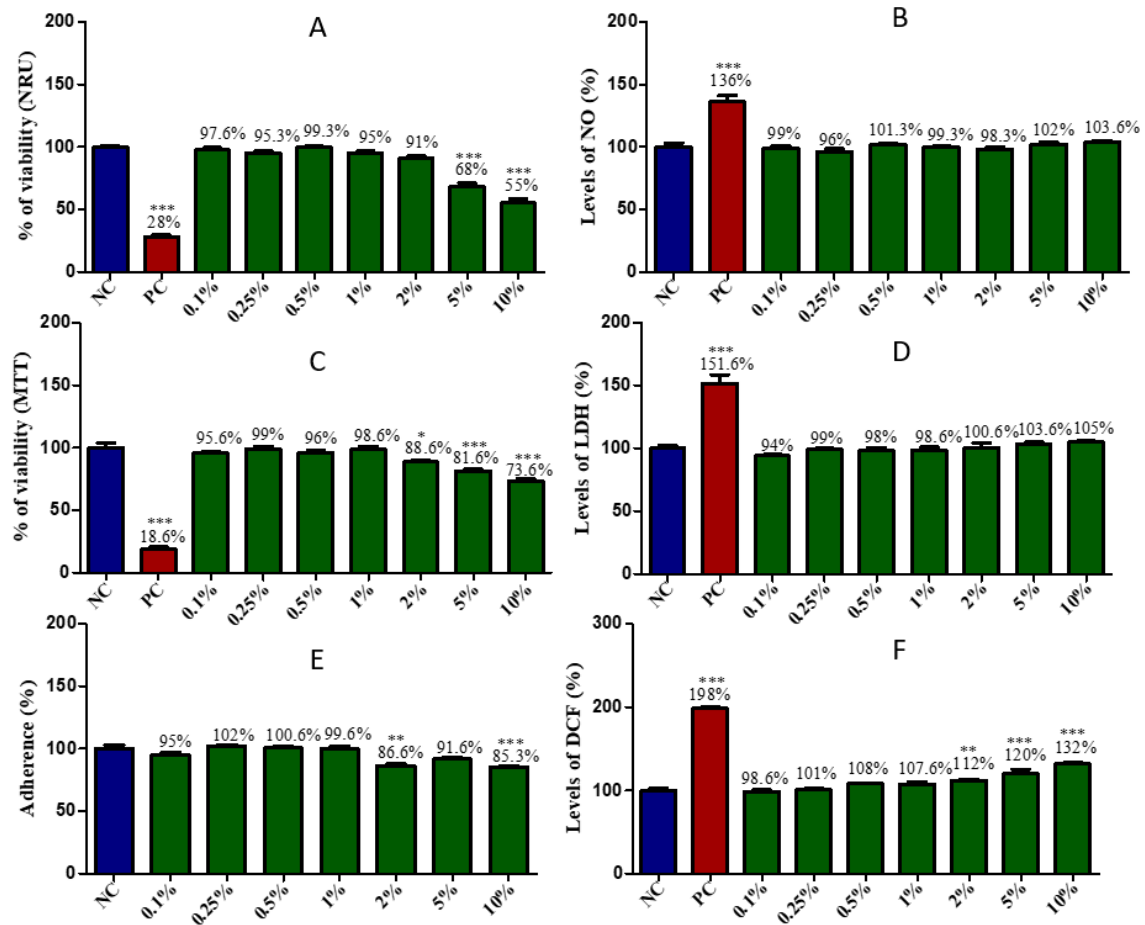


Figure 4. Cell line A549 exposed to different concentrations of *Sarconesia chlorogaster* larval secretion (0.1%, 0.25%, 0.5%, 1%, 2%, 5% and 10%) at incubation 24 hours. The different assays A: Neutral Red; B: Nitric Oxide; C: MTT; D: Lactate dehydrogenase; E: Adherence and F: Dichlorofluorescein. Results expressed as a percentage in relation to the negative control (cells + culture medium) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

The data obtained in the cytotoxic activity against A375 cell line at concentrations of 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 and 10% from *S. chlorogaster* are presented in the Figure 5, and the results expressed in viability compared to control.

The concentrations of 5.0 % and 10% reduced to 88.5% and 83.5%, respectively, the cell viability using the NR assay (Figure 5A) compared to control group. No significant

difference was observed regarding NO levels (Figure 5B). The MTT assay revealed toxicity at concentrations of 2.0, 5.0 and 10%, where these concentrations reduced viability to 86, 79.3 and 64% after 24 h exposure, as exposed in the Figure 5C. No significant difference was observed regarding LDH and cell adhesion tests (Figure 5D and 5E). The DCFH-DA fluorometric assay increased in 16 % the reactive species at concentration of 10% compared to control (Figure 5F).

Figure 5:

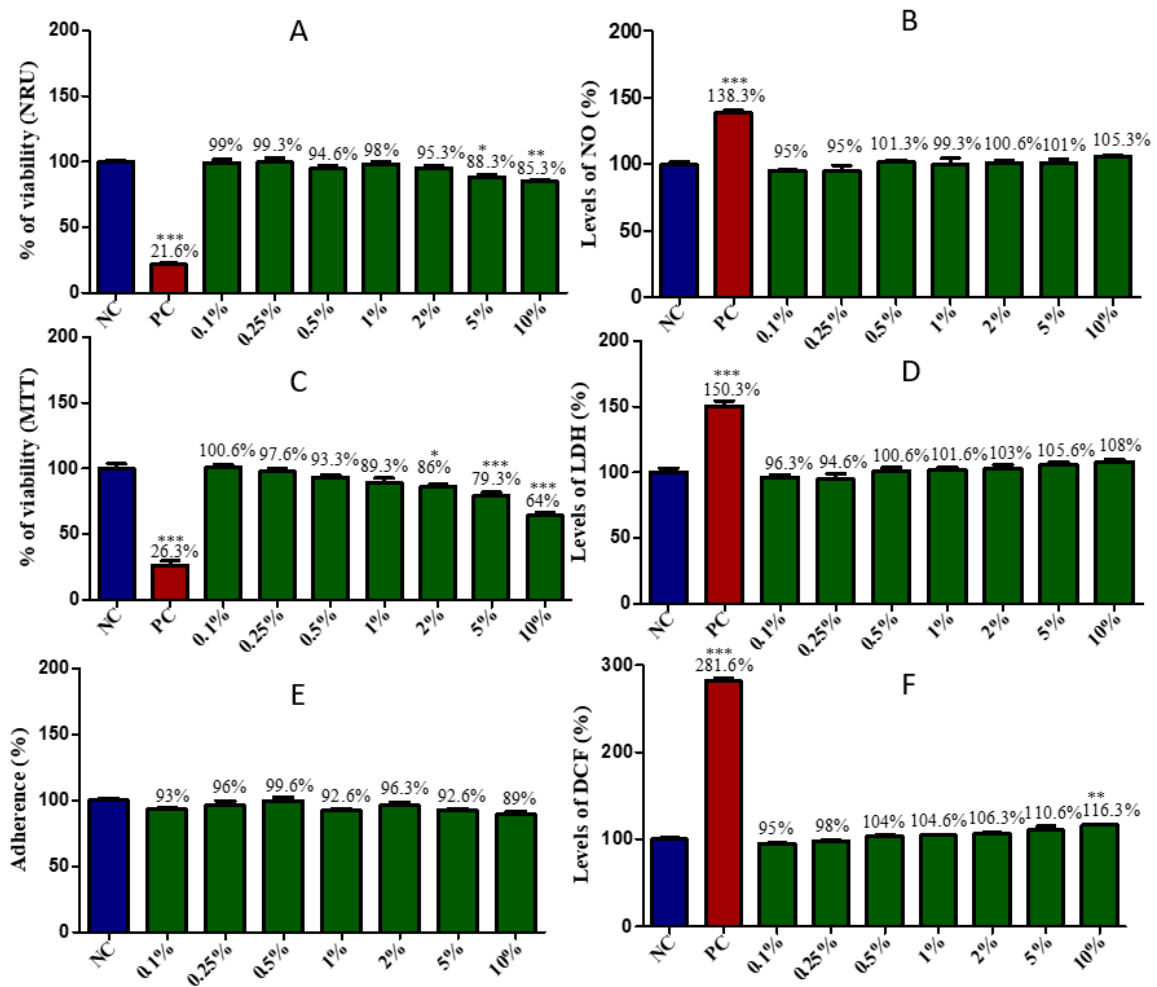


Figure 5. Cell line A375 exposed to different concentrations of *Sarconesia chlorogaster* larval secretion (0.1%, 0.25%, 0.5%, 1%, 2%, 5% and 10%) at incubation 24 hours. The different assays A: Neutral Red; B: Nitric Oxide; C: MTT; D: Lactate dehydrogenase; E: Adherence and F: Dichlorofluorescein. Results expressed as a percentage in relation to the negative control (cells + culture medium) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

The data obtained in the cytotoxic activity against HeLa cell line at concentrations of 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 and 10% from *S. chlorogaster* are presented in the Figure 6, and the results expressed in viability compared to control.

The concentrations of 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 and 10% reduced to 90, 88.6, 86.3, 85, 81 and 71.6%, respectively, the cell viability using the NR assay (Figure 6A) compared to control group. No significant difference was observed regarding NO levels (Figure 6B). The MTT assay revealed toxicity at concentrations of 1.0, 2.0, 5.0 and 10%, where these concentrations reduced viability to 69.3, 67.3, 57.6% and 50.6% after 24 h exposure, as exposed in the Figure 6C. No significant difference was observed regarding LDH and cell adhesion tests (Figure 6D and 6E). The DCFH-DA fluorometric assay increased in 120.61 % and 117.6% the reactive species at concentrations of 5.0% 10% compared to control (Figure 6F).

Figure 6:

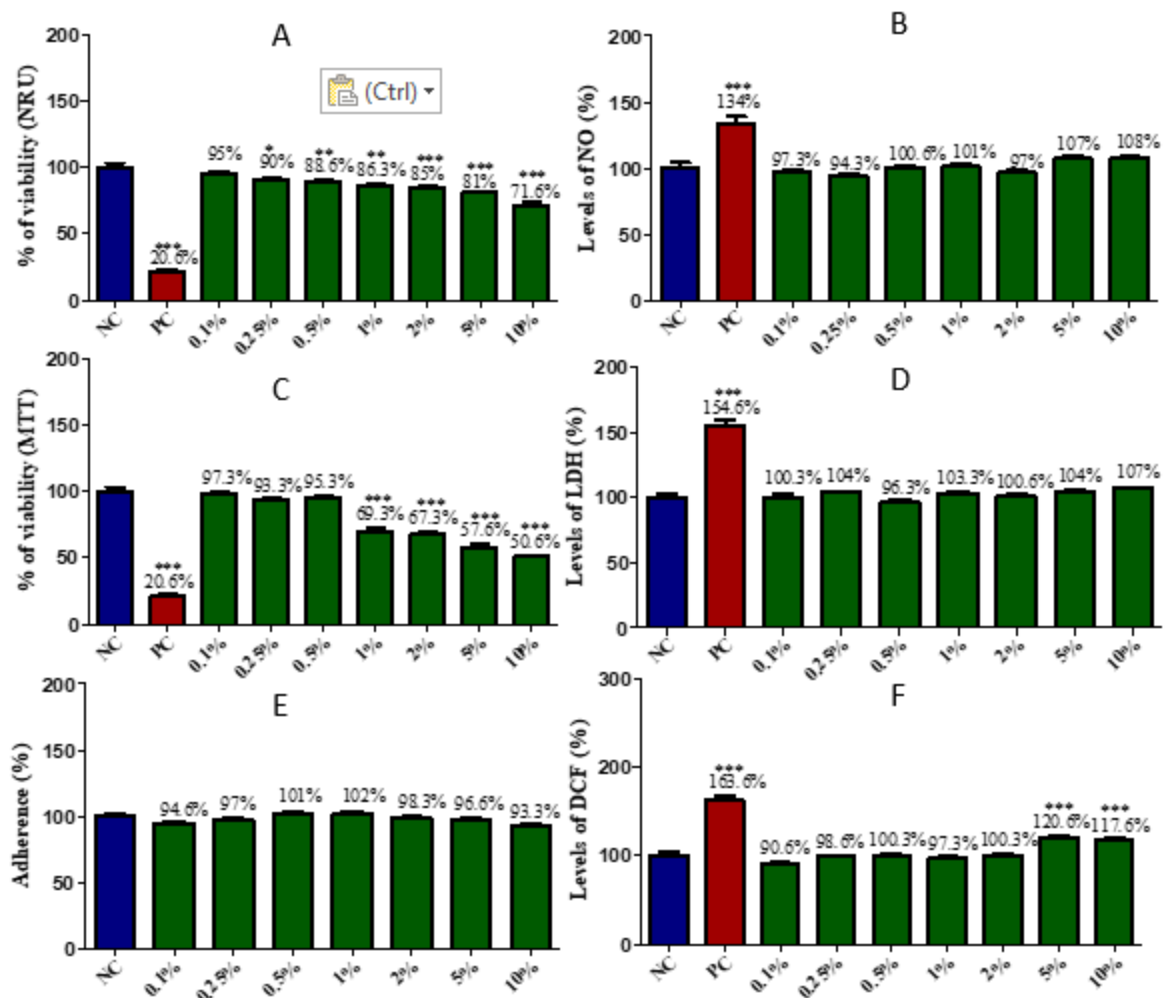


Figure 6. Cell line HeLa exposed to different concentrations of *Sarconesia chlorogaster* larval secretion (0.1%, 0.25%, 0.5%, 1%, 2%, 5% and 10%) at incubation 24 hours. The different assays A: Neutral Red; B: Nitric Oxide; C: MTT; D: Lactate dehydrogenase; E: Adherence and F: Dichlorofluorescein. Results expressed as a percentage in relation to the negative control (cells + culture medium) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

The data obtained in the evaluation of antiproliferative activity against A549 (Figure 7A), A375 (Figure 7B) and HeLa (Figure 7C) cell lines at concentrations of 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 and 10% of *L. cuprina* and *S. chlorogaster* larval secretions, in the period of 72h, are represented in Figure 7.

Figure 7:

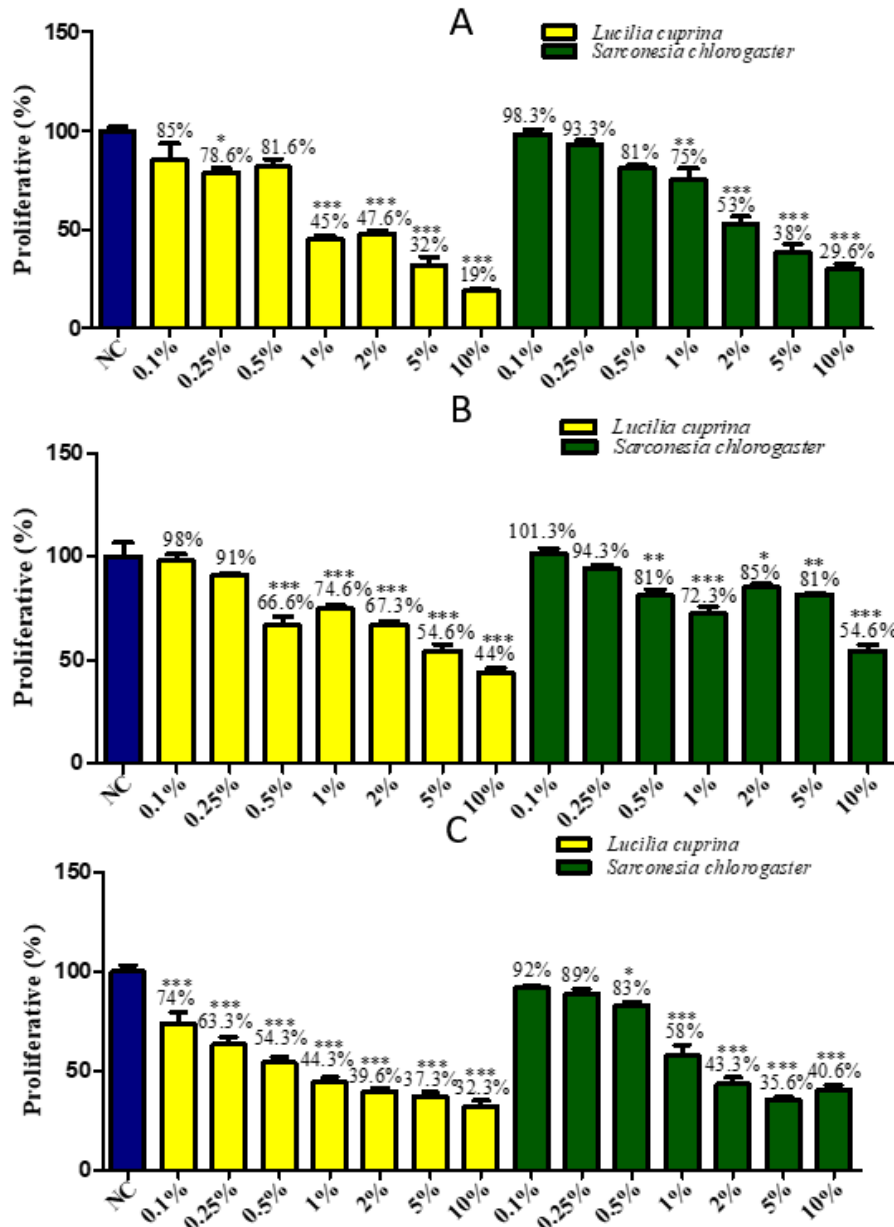


Figure 7. Cell lines A. A549, B. A375 and C. HeLa exposed to different concentrations of *Lucilia cuprina* and *Sarconesia chlorogaster* larval secretion (0.1%, 0.25%, 0.5%, 1%, 2%, 5% and 10%) at incubation 72 hours. Results expressed as a percentage in relation to the negative control (cells + culture medium) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

The results obtained showed that the *L. cuprina* and *S. chlorogaster* larval secretions reduced the number of cells in all evaluated strains and in practically all concentrations (Figure 7A, B and C). The antiproliferative effect was observed and persisted by 72h after treatment withdraw. Moreover, *S. chlorogaster* larval secretion reduced the cell viability at concentrations of 0.1% and 0.25 % against all cell lines, and in the concentrations of 0.5 % for HeLa and 5.0 % for A375 cells lines. *Lucilia cuprina* was effective in all concentrations against HeLa cells, but not exerted significant effects in the concentrations of 0.1 % and 0.25 % for A375 cell line, as well as at concentrations of 0.1% and 0.5% against A549 cell line. The reduction in the cell number of the lines, regardless of their value, characterizes the induction of a cytotoxic effect. Therefore, when analyzed together with the other tests, the results obtained show that the larval secretions were able to induce potent cytotoxic activity.

Figure 8 shows the data obtained in the plasmid DNA genotoxicity test at concentrations of 0.1%, 1.0 %, 5.0% and 10% of *L. cuprina* and *S. chlorogaster* larval secretions.

Figure 8:

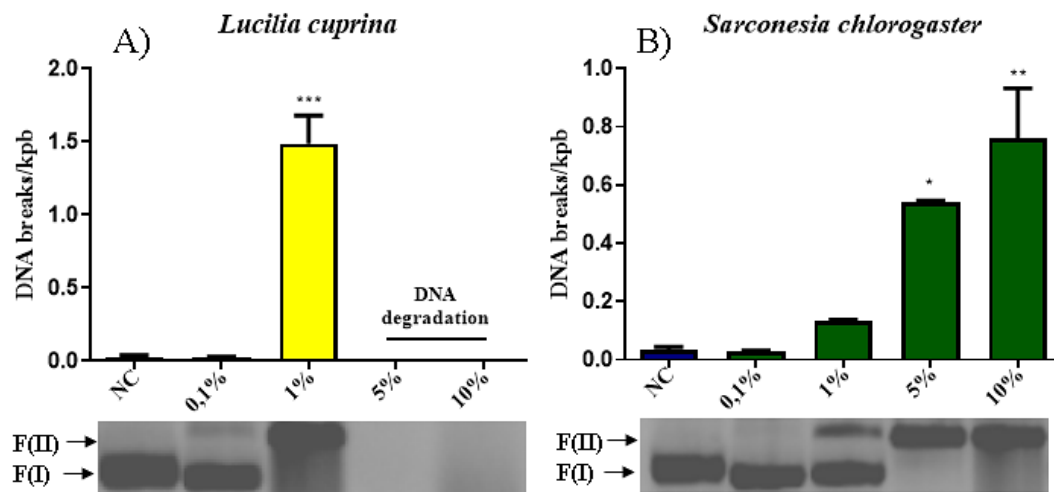


Figure 8. Plasmid DNA exposed to different concentrations of *Lucilia cuprina* and *Sarconesia chlorogaster* larval secretion (0.1%, 0.25%, 0.5%, 1%, 2%, 5% and 10%) at incubation 72 hours. Results expressed as a breaks /kpb to the negative control (DNA + Tris-HCl) *p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001.

Under the predetermined conditions, both secretions were capable to cleave the plasmid DNA. *Lucilia cuprina* larval secretion was effective at concentrations of 1.0%, 5.0% and 10%, completely degrading DNA. The secretion of *S. chlorogaster* also caused damage at concentrations of 5% and 10%. Furthermore, as the concentration increased, the DNA cleavage increased (Figure 8A and 8B).

Figure 9 shows the results obtained in the mass spectrum of the *L. cuprina* larval secretion sample using high resolution mass spectrometry (HRMS).

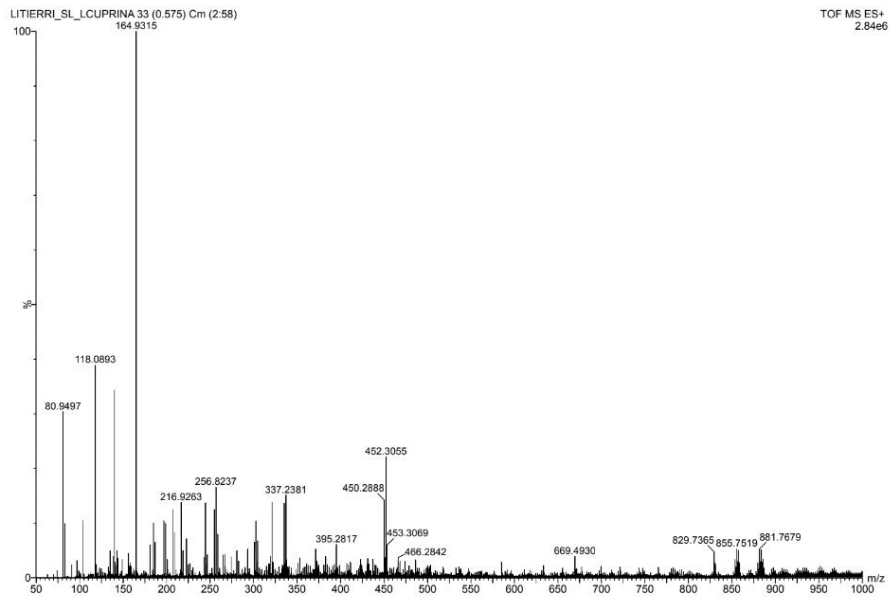


Figure 9. Results expressed for mass spectrum of larval secretion of the dipteran *Lucilia cuprina* obtained by mass spectrometry – HRMS.

Figure 10: Mass spectrum obtained in the triage of *Sarconesia chlorogaster* using high resolution mass spectrometry (HRMS).

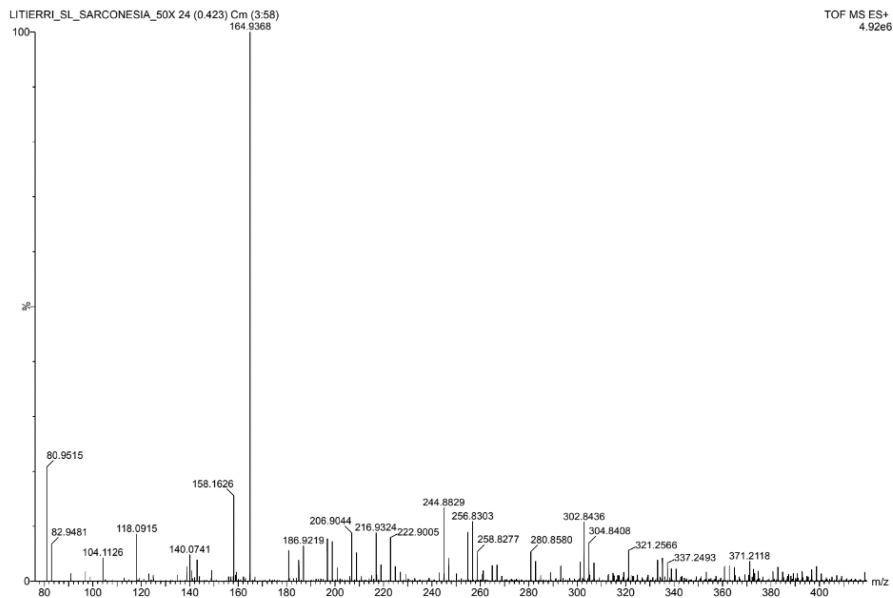


Figure 10. Results expressed for mass spectrum of larval secretion of the dipteran *Lucilia cuprina* obtained by mass spectrometry – HRMS.

Table 1: Resume of data obtained from identification of the constituents of the *Lucilia cuprina* and *Sarconesia chlorogaster* larval secretions using high resolution mass spectrometry (HRMS). Note: The mass accuracy values were approximately 5 ppm or less, which is acceptable for proposing a molecular formula when using a Q-TOF mass spectrometer.

Table 1. Identification of the chemical compounds present in *Lucilia cuprina* and *Sarconesia chlorogaster* larval secretions by ESI-ToF-MS (positive ionization mode, $[M-H]^+$).

No.	Observed m/z	Possible molecular structure	Error, ppm	Possible compound
1	140.0693	$C_5H_{11}NO_2Na$	-4.3	Valine
2	216.9263	$C_4H_6ONaP_4$	+1.8	*
3	321.2419	$C_{14}H_{34}N_4O_2P$	0.0	Possibly a fatty acid ($C_{18}H_{34}O_3$)
		$C_{20}H_{33}O_3$	+3.4	
		$C_{18}H_{34}O_3Na$	-4.0	
4	337.2381	$C_{20}H_{33}O_4$	-0.6	Possibly a cembranoid ($C_{20}H_{33}O_4$)
		$C_{17}H_{35}N_2ONaP$	+1.2	
		$C_{21}H_{29}N_4$	+3.3	
		$C_{14}H_{34}N_4O_3P$	-3.6	
5	452.3055	$C_{27}H_{44}NONaP$	+0.7	Possibly a derivative of stearoyl-histidine ($C_{24}H_{43}N_3O_3$).
		$C_{22}H_{48}NO_4P_2$	+0.9	
		$C_{23}H_{42}N_5O_2S$	+0.9	
		$C_{17}H_{43}N_5O_7Na$	+1.1	
		$C_{21}H_{45}N_5NaP_2$	-1.5	Possibly a tripeptide ($C_{18}H_{39}N_9O_3$)
		$C_{24}H_{43}N_3O_3P$	-2.9	
		$C_{23}H_{44}N_5P_2$	+3.8	
6	216.9324	$C_3H_9P_4S$	+0.5	*
7	222.9005	$C_3H_6NaP_2S_3$	0.0	*
		$C_2H_4O_3NaP_4$	+1.8	
		$CHN_2O_4NaPS_2$	+3.6	
		$C_2H_2O_5NaP_2S$	-4.0	
		$C_8HP_2S_2$	-4.5	
		$C_5H_3O_2S_4$	+4.9	
8	244.8829	$C_3H_6OP_5S$	-0.8	*
		$C_2H_3N_2O_2P_2S_3$	+1.2	
		$C_5H_2O_2NaS_4$	+2.5	
		$CHN_2O_5P_4$	+2.9	
9	302.8436	$C_4H_4N_2PS_6$	0.0	*
		$C_3H_2N_2O_3P_3S_3$	+1.3	
10	321.2566	$C_{17}H_{38}O_3P$	-2.2	*
		$C_{22}H_{34}Na$	-2.5	
		$C_{16}H_{37}N_2O_2S$	-3.1	
		$C_{24}H_{33}$	-5.0	

* No matches found in Reaxys™ database

5. DISCUSSION

In this study, we used the cell lineages A549, A375 e HeLa. The cell lineage A549 was established in 1972 by Giard et al. (1973) through an explant culture of adenocarcinoma lung tissue being widely used as a model of lung carcinoma (Viana et al., 2022). The A375 cell line is a human melanoma initiated via culture medium of explant of solid tumor (SHARMA *et al.*, 1996; BRUCKMANN *et al.*, 2022), while HeLa cell was discovered by Theodore Puck e Philip Marcus in 1953 (CAPES-DAVIS *et al.*, 2010; VIANA *et al.*, 2022). The potential on a compound or natural product with antitumor potential is preliminary evaluated through *in vitro* tests using cytotoxicity and proliferative assays, like used in this study using larval secretion of *L. cuprina* e *S. chlorogaster* against tumor cells. In the present study, we revealed that larval secretion from both species is capable to interfere in the cell adhesion process, metabolic activity and maintenance of membrane activity (SCHILLING; GESERICK; LEVERKUS, 2014).

The MTT, NR, LDH, NO, cell adhesion, DCFH-DA and antiproliferative assays were conducted to verify the interference of larval secretion against tumor cells, since reactive oxygen species in biological systems can develop oxidative stress causing irreversible damage to macromolecules, as DNA (DÍAZ-ROA *et al.*, 2016). All these tests, as well as in another *in vitro* studies, suggest the effect on lipid bilayer destabilization and membrane integrity measured through the fluorescence intensity of the dye that has the ability to penetrate in the damaged cells, as well as intercalate into nucleic acid fragments resulting in DNA cleavage (DÍAZ-ROA *et al.*, 2016; SHI *et al.*, 2016).

In the MTT assay, was observed for all cell lineages (A549, A375 e HeLa) a significant reduction on cell viability at most concentrations tested, a condition that prove the efficacy of both diptera species to cause cell death. Concomitantly, was observed release of lactate for all cell lineages and diptera species, which also confirm damage to tumor cell lines. The mechanism of toxicity of dipteran secretions is not well understood, but is can be linked to a possible damage to mitochondrial matrix due to breakdown of mitochondrial enzymes, a condition that inhibits oxidative phosphorylation and cause consequent cell death (MOSMANN 1983).

In this study, we observed an increase on reactive oxygen species and reactive nitrogen species through DCFH-DA (Figures 1F, 2F, 4F, 5F e 6F) and NO assays (Figures 1B, 2B) for both diptera species, a condition that can explain the lesions to DNA (FRANCO *et al.*, 2022) proved by LDH (Figures 1D, 2D, 3D) and plasmid DNA genotoxicity (Figures 8A, 8B) assays, reinforcing the fact that larval secretion possess antitumor activity since inhibited cell

proliferation and/or promoted death of tumor cell, as observed by several authors (FELIPE, 2010; DÍAZ-ROA *et al.*, 2016; TUNEZ *et al.*, 2019; GARZON *et al.*, 2021).

Among the methods employed to detect the cleavage of plasmid DNA, agaroses gel electrophoresis was choice due to simplicity and efficacy for separation, identification and purification of DNA fragments (AUSUBEL *et al.*, 1995), a condition that allows the observation of migration of different forms of DNA (Figure 8A, 8B). In this study was capable to verify the decrease on band referent to form I of DNA (supercoiled) and increase on form II (relaxed open circular or FII).

Second HÖRNER (2003) when a DNA strand is cleaved, the supercoil unwinds by relaxing to the open circular form, which has slower electrophoretic mobility. Whether both strand is cleaved, the liner form is generated, and this form possess intermediate electrophoretic migration, such as observed in the present study for both diptera species. Like our observations, Van der Plas *et al.* (2014) revealed that a protease secreted by *Lucilia* sp. also cleaved DNA in a concentration- and incubation-time dependent manner. Moreover, DNase activity derived from *Lucilia sericata* was initially evaluated by Sinicopri *et al.* (1994), being observed that at pH close to physiological, the DNase present in the larval secretion of *L. sericata* was responsible for the digestion of the genomic DNA extracted from *Escherichia coli* (BROWN *et al.*, 2012). The enzyme serine protease derived from *Sarconesia magellanica* also caused disappearance of bands by hydrolytic action on biological material (RÖCKL-PINILLA *et al.*, 2013).

The use of unconventional therapies to treat or prevent diseases have been considered a new alternative to conventional drugs due safety e low cost, like the therapy used in the present study. Sherman (2014) revealed the benefits of biotherapy using the same species of diptera used in our study, observing chemical (action of larval secretion in the tissues) and physical (mechanical contact of larvae with lesion) effects. Moreover, other biological compounds are employed as alternative therapy against different tumor cells and parasitic diseases, as resveratrol and curcumin (SILVA *et al.*, 018; BOTTARI *et al.*, 2020; FRACASSO *et al.*, 2021; VIANA *et al.*, 2021; FRANCO *et al.*, 2021).

The antitumor activity of *L. cuprina* and *S. chlorogaster* observed through cytotoxic (Figures 1 to 6) and antiproliferative (Figure 7) assays characterize the induction of cytotoxic effect, since we observed a drastic reduction on number of tumor cells, as well as by capacity to elicits DNA degradation (Figure 8) linked with reduced mitochondrial viability. Analyzing all these tests, the results clearly demonstrated that larval secretions were capable to induce cytotoxic activity, as observed by Bruckamnn *et al.* (2021) against A375 cell, Stoll *et al.* (2018)

against A549 cell, and by Friedrich in preliminary studies (2021) with HeLa cells with natural or derived products. Recent *in vitro* study conducted by Garzon et al. (2021) demonstrated that larval secretion possesses parasitic activity against *Leishmania sp.* e *Trypanosoma cruzi*, as well as antitumor activity against melanoma tumor cells (B16-F10) in low concentrations, as observed in the present study. The exact mechanism of action of larval secretion is poorly understood, but is related to modulation/action through proteolytic enzymes, DNAses, antimicrobial peptides, allantoin production, urea, fibroblast proliferation and migration, angiogenesis and reduction of inflammatory response by decrease on complement system (HOBSON, 1931; THOMAS *et al.*, 1999; CHAMBERS *et al.*, 2003; BEXFIELD *et al.*, 2004; BROWN *et al.*, 2012).

Recently, The et al. (2017) performed the identification of twenty organic compounds from larval secretion of *L. cuprina*, *Sarconesia peregrine* and *Musca domestica*, as well as the characterization of fatty acids, esters of aromatic acids, glycosides and phenol. In our present study, through ESI-ToF-MS spectrum scanning method, we found any chemical structures e some did not have a similar molecule recognized in the databases (like C₄H₆ONaP₄, C₃H₉P₄S e C₃H₆OP₅S), bringing the possibility of an unprecedented and/or exclusive component of the species analyzed in our study. These identified structures can be fundamental in the larvae development and, consequently, for the action against tumor cells. The larval secretion is produced according to physiological requirements and stimuli of parasite. Thus, is possible that larvae can present a large repertoire of enzymes throughout its existence in accordance to defense necessity our nutrients requirements, as well as from digesting tissue from their hosts (TAUBORET *et al.*, 2003; HOROBIN *et al.*, 2006; LOPES *et al.*, 2014). Is important to highlight that the difference on molecule identification can be related to biology of flies and larvae stage. Study conducted by Teixeira et al. (2017) identified a different protein profile for instar 1, 2 and 3, a result that suggest the presence of many molecules within the same species, as well as by the method employed to detect the constituents. However, we identified by the robust Reaxys™ database molecules that corroborate others studies, suggesting possible compounds the fatty acid (C₁₈H₃₄O₃), valine (C₅H₁₁NO₂Na), cembranoid (C₂₀H₃₃O₄), a derivate of estearoil-histidine (C₂₄H₄₃N₃O₃) and tripeptide (C₁₈H₃₉N₉O₃) (SIVAZAMY *et al.*, 2001; GIVEHCHI *et al.*, 2007; YAO *et al.*, 2009; LE-HUU *et al.*, 2018; ZHICHEN *et al.*, 2019; AL-KHSEMAWEE *et al.*, 2020; ZHICHEN *et al.*, 2021).

Inflammatory process can promote proliferation, angiogenesis, metastasis and reduce the immune response (ZAPPAVIGNA et al., 2020). Speculatively, the long chain fatty acid in question (C₁₈H₃₄O₃) show features related to polyunsaturated fatty acid with structure

empirically similar to arachidonic acid, a condition that can be related to a possible pro-inflammatory activity through release of chemical mediators. The amino acid valine (C₅H₁₁NO₂Na) is important in protein regulation and maintenance, exerting influence of immune modulation by production of inflammatory mediators DE BANDT; CYNOBER, 2006). Also, we identified the cembranoid (C₂₀H₃₃O₄), that is a diterpene with potent antitumor activity (SILVA *et al.*, 2014). Another compound found was a possible estearoil-histidine (C₂₄H₄₃N₃O₃). The amino acid histidine is precursor of histamine, a substance responsible by regulation of inflammatory response (VOET; VOET, 2013). Possible tripeptides (C₁₈H₃₉N₉O₃) were found, and is known that tripeptides act in cell communication providing a stable environment for cellular and tissue metabolism (NELSON; COX, 2011).

Cerovsky *et al.* (2011) isolated and identified the peptide defensin from *L. sericata* larvae, in accordance to Valachova *et al.* (2014) that found the peptide lucifensin. These low molecular weight peptides are recognized for giving insects their intrinsic ability to fight against pathogenic invaders due to antimicrobial action, as well as are capable to avoid the emergence of resistance (BEASLEY *et al.*, 2004; NIGAM *et al.*, 2006; VALACHOVA *et al.*, 2014). However, is important to highlight that this is a preliminary and exploratory analysis, revealing a scan of compounds detected with higher signal peaks of the secretions in the range of masses covered by the equipment (50-1000 Da). Thus, futures studies are need to not neglect other chemical molecules that can be volatile or emit a weaker signal.

At associated manner, the *in vitro* tests constitute a multidisciplinary interest in the medicine and biotechnology fields. Thus, more studies can be necessary for a better understanding of the behavior of secretions in relation to other diseases, including morphological evaluation with identification of action mechanism linked to apoptosis/necrosis.

6. CONCLUSION

In this study we validated a method to analyze *in vitro* from larval secretion of *L. cuprina* and *S. chlorogaster*, providing data about inhibitory activity against tumor cells (A549, A375 e HeLa). Moreover, the constituents identified can be involved in the modulation of many functions, culminating in its biological activity and in DNA damage. Is important emphasize that antitumor activity of *L. cuprina* larval secretion is more promising compared to *S. chlorogaster*, requiring more investigation. In this sense, there is a need to perform *in vitro* and *in vivo* tests to verify whether larval secretion could act as an adjuvant in traditional pharmacological therapy for lung cancer, melanoma and cervix.

Acknowledgment

To André Passaglia Schuch (UFSM) for providing the pCMUT plasmid.

REFERENCES

1. Al-Khshemawee, H., *et al.* Efficacy of D-Glucose-13C6 as a Label for Amino Acid Identification and Quantification in Mediterranean Fruit Flies (Diptera: *Tephritidae*). *J. of Entomological Science*, 55(1), 117-125, 2020. doi.org/10.18474/0749-8004-55.1.11.
2. Al-Saeed, W. M.; Mahmood, H. J. Effect of Maggot (larva) Secretions on Bacterial Growth. *Rafidain Dent J.* 12,(1)1, 160-164, 2012.
3. Arrivillaga, J., *et al.*, Evaluación preliminar en un modelo animal de la terapia con larvas de *Lucilia sericata* para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea. *Biomédica*, 28(2), 305-310, 2008.
4. Ausubel, D. A cognitive structure view of word and concept meaning. In R.C. Anderson e D. Ausubel. *Readings in the Psychology of Cognition*. New York: Holt, Rinehart and Winston, 1995.
5. Beasley, W.D., Hirst, G. Fazendo uma refeição de MRSA – o papel da biocirurgia na infecção hospitalar. *J Hosp Infect.* 56, 6-9, 2004.
6. Bexfield, A., Detection and partial characterisation of two antibacterial factors from the excretions/secretions of the medicinal maggot *Lucilia sericata* and their activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Microbes and Infection*, 6(14), 1297-1304, 2004.
7. Bottari, N.B., *et al.*, Neuroprotective role of resveratrol mediated by purinergic signalling in cerebral cortex of mice infected by *Toxoplasma gondii* *Parasitol Res.*119(9), 2897-2905, 2020. doi: 10.1007/s00436-020-06795-0
8. Brant, M.P.R., *et al.*, Characterization of the excretory/secretory products of *Dermatobia hominis* larvae, the human bot fly. *Veterinary Parasitology*, 168, 304-311, 2010.
9. Bray, F. *et al.*, Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries *CA Cancer J Clin.* 68(6), 394-424, 2018. doi: 10.3322/caac.21492.
10. Brenzan, M.A., *et al.*, Structure–activity relationship of (–) mammea A/BB derivatives against *Leishmania amazonensis*. *Biomed. Pharmacother.* 62, 651-658, 2012. doi:10.1016/j.biopha.2008.08.024
11. Brown, A., Blow fly *Lucilia sericata* nuclease digests DNA associated with wound slough/escharand with *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *Medical and Veterinary Entomology*, 26(4), 432-439, 2012.
12. Bruckmann, F. S. *et al.* Synthesis, Characterization, and Biological Activity Evaluation of Magnetite-Functionalized Eugenol. *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials* , 32(4) 1459-1472, 2021. doi:10.1007/s10904-021-02207-7
13. Bruckmann, F.S., *et al.* Influence of magnetite incorporation into chitosan on the adsorption of the methotrexate and in vitro cytotoxicity. *Environmental Science and Pollution Research* 29, 70413-70434, 2022.
14. Capes-Davis, A, “Verifique suas culturas! Uma lista de linhas celulares contaminadas ou mal identificadas”. *Int. J. Câncer* . 127(1), 1-8, 2010.
15. Cappellari, A. R, *et al.*, Involvement of ecto-5'-nucleotidase/CD73 in UL38MG glioma cell adhesion. *Mol cell biochem*, 359, 315-322, 2012.
16. Čeřovský V., *et al.*, Lucifensin, uma nova defensina de insetos de larvas medicinais: síntese e estudo estrutural. *J.Chembiochem.* 12(9):1352-61, 2011. doi: 10.1002/cbic.201100066. Epub 2011 10 de maio.PMID: 21560219

17. Chambers, L. *et al.*, Degradation of extracellular matrix components by defined proteinases from the greenbottle larva *Lucilia sericata* used for the clinical debridement of non-healing wounds. *British Journal of Dermatology*, 148, 14-23, 2003.
18. Cossetin, L. F. *et al.* *In vitro* Safety and Efficacy of Lavender Essential Oil (Lamiales: *Lamiaceae*) as an Insecticide Against Houseflies (Diptera: *Muscidae*) and Blowflies (Diptera: *Calliphoridae*). *Journal of Economic Entomology*. 3, p.1-9, 2018.
19. Crawford, S. Anti-inflammatory/antioxidant use in long term maintenance cancer therapy: a new therapeutic approach to disease progression and recurrence. *Ther Adv Med Oncol*. 6(2), 52-68, 2014. doi: <https://doi.org/10.1177/1758834014521111>
20. Cruz-Saavedra, L., *et al.*, The effect of *Lucilia sericata*- and *Sarconesiopsis magellanica*-derived larval therapy on *Leishmania panamensis* *Acta Tropica* 164, 280-289, 2016.
21. da Silva, A.D., *et al.*, Oxidative stress in dairy cows naturally infected with the lungworm *Dictyocaulus viviparus* (Nematoda: *Trichostrongyloidea*) *J Helminthol* 91(4), 462-469, 2017. doi: 10.1017/S0022149X16000456
22. De Bandt, J. P., Cynober, L. Therapeutic use of branched-chain aminoacids in burn, trauma and sepsis. *The Journal of Nutrition*. 136 (1), 308S-313S, 2006.
23. Díaz-Roa, A. *et al.* Sarconesin: *Sarconesiopsis magellanica* Blowfly Larval Excretions and Secretions with Antibacterial Properties. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2249, 2018. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02249.
24. Diaz-Roa, A., *et al.*, *Sarconesiopsis magellanica* (Diptera: *Calliphoridae*) excretions and secretions have potent antibacterial activity. *Acta Trop*. 136, 37-43, 2014. doi: 10.1016/j.actatropica.2014.04.018
25. Echeverri, M.I.W., *et al.* *Lucilia eximia* (Diptera: *Calliphoridae*), uma nova alternativa para a terapia larval y reporte de casos en Colombia. *Iatreia* 23, 107-116. 2010.
26. Felipe, K. B. Estudo da atividade antitumoral do extrato bruto e frações de *Casearia sylvestris*. 127 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.
27. Flissak, J.C., Moura, M.O., Intrapuparial Development of *Sarcopenia chlorogaster* (Diptera: *Calliphoridae*) for Postmortem Interval Estimation (PMI). *Journal of Medical Entomology* 55(2),277-84, 2018.
28. Fracasso, M., *et al.*, Involvement of ectonucleotidases and purinergic receptor expression during acute Chagas disease in the cortex of mice treated with resveratrol and benznidazole *Purinergic*17(3), 493-502, 2021. doi: 10.1007/s11302-021-09803-9
29. Franco, C. *et al.* Protective Effect of Indomethacin-loaded Polymeric Nanoparticles Against Oxidative Stress-Induced Cytotoxicity in Human Breast Adenocarcinoma Cell Model. *Revista Brasileira de Cancerologia* 68(4), e-012545, 2022. doi.org/10.1021/mp300274g
30. Franco, F.W. *et al.*, The influence of dietary Motore™ supplement on antioxidant status to *Aeromonas hydrophila* infection in *Rhamdia quelen* *Microbial Pathogenesis*, 154, 1048-1071, 2021.
31. Garzon *et al.*, In vitro activity of larval secretions from *Lucilia cuprina* against *Leishmania amazonensis*, *Trypanosoma cruzi* and cell lines. *Brazilian Journal of Development*, 7,(8) 82837-82858, 2021.
32. Giard, D.J., *et al.* "In vitro cultivation of human tumors: Establishment of cell lines derived from a series of solid tumors". *Journal of the National Cancer Institute*. 51(5),1417-23, 1973.
33. Givehchi, A., *et al.* Classification and Prediction of Tripeptides Inhibiting HIV-1 Tat/TAR-RNA Interaction Using a Self-Organizing Map. *Letters in Drug Design & Discovery*. 4 (6), 410-416, 2007. doi: 10.2174/157018007781387791

34. Griess, J.P., On a new series of bodies in which nitrogen is substituted for hydrogen, 154, 667-731, 1864. <https://doi.org/10.1098/rstl.1864.0018>
35. Hanahan, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions *Cancer Discov* 12(1), 31-46, 2022. doi: 10.1158/2159-8290.CD-21-1059.
36. Hobson, R.P. (On an enzyme from blow-fly larvae (*Lucilia sericata*) which digests collagen in alkaline solution. *Biochemical Journal*, 25, 1458-1463, 1931.
37. Hörner, R. Estudos de compostos capazes de clivar DNA. 203f. Tese (Doutorado em Química). Universidade Federal De Santa Catarina, Florianópolis, 2003.
38. Horobin, *et al.*, A.J., Promotion of human dermal fibroblast migration, matrix remodelling and modification of fibroblast morphology within a novel 3D model by *Lucilia sericata* larval secretions. *J Invest Dermatol.* 126(6),1410-8, 2006.
39. INCA (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER). Estimativas 2018. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/estimativa/2018/estimativa-2018> (acesso: 30 mai de 2020).
40. Kee, W. N.G. *et al.* Mary Ann Liebert©, Inc. The Challenge to Measure Cell Proliferation in Two and Three Dimensions. *Tissue Engineering* 11,(1)(2), 2005.
41. Le-Huu, P. *et al.*, Chemoenzymatic Route to Oxyfunctionalized Cembranoids Facilitated by Substrate and Protein Engineering. *Chemistry a European Journal*, 2018. doi.org/10.1002/chem.201802250
42. Li-Yun Yao, L. *et al.*, Synthesis of Lipoamino Acids and Their Activity against Cerebral Ischemic Injury *Molecules* 14(10), 4051-4064, 2009. <https://doi.org/10.3390/molecules14104051>
43. Lopes, A.M., *et al.*, Glutamate-gated chloride channel subunit cDNA sequencing of *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: *Calliphoridae*): cDNA variants and polymorphisms. *Invert Neurosci.*14(2), 137-146, 2014.
44. Martins, G., *Calliphoridae* (Insecta, Diptera) Associados às fases de decomposição de carcaças de suínos (*Sus scrofa* Linnaeus, 1758) em área de caatingano estado da Paraíba. 2013. Disponível online: <http://www.tede2.ufrpe.br:8080/tede/bitstream/tede2/5666/2/Geraldo%20Martins.pdf> Acesso em: 24 de outubro de 2022.
45. Medina, D., *et al.*, First record of myiasis by Sarcophagidae (Diptera: *Oestroidea*) in *Hyalinobatrachium feischmanni* (Anura: *Centrolenidae*) from Panama. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 80, 263-264, 2012.
46. Monteiro, S. G. Parasitologia na Medicina Veterinária. 2. ed. Rio de Janeiro: Roca, 2017
47. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65,55-63, 1983.
48. Nasser, S., et al., Hidrogéis de k-Carragenina-Bacillus thuringiensis israelensis: um material promissor para combater as larvas do mosquito *Aedes aegypti*. *Tecnologias e Aplicações de Polímeros de Carboidratos*, 2, 1-8, 2021.
49. Nelson, D. L; Cox, M. M. Princípios de Bioquímica de Lehninger. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, p. 82-85, 2011.
50. Nigam, *et al.*, Maggot Therapy: The Science and Implication for CAM Part I—History and Bacterial Resistance Evid Based Complement Alternat Med. 3(2), 223-227, 2006.
51. Pinheiro, M. A. R. Q..Terapia larval: uso de larvas de *Chrysomya megacephala* (Diptera, *Calliphoridae*) no tratamento de úlceras crônicas em pacientes diabéticos no Hospital Universitário Onofre Lopes- Natal, RN. Disponível online: <https://repositorio.ufrn.br/jspui/handle/123456789/23572> Acesso em: 11 de maio. 2020.
52. Rocha, C. M. R. Avaliação dos efeitos tóxicos de novas substâncias bioativas: detecção de estresse oxidativo e mutagênico. 2018. 104 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia da Escola de Engenharia de São Carlos –

- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018.
53. Röckl-Pinilla., Y. T., *et al.*, Proteolytic activity regarding *Sarconesiopsis magellanica* (Diptera: *Calliphoridae*) larval excretions and secretions. *Acta Tropica* 128(3), 686-691, 2013.
 54. Sanei-Dehkordi, A. *et al.* Anti Leishmania activity of *Lucilia sericata* and *Calliphora vicina* maggots in laboratory models. *Experimental Parasitology* 170, 59-65, 2016.
 55. Schilling, R., *et al.*, Characterization of the ripoptosome and its components: implications for anti-inflammatory and cancer therapy *Methods Enzymol.* 545, 83-102, 2014. doi: 10.1016/B978-0-12-801430-1.00004-4.
 56. Sharma, S.D., *et al.* Melanotropic peptide-conjugated beads for microscopic visualization and characterization of melanoma melanotropin receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 13715-13720, 1996.
 57. Sherman, R.A. *et al.* Larvas medicinais: um remédio antigo para algumas aflições contemporâneas. *Annu Rev Entomol.* 45, 55-81, 2000.
 58. Sherman, R.A. Mechanisms of maggot-induced wound healing: what do we know, and where do we go from here?. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 43p, 2014.
 59. Shi, L., *et al.*, Sequenciamento de leitura longa e montagem de novo de um genoma chinês *Nat. Comum.* 7, 12065, 2016.
 60. Silva, A.O. *et al.* O. Evaluation of anti-inflammatory and mechanism of action of extract of *Macrosiphonia ongiflora* (Desf.) Müll. *Arg. J. Ethnopharmacol.* 154, 319-329, 2014.
 61. Silva, D.C., Aspectos biológicos e ecológicos de *Cochliomyia macellaria* (Fabricius, 1775) (Diptera, *Calliphoridae*), 2013. Disponível online: <https://tede.ufrj.br/jspui/bitstream/jspui/2770/2/2013%20-%20D%C3%A9bora%20Cardoso%20da%20Silva.pdf> Acesso em: 24 de outubro de 2022.
 62. Silva, *et al.*, Diterpenóides com esqueleto cleistanano de *Vellozia aff. carunculares martius ex seubert* (Velloziaceae) *Quím. Nova* 24(5), 2001. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422001000500009>
 63. Silvasamy, A. *et al.* Preparation, characterization, and surface and biological properties of N-stearoyl amino acids. *78, (9)*, 897-902, 2001. doi.org/10.1007/s11746-001-0361-5
 64. Sinicropi, D. *et al.*, Colorimetric determination of DNase I activity with a DNA-methyl green substrate. *Analytical Biochemistry*, 222, 351-358, 1994.
 65. Stoll, S.N., Avaliação da atividade biológica de um terpeno em linhagem de câncer de pulmão de pequenas células (A549) Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia em Saúde do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade do Vale do Taquari – Univates, 2018. Disponível em: <https://univates.br/bdu/bitstream/10737/2012/1/2018StefaniStoll.pdf> Acesso em: 24 de outubro de 2022.
 66. Tabouret, G, *et al.*, Serine protease activity in excretory-secretory products of *Oestrus ovis* (Diptera: *Oestridae*) larvae. *Vet Parasitol.* Jun;114(4),305-14, 2003.
 67. Tackett AJ, Proteômica e melanoma: uma perspectiva atual. *Globo Dermatol* 3(4), 366-370, 2019.
 68. Teh, C. H., *et al.* Determination of antibacterial activity and minimum inhibitory concentration of larval extract of fly via resazurin-based turbidometric assay *BMC Microbiology* 17(36), 2017. DOI 10.1186/s12866-017-0936-3.
 69. Teh, C. H., *et al.* In vitro antibacterial activity and physicochemical properties of a crude methanol extract of the larvae of the blowfly *Lucilia cuprina*. *Med Vet Entomol.* 27(4),414-20, 2013.

70. Teixeira, D.G., *et al.*, Caracterização bioquímica do produto de excreção/secreção de larvas de *Cochliomyia Hominivorax* (Diptera: *Calliphoridae*) Ciênc. anim. bras. 17 (4) 2017. <https://doi.org/10.1590/1089-6891v17i437176>
71. Thomas, S., *et al.*, The anti-microbial activity of maggot secretions: results of a preliminary study. *Journal of Tissue Viability*, 9(4), 127-132, 1999.
72. Tunes, L.G. Estudo pré-clínico de complexos de ouro (AuI) como metalofármacos antileishmania e antitumoral. 125 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde)-Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, 2019.
73. Valachová I., *et al.*, Expressão de lucifensina em *Lucilia sericata* medicinal larvas locais em infectados meio ambientes. *Res. de Tecidos Celulares* 353, 165-171, 2013.
74. van der Plas, M.J.A., *et al.*, A novel serine protease secreted by medicinal maggots enhances plasminogen activator-induced fibrinolysis *PLoS One* 19, 9(3):e92096. 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0092096. eCollection 2014.
75. Viana, A. R. *et al.* Activity of Free and Liposomal Antimony Trioxide in the Acute Promyelocytic Leukemia Cell Line NB4. *Anticancer Research* 41(12), 6061-6065, 2021. doi: <https://doi.org/10.21873/anticancer.15425>
76. Viana, A. R. *et al.* Cytotoxic screening and antibacterial activity of Withaferin A. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Current Issues*, Vol 85(16), 2022. doi.org/10.1080/15287394.2022.2071787
77. Viana, A. R., *et al.*, Insights of ethyl acetate fraction from *Vassobia breviflora* in multidrug-resistente bactéria and cancer cells: from biological to therapeutic. *J. Toxicol. Environ. Health Part A*, v.85, p. 972-987, 2022.
78. Vizzotto, B. *et al.* DNA photocleavage and melanoma cells cytotoxicity induced by a meso-tetra-ruthenated porphyrin under visible light irradiation. *J Photochem Photobiol B*. 209,111922, 2020. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2020.111922.
79. Voet, D., Voet, J. *Bioquímica*. [S.l.]: Artmed, 2013.
80. Wiedemann, C.R.W., *Brasilianische Zweiflugler*. *Zoologisches Magazin* 1(3), 40-56, 1819.
81. Xu, J.; Mao, W. Overview of Research and Development for Anticancer Drugs. *Journal of Cancer Therapy* 7(10), 762-772, 2016.
82. Zappavigna S, *et al.* Antiinflammatory drugs as anticancer agents. In *J Mol Sci*. 21(7), 2605, 2020. doi: <https://doi.org/10.3390/ijms21072605>
83. Zhichen, C., *et al.* Quality evaluation of *Lonicerae Japonicae Flos* and *Lonicerae Flos* based on simultaneous determination of multiple bioactive constituents combined with multivariate statistical analysis, *Phytochemical Analysis*, 10.1002/pca.3127, 2019. doi.org/10.1002/pca.2882
84. Zhichen, C., *et al.* Variações na morfologia, fisiologia e múltiplos constituintes bioativos de *Lonicerae Japonicae Flos* sob estresse salino, *Scientific Reports*, 10.1038/s41598-021-83566-6, 11, 1, 2021.

6 DISCUSSÃO

Em vários períodos da história humana as moscas foram observadas e relacionadas à decomposição de cadáveres, carcaças e de modo geral por estarem associadas ao lixo, principalmente à sujeira. Em virtude da alta frequência em que eram encontradas nessas situações gerou curiosidade acerca da sua dinâmica de sobrevivência e motivaram pesquisas, uma vez que limpeza de feridas crônicas e infectadas por larvas é conhecido há séculos. A partir daí, estudos assim como este se tornaram fundamentais na busca de terapias alternativas complementares com dípteros (CORDEIRO, 2014; DÍAZ-ROA et al., 2018; LOURENÇO, 2008; YI et al., 2014).

Parte dos estudos encontrados na literatura sobre Dípteros são geralmente de espécies distintas das avaliadas aqui, como exemplo a espécie *L. sericata*, uma vez que suas larvas têm sido utilizadas para terapia larval (TL) na Europa e nos Estados Unidos. Entretanto, alguns estudos já demonstraram atividade antibacteriana para a secreção larval de diferentes espécies de dípteros, incluindo *L. cuprina* (ARORA; BAPTISTA; LIM, 2011; EL SHAZELY et al., 2013; TEH et al., 2013, 2017). Porém, dados sobre atividade antiprotozoária, citotóxica e antitumoral *in vitro*, com essas espécies de dípteros investigadas no presente estudo, são escassos ou quase inexistentes na literatura científica, o que torna o nosso estudo inédito.

Nosso grupo de pesquisa vem realizando extensa triagem de compostos biológicos, fitoquímicos e sintéticos com potencial terapêutico, especialmente antiparasitário e antitumoral (BALDISSERA et al., 2014; BALDISSERA et al., 2016; COSSETIN et al., 2018; DILLMANN et al., 2022; FRACASSO et al., 2021; GARZON et al., 2021; PETRY et al., 2021). Entre os resultados promissores está a secreção larval desses dípteros. Aqui, no primeiro estudo, o uso de secreções larvais de *L. cuprina* frente *Leishmania amazonensis*, *Trypanosoma cruzi* e a linhagem celular B16F10 demonstrou atividade antiprotozoária e antitumoral. Além disso, frente a fibroblastos HFF-1 mostrou baixa toxicidade, demonstrando segurança do uso em células normais e saudáveis, além das características de constituir-se num tratamento natural com baixo custo de produção.

Além disso, pesquisas anteriores mostraram que as secreções larvais contêm uma variedade de componentes que inibem o crescimento de vários organismos. No presente estudo mostramos que a secreção de díptero mesmo em baixas concentrações (0,25%, 1% e 2%) possui atividade agindo frente à protozoários como *L. amazonensis* (mostrando uma redução de viabilidade para 37,33%, uma taxa de redução muito alta) e *T. cruzi* mas também frente a linhagens celulares, assim como evidenciado por Arrivillaga, Rodríguez e Oviedo (2008), Polat

et al. (2012), Cruz-Saavedra et al. (2016) e Laverde-Paz et al. (2018). Em relação à atividade contra *T. cruzi*, nosso estudo demonstrou atividade significativa *in vitro* com tratamento por 24h, similar a um estudo com extrato das raízes de *Arrabidaea brachypoda*, demonstrando um resultado promissor.

Destacou-se, pela primeira vez, a atividade citotóxica *in vitro* da secreção larval de *L. cuprina* reduzindo a viabilidade de células tumorais B16F10, A549, A375 e Hela, em todos os ensaios e quase todas as concentrações avaliadas. Assim como a secreção larval de *S. chlorogaster* foi capaz de reduzir significativamente, a viabilidade celular de A549, A375 e Hela, não sendo observado somente nas menores concentrações (0,1% e 0,25%) frente as três linhagens, também na concentração de 0,5% para Hela e na concentração de 5% para A375, demonstrando ainda considerável efeito citotóxico.

Em relação à linhagem celular tumoral, os resultados apresentaram redução de viabilidade e aumento nas taxas de estresse oxidativo e DNA extracelular, sugerindo assim, que essa ação pode estar relacionada com a interação de espécies reativas com moléculas de DNA, conforme ensaios fluorimétricos de quantificação do dsDNA e Diclorofluoresceína, sendo provavelmente um mecanismo compensatório. Os resultados iniciais desta pesquisa mostraram redução de viabilidade e toxicidade, respectivamente, pela ação dessas enzimas, possivelmente, mediadas pelas alterações que geram nas membranas celulares tanto na interação com o parasita quanto nas células tumorais, conforme relatado anteriormente (ČEŘOVSKÝ et al., 2010; DÍAZ-ROA et al., 2018; DÖLL-BOSCARDIN et al., 2012; KERLIN; EAST, 1992; LOURENÇO, 2008; RATCLIFFE et al., 2015; TUNES, 2019; YANG; SHI; DOU, 2007; YI et al., 2014).

No segundo estudo, motivado e com base nos resultados obtidos na primeira investigação de Garzon et al. (2021), avaliamos a atividade biológica e o possível potencial antitumoral dos constituintes da secreção larval de duas espécies de dípteros: *L. cuprina* e *S. chlorogaster* em três diferentes linhagens celulares tumorais: A549 (modelo de adenocarcinoma pulmonar), A375 (melanoma humano) e Hela (câncer de colo do útero), em *screening* assim como Hassan et al. (2010), Liu et al. (2015) e Stoll (2018). Esses autores também avaliaram compostos naturais por diferentes métodos e identificaram redução de viabilidade associada aos metabólitos envolvidos no processo inflamatório, que está diretamente relacionada com o desenvolvimento do câncer, desde o crescimento tumoral, invasão, progressão e metástase (HOENERHOFF, 2015).

O efeito genotóxico também foi analisado através da capacidade de clivagem do DNA plasmidial, pois sabe-se que algumas alterações celulares podem influenciar na sobrevivência,

crescimento, diferenciação e na interação de células tumorais com a matriz extracelular (STARK; LIVAS; KYPRIANOU, 2015). Uma variedade de mediadores químicos estão envolvidos e contribuem para o microambiente que resultará no desenvolvimento, invasão e metástase do câncer assim como morte celular por necrose ou apoptose. Assim como visto em nossos resultados, Grivennikov, Greten e Karin (2010) relataram que o tratamento com a secreção larval causou algum tipo de inibição de mecanismos de reparo do DNA.

Esse microambiente é definido através da ocorrência de eventos como a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (ERN), ao dano celular, degeneração, morte celular e angiogênese (BRAY et al., 2018; HAO et al., 2012) que somados sinalizam a capacidade de diminuir viabilidade de células tumorais, correlacionada aos componentes que foram identificados por uma varredura através de espectrometria de massa.

Observamos que houve inibição das funções intracelulares demonstrado por nossos resultados expressos nos ensaios realizados MTT, NR, LDH, NO, aderência e DCF frente às linhagens tumorais. Evidenciado pela interação da secreção ao DNA, havendo produção de espécies reativas, nos sistemas biológicos o que pode desencadear aumento de oxigênio quanto nitrogênio, causando danos irreversíveis em macromoléculas como DNA, exercendo efeitos pró-apoptóticos (DÍAZ-ROA et al., 2018; LIU et al., 2015).

Estudos com esses constituintes, determinados como enzimas proteolíticas das larvas, relatam, que além de interação direta com o parasito, há também síntese de colagenase e enzimas do tipo tripsina e quimotripsina que participam da quebra de macromoléculas com ação superficial e a nível intracelular (BEASLEY; HIRST, 2004; SANEI-DEHKORDI et al., 2016).

Stoll (2018), mostra dados de viabilidade celular e citotoxicidade, de um composto natural TPN, que apresenta também satisfatória atividade antiproliferativa em linhagem de pulmão A549, entre outros tipos de câncer, que concorda com nossos resultados. Semelhante ao nosso estudo pois sugerem a capacidade inibitória deste terpeno na migração celular resultante da inibição de moléculas envolvidas em processos inflamatórios. Tendo em vista que mediadores do metabolismo do ácido araquidônico estão relacionados com a migração celular induzida pelo composto, assim como os dados encontrados neste estudo com o ácido graxo polinsaturado (SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1999).

Mesmo utilizando um método diferente e outras linhagens tumorais, observa-se a constância do efeito antiproliferativo entre os estudos que relatam a capacidade desse composto natural, TPN, em inibir produção de nitritos, sugerindo sua capacidade de interferência na migração celular e conseqüente inibição da progressão tumoral, dados que também estão de acordo com *screening* realizado neste trabalho, reforçando a possibilidade da secreção de

díptero ser um antitumoral por danos causados via radicais livres (HASSAN et al., 2010; STOLL, 2018).

Outro estudo demonstrou que a secreção larval não é inibida por mediadores como histamina, bradicinina, fator ativador de plaquetas, agonistas quimiotáticos de leucócitos (complemento ativado, leucotrieno 84 e interleucina-8), moléculas efectoras de respostas imunes (interleucina- 1β , fator de necrose tumoral- α e interferon- γ) e endotoxinas (COLDITZ; EISEMANN, 1994), o que está de acordo com a nossa hipótese, correlacionando à sua função anticâncer, de que a secreção larval pode exercer atividade por facilitar a ação de mediadores químicos responsáveis pela inflamação.

Outro importante resultado demonstrado aqui foi a capacidade de clivar o DNA plasmidial em que ambas as secreções confirmam a citotoxicidade para linhagens tumorais, estando de acordo com o que já foi demonstrado por Brown et al. (2012) para *L. sericata*. Assim como Domingues et al. (2010) demonstraram atividade citotóxica de compostos sintéticos através da clivagem do DNA plasmidial em células de medula óssea de pacientes com leucemia, indo ao encontro de Tizotti et al. (2016) que com os mesmos compostos exibiram efeitos antiproliferativos expressivos, em células de pacientes com diferentes neoplasias.

Em resumo, nossos estudos *in vitro* mostram que a secreção larval de *L. cuprina* atuou frente a protozoários e linhagem tumoral, modulando uma via com danos oxidativos sugerindo um provável mecanismo de ação, assim como os resultados para *S. chlorogaster* que também demonstrou atividade antitumoral. Além disso, ambas secreções demonstraram capacidade de clivar o DNA plasmidial, comprovando dano em macromoléculas, sugerindo que a ação possivelmente se deve ao perfil das moléculas identificadas. Tendo em vista atividade sob aderência e antiproliferativo, pode-se ainda sugerir que tenha algum efeito sob a redução de metástase tumoral e invasão celular destas células.

Os dados supracitados em conjunto, tornam a secreção de díptero um importante recurso a ser analisado devido a suas propriedades biológicas pelo satisfatório desempenho *in vitro* em protozoários e, pela primeira vez, em carcinomas além de ser segura, com baixo custo e baixa toxicidade para células normais. Embora este estudo tenha contribuído para aumentar a compreensão de algumas propriedades de *L. cuprina* e *S. chlorogaster*, estudos futuros são indispensáveis a fim de caracterizar e confirmar os constituintes revelados, bem como esclarecer o tipo de morte celular pois sugere que a secreção larval possui mais de um mecanismo de ação responsável pelos efeitos citotóxicos observados.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

ARTIGO I

- Evidenciamos que a secreção larval de díptero teve efeito sobre protozoários e linhagens celulares. *L. amazonensis* e *T. cruzi* mostraram-se sensíveis à *L. cuprina*.
- A secreção larval mostrou efeito citotóxico frente a células tumorais de melanoma B16F10 em todos os testes aplicados, MTT, VN e CV, nas maiores concentrações avaliadas, durante o período de 24 horas.
- Frente à linhagem de fibroblasto HFF-1, a secreção larval não demonstrou redução de viabilidade celular no teste MTT. No ensaio VN e CV a toxicidade foi extremamente baixa inferindo segurança para as células do hospedeiro.
- A secreção larval de *L. cuprina* aumenta o nível de estresse oxidativo através do ensaio da Diclorofluoresceína e promoveu aumento de DNA extracelular no ensaio *Picogreen*, que sugerem morte celular causada por espécies reativas.

MANUSCRITO I

- A secreção de *L. cuprina* mostrou redução de viabilidade celular e aumento de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio frente às linhagens tumorais A549 e A375 em todos os testes aplicados durante o mesmo período do estudo anterior. Frente à HeLa demonstrou redução da viabilidade, exceto no ensaio fluorimétrico DCF-DA.
- A secreção de *S. chlorogaster* mostrou citotoxicidade em VN, MTT, Aderência e DCF-DA frente à linhagem A549, entretanto, não aumentou níveis de LHD e espécies reativas de nitrogênio. Em relação às linhagens A375 e HeLa foi evidenciado efeito citotóxico nos ensaios VN, MTT e aumento na produção de EROS no teste DCF-DA.
- Evidenciamos atividade antiproliferativa para todas as linhagens frente as duas espécies de dípteros, nas diferentes concentrações determinadas, no período de 72h.
- Foi possível comprovar a citotoxicidade celular através da capacidade das secreções larvais de *L. cuprina* e *S. chlorogaster* em clivarem o DNA plasmidial.
- Identificamos, através de espectrometria, possíveis estruturas moleculares (ácido graxo, valina, cembranoid, estearoil-histidina e tripeptídeo) na secreção de *L. cuprina*. Na secreção de *S. chlorogaster* identificamos outras estruturas químicas não reconhecidas nos bancos de dados, conforme era previsto, sugerindo a possibilidade de componente inédito e/ou exclusivo.

REFERÊNCIAS

- ADORNO, A. F. *et al.* A utilidade da captura híbrida para o HPV de alto risco em pacientes com atipia de células escamosas na colpocitologia. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, [s.l.], v. 56, p. 1-6, 2020.
- ALI, A.; BHATTACHARYA, S. DNA binders in clinical trials and chemotherapy. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 22, p. 4506-452, 2014.
- ALMEIDA, E. A. *et al.* Rede Brasileira de atenção e estudos na coinfeção Trypanosoma cruzi/HIV e em outras condições de imunossupressão. **Rev Soc Bras Med Trop**, [s.l.], v. 42, n. 5, p. 605-608, 2009.
- AL-SAEED, W. M.; MAHMOOD, H. J. Effect of Maggot (larva) Secretions on Bacterial Growth. **Rafidain Dent J**, [s.l.], v. 12, n. 1, p. 160-164, 2012.
- ALVES, D. F. *et al.* Métodos de diagnóstico para a doença de Chagas: uma atualização / Diagnostic methods of Chagas disease: an update. **Rev. bras. anal. Clin.**, [s.l.], v. 50, n. 4, p. 330-333, 2019.
- AMENDT, J. *et al.* Forensic entomology: applications and limitations. **Forensic Sci Med Pathol**, [s.l.], v. 7, n. 4, p. 379-392, 2011.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. **Cancer facts & figures 2012**. Atlanta: [s.n.], 2012.
- ANAND, P. *et al.* Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. **Pharmaceutical Research**, [s.l.], v. 25, p. 2097-2116, 2008.
- AQUINO, M. F. K. **Terapia larval**: divulgação, abordagens para criação de larvas de Calliphoridae (Insecta: Diptera) e avaliação "in vitro" da ação de suas exosecreções sob "Leishmania amazonensis". 2017. 87 p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2017.
- ARAÚJO, I. C. Cutaneous melanoma: clinical, epidemiological, and anatomopathological aspects of a training center in Belo Horizonte. **Rev. Bras. Cir. Plást.**, [s.l.], v. 29, n. 4, p. 497-503, 2014. DOI 10.5935/2177-1235.2014RBCP0088.
- ARORA, S.; BAPTISTA, C.; LIM, C. S. Maggot metabolites and their combinatory effects with antibiotic on Staphylococcus aureus. **Ann Clin Microbiol Antimicrob**, [s.l.], v. 10, n. 6, 2011. DOI 10.1186/1476-0711-10-6.
- ARRIVILLAGA, J.; RODRÍGUEZ, J.; OVIEDO, M. Evaluación preliminar en un modelo animal de la terapia con larvas de Lucilia sericata para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea. **Biomédica**, Bogotá, v. 28, n. 2, p. 305-310, abr./jun. 2008. ISSN 0120-4157.
- ARROWSMITH, J. Trial watch: Phase II failures: 2008-2010. **Nature Reviews Drug Discovery**, [s.l.], v. 10, p. 328, 2011.
- AUWERA, G. V.; DUJARDIN, J. C. Species typing in dermal Leishmaniasis. **Clin Microbiol Rev**, [s.l.], v. 28, n. 2, p. 265-294, 2015. DOI 10.1128/CMR.00104-14.

BALCH, C. M. *et al.* Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. **Journal Clinical Oncology**, [s.l.], v. 27, n. 36, p. 6199-6206, 2009.

BATISTA, D. G. J. **Estudos in vitro e in vivo da atividade biológica de fluorquinolonas, tiossemicarbazonas, diamidinas aromáticas e arilimidamidas sobre Trypanosoma cruzi.** 2010. 202f. Tese (Doutorado em Biologia Parasitária) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2010.

BAUMGARTNER, D. L.; GREENBERG, B. Distribution and medical ecology of the blow flies (Diptera: *Calliphoridae*) of Peru. **Annals of the Entomological Society of America**, [s.l.], v. 78, p. 565-587, 1985.

BEASLEY, W. D.; HIRST, G. Making a meal of MRSAV the role of biosurgery in hospital-acquired infection. **J Hosp Infect**, [s.l.], v. 56, n. 1, p. 6-9, 2004.

BELL, A. Antimalarial peptides: the long and the short of it. **Curr Pharm Des**, [s.l.], v. 17, n. 25, p. 2719-2731, 2011.

BENASSI, J. C. Potencial citotóxico e antiproliferativo de novos selenoésteres derivados de diidropirimidinonas: estudo in vitro e in silico. Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Florianópolis, 2021.

BERN, C. Chagas' Disease. **N Engl J Med**, [s.l.], v. 373, n. 5, p. 456-466, 2015.

BERN, C. *et al.* Trypanosoma cruzi and Chagas' Disease in the United States. **Clin Microbiol Rev**, [s.l.], v. 24, n. 4, p. 655-681, 2011.

BERN, C.; MAGUIRE, J.; ALVAR, J. Complexities of Assessing the Disease Burden Attributable to Leishmaniasis. **PLoS Negl Trop Dis**, [s.l.], v. 2, n. 10, p. e313, 2008.

BERTOLOTTO, C. Melanoma: from melanocyte to genetic alterations and clinical options. **Review Scientifica**, [s.l.], article ID 635203, 2013. DOI 10.1155/2013/635203.

BEXFIELD, A. *et al.* Detection and partial characterisation of two antibacterial factors from the excretions/secretions of the medicinal maggot *Lucilia sericata* and their activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Microbes Infect**, [s.l.], v. 6, n. 14, p. 1297-1304, 2004. DOI 10.1016/j.micinf.2004.08.011.

BOGGILD, A. K. *et al.* Optimization of Microculture and Evaluation of Miniculture for the Isolation of Leishmania Parasites from Cutaneous Lesions in Per. **Am. J. Trop. Med. Hyg**, [s.l.], v. 79, n. 6, p. 847-852, 2008.

BONFÁ, R. *et al.* A precocidade diagnóstica do melanoma cutâneo: uma observação no sul do Brasil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, [s.l.], v. 86, n. 2, p. 215-221, 2011.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. **Normativas do CONCEA para produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica: lei, decreto, portarias, resoluções normativas, orientações técnicas.** 2. ed. Brasília: Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, 2015a. 329 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. **Procedimentos para a manipulação de micro-organismos patogênicos e/ou recombinantes na FIOCRUZ**. Brasília: Ministério da Saúde, 2005. 220 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Vigilância em saúde: zoonoses**. Brasília: Ministério da Saúde, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Vigilância em saúde: zoonoses**. Brasília: Ministério da Saúde, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. **Classificação de risco dos agentes biológicos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 36 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. **Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS – CONITEC**. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas Doença de Chagas. Brasília: Ministério da Saúde, 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Doença de Chagas, 14 de abril – Dia Mundial. **Bol Epidemiol [Internet]**, v. 51, n. esp., p. 1-43, 2020. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/boletins-epidemiologicos>. Acesso em: 06 jun. 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar**. Brasília: Ministério da Saúde, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a coinfeção leishmania-HIV**. 1. ed. rev. e ampl. Brasília: Ministério da Saúde, 2015b. 109 p., il.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de Vigilância em Saúde**. Brasília: Ministério da Saúde, 2014. 812 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília: Ministério da Saúde, 2003. 120 p.

BRAY, F. *et al.* **Planning and developing populations-based cancer registration in low-and middle-income settings**. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2014. (IARC technical publication, n. 43). Disponível em: http://www.rho.org/files/IARC_Planning_developing_cancer_registries_2014.pdf. Acesso em: 20 set. 2019.

BRAY, F. *et al.*, Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries *CA Cancer J Clin.* 68(6), 394-424, 2018. doi: 10.3322/caac.21492.

BRENER, Z. **Terapêutica experimental na doença de Chagas: Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 379-388.

BROWN, A. *et al.* Blow fly *Lucilia sericata* nuclease digests DNA associated with wound slough/eschar and with *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. **Medical and Veterinary Entomology**, [s.l.], v. 26, n. 4, p. 432-439, 2012. DOI 10.1111/j.1365-2915.2012.01029.x.

BONATTO, S.R. 1996. Ciclo de Vida de *Sareonesia eh/orogaster* (Wiedemann) (Diptera, Calliphoridae, Toxotarsinae), criada sob condições de laboratório em dieta artificial. **Revta bras. Zool.** 13 (3): 685-706.

BULLINGTON, S. W. **Blowflies**: their life cycle and where to look for various stages. Disponível em: <http://www.forensic-ent.com>. Acesso em: 1 fev. 2013.

BURZA, S. *et al.* Five-year field results and long-term effectiveness of 20 mg/kg liposomal amphotericin B (Ambisome) for visceral leishmaniasis in Bihar, India. **PLoS Negl Trop Dis**, [s.l.], v. 8, n. 1, p. e2603, 2014.

CARBONELL, M. C. I. *et al.* Melanoma cutâneo: algunas consideraciones actuales. **Medisan**, [s.l.], v. 23, n. 1, p. 146, 2019.

CARVALHO, A. B.; GOLDENBERG, R. C. S.; CARVALHO, A. C. C. Cell therapies for Chagas disease. **Cytotherapy**, [s.l.], v. 19, n. 11, p. 1339-1349, 2017. DOI <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2017.07.014>.

CARVALHO, C. *et al.* Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect. **Curr Med Chem**, [s.l.], v. 16, n. 25, p. 3267-3285, 2019.

CARVALHO, C. J. B.; MELLO-PATIU, C. A. Key to the adults of the most common forensic species of Diptera in South America. **Revista Brasileira de Entomologia**, [s.l.], v. 52, n. 3, p. 390-406, 2008.

CARVALHO, C. J. B.; RIBEIRO, P. B. Chave de identificação das espécies de Calliphoridae (Diptera) do sul do Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, [s.l.], v. 9, p. 169-173, 2000.

CASTRO, E. Chagas' disease: lessons from routine donation testing. **Transfus. Med.**, [s.l.], v. 19, n. 1, p. 16-23, 2009.

CASTRO, E. **Composto ativador de procaspase-1 induz apoptose-like em Trypanosoma cruzi**. 2018. 53 p. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) – Instituto Carlos Chagas, Curitiba, PR, 2018.

CASTRO, N. J. C. **Estudo do microcultivo in vitro para o isolamento de Leishmania sp no Estado do Pará**. 2010. 72 p. Dissertação (Mestrado em doenças tropicais) – Universidade Federal do Pará, Belém, 2010.

ČEŘOVSKÝ, V. *et al.* Lucifensin, the long-sought antimicrobial factor of medicinal maggots of the blowfly *Lucilia sericata*. **Cell Mol Life Sci**, [s.l.], v. 67, p. 455-466, 2010.

ČEŘOVSKÝ, V.; BÉM, R. Lucifensins, the insect defensins of biomedical importance: the story behind maggot therapy. **Pharmaceuticals**, [s.l.], v. 7, n. 3, p. 251-264, 2014.

CERUTTI, P. H. P. *et al.* Métodos diagnósticos da Leishmaniose tegumentar americana: uma revisão de literatura. **Revista de Patologia do Tocantins**, [s.l.], v. 4, n. 4, p. 55-59, 2017.

CFF. Conselho Federal de Farmácia. **Pharmacia Brasileira**, [s.l.], ano 13, n. 90, maio 2018/dez. 2019. Disponível em: [http://www.cff.org.br/userfiles/mioloPB90bx\(1\).pdf](http://www.cff.org.br/userfiles/mioloPB90bx(1).pdf). Acesso em: 13 jun. 2020.

CHAGAS, C. R. J. Nova tripanosomiase humana: Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n.g., n.sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s.l.], v. 1, n. 2, p. 159-218, 1909.

CHAIWONG, T. *et al.* The blow fly, *Chrysomya megacephala*, and the house fly, *Musca domestica*, as mechanical vectors of pathogenic bacteria in Northeast Thailand. **Trop Biomed**, [s.l.], v. 31, n. 2, p. 336-346, 2014.

CHAMBERS, L. *et al.* Degradation of extracellular matrix components by defined proteinases from the greenbottle larva *Lucilia sericata* used for the clinical debridement of non-healing wounds. **British Journal of Dermatology**, [s.l.], v. 148, p. 14-23, 2003.

COLDITZ, L. G.; EISEMANN, C. H. The effect of immune and inflammatory mediators on growth of *Lucilia cuprina* larvae in vitro. **International Journal for Parasitology**, [s.l.], v. 24, n. 3, p. 401-403, 1994.

CORDEIRO, K. B. B. **Morfologia e desenvolvimento de imaturos de *Cochliomyia macellaria* (Fabricius) e de *Lucilia cuprina* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae)**. 2014. 89p. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

CORREIA, R. A. *et al.* Disfunção sexual após tratamento para o câncer do colo do útero. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, São Paulo, v. 54, 2020.

CORREIA, R. A. *et al.* Qualidade de vida após o tratamento do câncer do colo do útero. **Escola Anna Nery**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 4, 2018.

COSSETIN, L. F. *et al.* In vitro Safety and Efficacy of Lavender Essential Oil (Lamiaceae: Lamiaceae) as an Insecticide Against Houseflies (Diptera: Muscidae) and Blowflies (Diptera: Calliphoridae). **Journal of Economic Entomology**, [s.l.], v. 3, p. 1-9, 2018.

COUTINHO, R. B. A. *et al.* Leishmaniose Tegumentar Americana. In: BATISTA, R. S. *et al.* **Medicina Tropical: abordagem atual das doenças infecciosas e parasitárias**. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2001. 320p., p. 131-140.

CROSBY, T. *et al.* Systemic treatments for metastatic cutaneous melanoma. **Cochrane DB Systematic Reviews**, [s.l.], n. 2, CD001215, 2000.

CRUZ-SAAVEDRA, L. *et al.* The effect of *Lucilia sericata*- and *Sarconesiopsis magellanica*-derived larval therapy on *Leishmania panamensis*. **Acta Tropica**, [s.l.], v. 164, p. 280-289, 2016.

DÍAZ-ROA, A. *et al.* Sarconesin: *Sarconesiopsis magellanica* Blowfly Larval Excretions and Secretions with Antibacterial Properties. **Frontiers in Microbiology**, [s.l.], v. 9, p. 2249, 2018. DOI 10.3389/fmicb.2018.02249.

DE JONG, G. The influence of dispersal pattern on the evolution of fecundity. **Neth. J. Zool.**, 32: 1-30, 1982.

DNDi. Drugs for Neglected Diseases initiative. **Boletim Informativo da Plataforma Chagas**. Ago. 2019. Disponível em: <https://www.dndial.org/doencas/doenca-chagas/>. Acesso em: 20 mar. 2020.

- DÖLL-BOSCARDIN, P. M. *et al.* In Vitro Cytotoxic Potential of Essential Oils of *Eucalyptus benthamii* and Its Related Terpenes on Tumor Cell Lines. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, [s.l.], article ID 3426522012, 2012. DOI 10.1155/2012/342652.
- DOMINGUES, V. O. *et al.* In vitro evaluation of triazenes: DNA cleavage, antibacterial activity and cytotoxicity against acute myeloid leukemia cells. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [s.l.], v. 21, n. 12, p. 2226-2237, 2010.
- DUGASANI, S. *et al.* Comparative antioxidant and anti-inflammatory effects of [6]-gingerol, [8]-gingerol, [10]-gingerol and [6]-shogaol, **Journal Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 127 p. 515-520. 2010.
- EID, S. Y. *et al.* Natural Products Modulate the Multifactorial Multidrug Resistance of Cancer. **Pharmacology & Pharmacy**, [s.l.], v. 6, p. 146-176, 2015.
- EL SHAZELY, B. *et al.* Lucifensin II, a defensin of medicinal maggots of the blowfly *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae). **Journal of medical entomology**, [s.l.], v. 50, n. 3, p. 571-578, 2013. DOI 10.1603/ME12208.
- ENGELS, E. A. *et al.* Cancer risk in people infected with human immunodeficiency virus in the United States. **Int J Cancer**, [s.l.], v. 123, n. 1, p. 187-194, jul. 2008.
- ERDMANN, G. R.; KHALIL, S. K. W. Isolation and identification of two antibacterial agents produced by a strain of *Proteus mirabilis* isolated from larvae of the screwworm (*Cochliomyia hominivorax*) (Diptera: Calliphoridae). **Journal of Medical Entomology**, [s.l.], v. 23, n. 2, p. 208-211, 1986.
- FALCÃO, B. C. S. **Prevenção do câncer do colo de útero: conhecimento, atitude e prática das mulheres atendidas no ambulatório de um Centro de Assistência de Alta Complexidade em Oncologia.** 2022. 76 f. Dissertação (Mestrado em Enfermagem) – Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2022.
- FAURI, C. A. *et al.* A proteína p16 e o melanoma cutâneo. **Revista da AMRIGS**, [s.l.], v. 54, p. 81-91, 2010.
- FERLAY, J. *et al.* (ed.). **Cancer today**. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2018. (IARC CancerBase, n. 15). Disponível em: <https://publications.iarc.fr/Data/bases/Iarc-Cancerbases/Cancer-Today-Powered-By-GLOBOCAN-2018--2018>. Acesso em: 9 set. 2019.
- FERNANDES, N. C.; CALMON, R. Melanoma cutâneo: estudo prospectivo de 42 casos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, [s.l.], v. 86, n. 6, p. 1233-1235, 2011.
- FRAENKEL, G.; BHASKARAN, G. 1973. Pupariation and pupation in cyclorhaphousflies (Diptera): terminology and interpretation. **Annals of the Entomological Society of America** 66:418–422.
- FIOCRUZ. **Manual de Capacitação na Detecção de *Trypanosoma cruzi* para microscopistas de malária e laboratoristas da rede pública.** 2. ed. Rio de Janeiro: SCV/ICICT, 2013.

FRACASSO, M. *et al.* Effects of resveratrol on the differentiation fate of neural progenitor cells of mouse embryos infected with *Trypanosoma cruzi*. **Microbial Pathogenesis**, [s.l.], v. 132, p. 156-161, 2019. DOI <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.04.040>.

FRAYHA, G. J. *et al.* The mechanisms of action of antiprotozoal and anthelmintic drugs in man. **General Pharmacology**, [s.l.], v. 28, n. 2, p. 273-299, 1997.

FURINI, J. **Estratégias terapêuticas usando o ácido ursólico sobre infecções determinadas por tripanosomatídeos**. 2016. 145f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

GADGEEL, S. M.; RAMALINGAM, S. S.; KALEMKERIAN, G. P. Treatment of lung cancer. **Radiol Clin North Am**, [s.l.], v. 50, n. 5, p. 961-974, 2012.

GAMA, S. *et al.* Copper(II) complexes with tridentate pyrazole-based ligands: synthesis, characterization, DNA cleavage activity and cytotoxicity. **Journal of Inorganic Biochemistry**, [s.l.], v. 105, p. 637-644, 2011.

GARBIN, C. A. S. *et al.* Multiprofessional approach in the diagnosis of leishmaniasis: a case report. **Arch Health Invest**, [s.l.], v. 6, n. 8, p. 359-362, 2017.

GARZON, L. R. *et al.*, In vitro activity of larval secretions from *Lucilia cuprina* against *Leishmania amazonensis*, *Trypanosoma cruzi* and cell lines. **Brazilian Journal of Development**, 7,(8) 82837-82858, 2021.

GARZON, L. R. **Avaliação da atividade antibacteriana, citotóxica e nuclease química de complexos triazenidos de platina (II)**. 2015. 59 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2015.

GASSER, G.; OTT, I.; METZLER-NOLTE, N. Organometallic anticancer compounds. **Journal of Medical Chemistry**, [s.l.], v. 54, n. 1, p. 3-25, 2011.

GOODBROD, J.R.; GOFF, M.L. 1990. Efeitos de população de larvas e densidade em taxas de desenvolvimento e interações entre duas espécies de *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) em laboratório e cultura. **Diário. Entomologia Médica**, 27: 338-343

GOMES, C. M. *et al.* Complementary exams in the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, [s.l.], v. 89, n. 5, p. 701-711, 2014.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose Tegumentar Americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 36, n. 1, p. 71-80, 2003.

GREENBERG, B. **Flies and Disease. Ecology, Classification and Biotic Associations**. New Jersey: Princeton University Press, 1971. 856 p.

GRIMALDI, A. M. *et al.* Novel Approaches in Melanoma Prevention and Therapy. **Cancer Treatment and Research**, [s.l.], v. 159, p. 443-455, 2014.

GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, inflammation, and cancer. **Cell**, [s.l.], v. 140 p. 883-899, 2010.

- HALL, M. J. R. Forensic entomology. In: COX, M. *et al.* (ed.). **The Scientific Investigation of Mass Graves: towards protocols and standard operating procedures.** Cambridge: Cambridge University Press, 2014. p. 463-496.
- HAO, N. B. *et al.* Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors. **Clinical and Developmental Immunology**, [s.l.], 2012. DOI 10.1155/2012/948098.
- HASSAN, S. B. *et al.* Alpha terpineol: a potential anticancer agent which acts through suppressing NF-kappaB signalling. **Anticancer Res**, [s.l.], v. 30, n. 6, p. 1911-1919, 2010.
- HOENERHOFF, M. J. Inflammation and cancer: Partners in crime. **The Veterinary Journal**, [s.l.], v. 206, p. 1-2, 2015.
- HU, Z.; MA, D. The precision prevention and therapy of HPV-related cervical cancer: new concepts and clinical implications. **Cancer medicine**, [s.l.], v. 7, n. 10, p. 5217-5236, 2018.
- INCA. **Fases de desenvolvimento de um novo medicamento.** [S.l.]: INCA, 2018. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/pesquisa/ensaios-clinicos/fases-desenvolvimento-um-novo-medicamento>. Acesso em: 15 jun. 2020.
- INCA. Ministério da Saúde. **Estimativa de Câncer no Brasil.** [S.l.]: MS; INCA, 2020. (Coordenação de Prevenção e Vigilância; Divisão de Vigilância e Análise de Situação).
- JOHAN, C. L. F. **Avaliação do conhecimento dos proprietários de cães E/ou gatos sobre leishmaniose e georreferenciamento dos casos positivos atendidos no hospital veterinário universitário da UFSM.** Monografia. Programa de residência multiprofissional e em área profissional da saúde – medicina veterinária, 2021.
- KAUR, G.; VERMA, N. Nature curing cancer – review on structural modification studies with natural active compounds having anti-tumor efficiency. **Biotechnology Reports**, [s.l.], v. 6. p. 64-78. 2015.
- KERLIN, R. L.; EAST, I. J. Potent immunosuppression by secretory/excretory products of larvae from the sheep blowfly *Lucilia cuprina*. **Parasite Immunol.**, [s.l.], v. 14, n. 6, p. 595-604, 1992.
- KINOSHITA-YANAGA, A. T. *et al.* Accidental infection by *Trypanosoma cruzi* follow-up by the polymerase chain reaction: case report. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, São Paulo, v. 51, n. 5, p. 295-298, 2009. DOI <https://doi.org/10.1590/S0036-46652009000500011>.
- KOSMANN, C. **Calliphoridae (diptera): identificação, sinantropia e análise microbiológica.** 2013. 234f. Tese (Doutorado em Biologia Animal) – Universidade de Brasília, Brasília, 2013.
- LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETERS, W; KILLICK-KENDRICK, R. (ed.). **The Leishmaniasis in Biology and Medicine.** London: Academic Press, 1998. p. 1-119.
- LAVERDE-PAZ, M. J. *et al.* Evaluating the anti-leishmania activity of *Lucilia sericata* and *Sarconesiopsis magellanica* blowfly larval excretions/secretions in an in vitro model. **Acta Tropica**, [s.l.], v. 177, p. 44-50, 2018. DOI: 10.1016/j.2018.

LEATTE, E. P. *et al.* Aspectos epidemiológicos e laboratoriais da leishmaniose tegumentar americana em uma região endêmica do sul do Brasil. **Revista Uningá Review**, [s.l.], v. 19, n. 1, p. 19-23, 2014.

LIU, S. H. *et al.* Lotus leaf (*Nelumbo nucifera*) and its active constituents prevent inflammatory responses in macrophages via JNK/NF- κ B signaling pathway. **Am J Chin Med.**, [s.l.], v. 42, n. 4, p. 869-889, 2015.

LOURENÇO, A. P. **Genes codificadores dos peptídeos antimicrobianos e de outras proteínas envolvidas na resposta imune de *Apis mellifera***. 2008. 172 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008. DOI 10.11606/T.17.2008.tde-04042008-144240.

LOMNICKI, A. Population ecology of individuals. Princeton: **Princeton Press**, 233 pp, 1988.

MARCONDES, C.B. 2006. **Terapia larval**: de lesões de pele causadas por diabetes e outras doenças. 88 pp. Santa Catarina: Ed. UFSC.

MARTINS, G. **Calliphoridae (Insecta, Diptera) associados às fases de decomposição de carcaças de suínos (*Sus scrofa linnaeus*, 1758) em área de caatinga no estado da Paraíba**. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2013.

MEIRELES, C. B. *et al.* Atypical presentations of cutaneous leishmaniasis: A systematic review. **Acta Tropica**, [s.l.], v. 172, p. 240-254, ago. 2017.

MENEZES, C. A. S. *et al.* A resposta imunológica dos portadores da doença de Chagas. **Resposta Imune**, Livro online, Portal Doença de Chagas, Fiocruz, 2 jul. 2017. Disponível em: <http://chagas.fiocruz.br/resposta-imune/2017>. Acesso em: 28 jun 2020

MENEZES, D. S. **Efeito do dietilditiocarbamato de sódio isolado e em combinação com benzonidazol sobre *Trypanosoma cruzi*: nova estratégia para otimização da quimioterapia antiparasitária**. 2013. 118 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2013.

MONTEAGUDO, C. *et al.* Role of chemokines in melanoma progression. **Actas Dermo-Sifiliográficas**, [s.l.], v. 102, n. 7, p. 498-504, 2011.

MONTEIRO, S. G. **Parasitologia na Medicina Veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Roca, 2017.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, [s.l.], v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MUHARSINI, S. *et al.* Identification and characterization of the excreted/secreted serine proteases of larvae of the Old World Screwworm Fly, *Chrysomya bezziana*. **Int J Parasitol.**, [s.l.], v. 30, n. 6, p. 705-14, 2000.

MUMCUOGLU, K. Y. Clinical applications for maggots in wound care. **American Journal of Clinical Dermatology**, [s.l.], v. 2, n. 4, p. 219-227, 2001.

NEVES, A. P.; VARGAS, M. D. Complexos de Platina (II) na Terapia do Câncer. **Revista Virtual de Química**, [s.l.], v. 3, n. 3, p. 196-209, 2011.

NEVES, D. P. *et al.* **Parasitologia humana**. 12. ed. Rio de Janeiro: Atheneu. 2019.

NEVES, L. O. *et al.* A randomized clinical trial comparing meglumine antimoniate, pentamidine and amphotericin B for the treatment of cutaneous leishmaniasis by *Leishmania guyanensis*. **An Bras Dermatol**, Rio de Janeiro, v. 86, n. 6, p. 1092-1110, 2011.

Newman, DJ e Cragg, GM (2016) Produtos naturais como fontes de novas drogas de 1981 a 2014. **Journal of Natural Products**, 79, 629-661 <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b01055>

OLIVEIRA, L. G.; PUPO, M. T.; VIEIRA, P. C. Explorando produtos naturais microbianos nas fronteiras da química e da biologia. **Química Nova**, [s.l.], v. 36, n. 10, p. 1577-1586, 2013.

OMS. Organização Mundial de Saúde. **Chagas disease: control and elimination**. Report of the Secretariat; EB124/17. [S.l.]: OMS, 2008.

OMS. Organização Mundial de Saúde. Disponível em: Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. **Wkly Epidemiol Rec**, [s.l.], v. 90, n. 6, p. 33-44, 2015. Disponível em: <https://www.who.int/wer/2015/wer9006/en/>. Acesso em: 14 maio 2018.

OMS. Organização Mundial de Saúde. **Global distribution of cases of Chagas disease, based on official estimates, 2006-2010**. [S.l.]: OMS, 2013.

OPAS. Organização Pan Americana de Saúde; OMS. Organização Mundial de Saúde. **Estratégia e plano de ação para prevenção, controle e atenção à doença de Chagas**. [S.l.]: OPAS; OMS, 2010.

OPAS. Organização Panamericana de Saúde. **Manual de procedimientos para vigilancia y control de las leishmaniasis en las Américas**. Washington, D.C.: OPAS, 2019. ISBN 978-92-75-32063-1.

OPAS. Organización Panamericana de la Salud. **Leishmaniasis en las Américas: recomendaciones para el tratamiento**. Washington, D.C.: OPAS, 2013.

PESSANHA, R. R. **Prospecção de bioatividade de *Brevibacillus laterosporus* Laubach, 1916 sobre o desenvolvimento pós-embrionário de *Lucilia cuprina* (Wiedemann, 1830) (DIPTERA: CALLIPHORIDAE), em laboratório**. 2013. 53 f. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade e Saúde) – Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2013.

PIEGAS, P. Santa Maria registra 9 casos de leishmaniose neste ano. **Diário de santa Maria**, 14 fev. 2019. Disponível em: <https://diariosm.com.br/not%C3%ADcias/sa%C3%BAde/santa-maria-registra-9-casos-de-leishmaniose-neste-ano-1.2123663>. Acesso em: 12 nov. 2019.

PINTO, F. R. *et al.* Tratamento cirúrgico do carcinoma epidermoide da cavidade oral e orofaringe no Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP): perfil dos pacientes

tratados e resultados oncológicos iniciais. **Rev Bras Cir Cabeça Pescoço**, [s.l.], v. 41, n. 2, p. 53-57, 2014.

PINHEIRO, M.A. R. Q. **Uso da terapia larval** no tratamento de úlceras crônicas em pacientes diabéticos no Hospital Universitário Onofre Lopes- Natal, RN. 2014. 80f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2015.

POLAT, E. *et al.* Detection of anti-leishmanial effect of the *Lucilia sericata* larval secretions in vitro and in vivo on *Leishmania tropica*: First work. **Experimental Parasitology**, [s.l.], v. 132, n. 2, p. 129-134, oct. 2012.

POLONIO, T.; EFFERTH, T. Leishmaniasis: drug resistance and natural products. **International Journal of Molecular Medicine**, [s.l.], v. 22, n. 3, p. 277-286, 2008.

POORNIMA, P. *et al.* Doxorubicin induced apoptosis was potentiated by neferine in human lung adenocarcinoma, A549 cells. **Food Chem Toxicol**, [s.l.], v. 68, p. 87-98, 2014.

PORTO, B. C. Z. **Atividade ovicida elarvicida de óleos essenciais em *Sarconesia cholorogaster***. 2016. 56 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2016.

PRETE, P. E. Growth effects of *Phaenicia Sericata* larval extracts on fibroblasts: Mechanism for wound healing by maggot therapy. **Life Sciences**, [s.l.], v. 60, n. 8, p. 505-510, 1997.

PRETZEL, J. *et al.* Antiparasitic peptides. **Advances in biochemical engineering/biotechnology**, [s.l.], v. 135, p. 157-192, 2013.

PRIMO, W. Q. S. P.; SPECK, N. M. G.; ROTELI-MARTINS, C. M. Chamada para eliminar o câncer de colo de útero na próxima década com foco no Brasil. **Revista Femina**, [s.l.], v. 49, n. 1, p. 12-13, 2020.

RASSI Jr., A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **The Lancet**, [s.l.], v. 375, n. 9723, 1388-1402, 2010. DOI [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60061-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60061-X).

RASSI Jr., A.; RASSI, A.; REZENDE, J. M. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). **Infectious Disease Clinics of North America**, [s.l.], v. 26, p. 275-291, 2012.

RATCLIFFE, N. A. *et al.* Detection and preliminary physico-chemical properties of antimicrobial components in the native excretions/secretions of three species of *Chrysomya* (Diptera, Calliphoridae) in Brazil. **Acta tropica**, [s.l.], v. 147, p. 6-11, 2015.

REIMANN, M. M. **Infecção experimental de hamsters dourados (*Mesocricetus auratus*) por *Leishmania spp.***: vias oral e intragástrica. 2018. 85 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Parasitária) – Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2018.

REIS, S. F. *et al.* Variação em caracteres bionômicos em função de densidade larval em *Chrysomya megacephala* e *Chrysomya putoria* (Diptera: Calliphoridae). **Rev. Bras. Ent.**, 38: 33-34, 1994.

REIS, S. F. *et al.* Larval aggregation and competition for food in experimental populations of *Chrysomya putoria* (Wied.) and *Cochliomyia macellaria* (F.) (Diptera: Calliphoridae). **J. App. Entomol.**, 123: 485-489, 1999.

RIBEIRO, M. *et al.* Sexual transmission of *Trypanosoma cruzi* in murine model. **Experimental Parasitology**, [s.l.], v. 162, p. 1-6, 2016. DOI <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2015.12.017>.

RIDGE, C. A.; MCERLEAN, A. M.; GINSBERG, M. S. Epidemiology of lung cancer. **Semin Intervent Radiol**, [s.l.], v. 30, n. 2, p. 93-98, 2013.

ROCHA, D. S. *et al.* The European Medicines Agency review of vemurafenib (Zelboraf(R)) for the treatment of adult patients with BRAF V600 mutation-positive unresectable or metastatic melanoma: summary of the scientific assessment of the Committee for Medicinal Products for Human Use. **European journal of cancer**, [s.l.], v. 49, n. 7, p. 1654-1661, 2013.

ROCHA, V. **Qualidade de vida de pacientes submetidos ao transplante de células tronco hematopoiéticas no período de hospitalização**. 2014. 131f. Dissertação (Mestrado em Enfermagem) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

ROTTINI, M. M. *et al.* In vitro evaluation of (-) α -bisabolol as a promising agent against *Leishmania amazonensis*. **Experimental Parasitology**, [s.l.], v. 148, p. 66-72, jan. 2015.

ROZARIO, S. *et al.* Caracterização de mulheres com câncer cervical atendidas no Inca por tipo histológico. **Revista de Saúde Pública**, [s.l.], v. 53, n. 88, 2019.

SAADI, E. L. *et al.* On the sylvatic transmission of *T. cruzi*, the parasite causing Chagas disease: a view from an agent-based model. **Ecological Modelling**, [s.l.], v. 423, 2020. DOI 10.1016/j.ecolmodel.2020.109001.

SABUNCUOGLU, S. Antiapoptotic effect of aminoguanidine on doxorubicin-induced apoptosis. **Mol Cell Biochem**, [s.l.], v. 394, n. 1-2, p. 129-135, 2014.

SACKETT, D. *et al.* **Assessing the economic cost of endemic disease on the profitability of Australian beef cattle and sheep producers**. Final Report of Animal Health and Welfare Project 087. Sydney: Meat and Livestock Australian, 2006. p. 38-42.

SALEH, T. S.; CALIXTO, J. B.; MEDEIROS, Y. S. Effects of anti-inflammatory drugs upon nitrate and myeloperoxidase levels in the mouse pleurisy induced by carrageenan. **Peptides**, [s.l.], v. 20, n. 8, p. 949-956, 1999.

SAMPAIO, J. B. **O papel dos receptores TLR2 e TLR9 na leishmaniose tegumentar americana**. 2017. 41 f. Monografia (Bacharelado em Biomedicina) – Faculdade Maria Milza, Governador Mangabeira, BA, 2017.

SANEI-DEHKORDI, A. *et al.* Anti *Leishmania* activity of *Lucilia sericata* and *Calliphora vicina* maggots in laboratory models. **Experimental Parasitology**, [s.l.], v. 170, p. 59-65, 2016.

SANTANA, C. A. **Influência da via de transmissão do *Trypanosoma cruzi* na carga parasitária e produção de anticorpos específicos**. 2015. 95 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2015.

SANTANA, P. M. **Retardo do tratamento de mulheres com câncer de colo de útero.** 2016. 79 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2016.

SANTOS, A. G. A. *et al.* Insights of Leishmania (Viannia) braziliensis infection in golden hamster (Mesocricetus auratus) intestine. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [s.l.], v. 106, p. 1624-1632, oct. 2018. DOI 10.1016/j.biopha.2018.07.120.

SANTOS, R. V. C. **Estabelecimento de um modelo in vitro de metástase cerebral de melanoma para o estudo do nicho pré-metastático e de novas abordagens terapêuticas contra o melanoma.** 2019. 116 f. Tese (Doutorado em Inovação Terapêutica) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2019.

SHERMAN, R. A. Mechanisms of maggot-induced wound healing: what do we know, and where do we go from here?. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, [s.l.], v. 2014, n. 2, 2014.

SHRIKHANDE, S. S. *et al.* Evaluation of anti-metastatic potential of Cisplatin polymeric nanocarriers on B16F10 melanoma cells. **Saudi Pharmaceutical Journal**, [s.l.], v. 23, n. 4, p. 341- 351, 2015.

SILVA, B. O. *et al.* Genotoxicity induced by nerol, an essential oil present in citric plants using human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and HepG2/C3A cells as a model. **J. Toxicol. Environ. Health Part A**, [s.l.], v. 84, n. 12, p. 518-528, 2021. DOI 10.1080/15287394.2021.1902443.

SILVA, C. F. **Atividade de amidinas aromáticas sobre Trypanosoma cruzi: estudos in vitro e in vivo.** 2011. 119 p. Tese (Doutorado em Biologia Parasitária) – Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2011a.

SILVA, E. C. **Aspectos demográficos de Chrysomya albiceps (W.) (Diptera: Calliphoridae):** análise de sensibilidade dos fatores de mortalidade no estágio imaturo e parâmetros demográficos de adultos. 2013. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2013.

SILVA, F. H. G. **Novas abordagens na pesquisa de alvos terapêuticos frente à infecção por Trypanosoma cruzi.** 2016. Tese (Doutorado em Biologia Parasitária) – Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2016.

SILVA, G. V. **Ecologia populacional de Lucilia cuprina (Wiedemann, 1830) (Diptera, Calliphoridae):** aspecto do desenvolvimento em diferentes densidades larvais e seus efeitos sobre os adultos resultantes. 2011. 59 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2011b.

SILVA, R. N. **Leishmaniose visceral: Estudo da carga parasitária em cães submetidos a tratamento com Miltefosine (Hexadecilfosfocolina).** 2009. Dissertação (Mestrado em Ciência e Saúde) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2009.

SOUSA, A. O. **Transferência de DNA de Trypanosoma cruzi para retrotransposons line-1 de camundongos chagásicos tratados com nitroderivado benzonidazol.** 2012. 119 p. Tese (Doutorado em Patologia Molecular) – Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2012.

- SOUZA, A. L. **Produtos naturais e sua eficácia contra o Trypanosoma cruzi: uma abordagem teórica (2014-2018)**. 2019. 55 f. Monografia (Graduação em Farmácia) – Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2019.
- SOUZA, J. R. P.; ESPOSITO, M. C.; CARVALHO, F. S. Composição, abundância e riqueza de Calliphoridae (Diptera) das matas e clareiras com diferentes coberturas vegetais da Base de Extração Petrolífera, bacia do Rio Urucu, Coari, Amazonas. **Rev Bras Entomol**, [s.l.], v. 54, n. 2, p. 270-276, 2010.
- SOUZA, M. A. Leishmaniose Visceral Humana: do Diagnóstico ao Tratamento. **Rev. Cien. Saúde Nov. Esp.**, [s.l.], v. 10, n. 2, p. 61-9, 2012.
- STARK, T.; LIVAS, L.; KYPRIANOU, N. Inflammation in prostate cancer progression and therapeutic targeting. **The Translational Andrology and Urology**, [s.l.], v. 4 p. 455-463, 2015.
- STEVERDING, D. The history of leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, [s.l.], v. 10, n. 1, 2017. DOI 10.1186/s13071-017-2028-5.
- STOLL, S. N. **Avaliação da atividade biológica de um terpeno em linhagem de câncer de pulmão de pequenas células (A549)**. 2018. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde) – Universidade do Vale do Taquari, Lajeado, 2018. Disponível em: <https://univates.br/bdu/bitstream/10737/2012/1/2018StefaniStoll.pdf>. Acesso em: 24 out. 2022.
- SZARGIKI, R. *et al.* Comparison of serological and parasitological methods for cutaneous leishmaniasis diagnosis in the state of Paraná, Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, [s.l.], v. 13, n. 1, p. 47-52, fev. 2009.
- TACAR, O.; DASS, C. R. Doxorubicin-induced death in tumour cells and cardiomyocytes: is autophagy the key to improving future clinical outcomes? **Journal of J Pharm Pharmacol**, [s.l.], v. 65, n. 11, p. 1577-1589, 2013.
- TALLON, B. *et al.* Tendências da mortalidade por câncer de colo no Brasil em 5 anos (2012-2016). **Revista Debate em Saúde**, Rio de Janeiro, v. 44, n. 125, p. 362-371, abr./jun. 2020.
- TEH, C. H. *et al.* Determination of antibacterial activity and minimum inhibitory concentration of larval extract of fly via resazurin-based turbidometric assay. **BMC Microbiol**, [s.l.], v. 17, n. 36, 2017. DOI 10.1186/s12866-017-0936-3.
- TEIXEIRA, D. G. *et al.*, Caracterização bioquímica do produto de excreção/secreção de larvas de *Cochliomyia Hominivorax* (Diptera: *Calliphoridae*) **Ciênc. anim. bras.**, [s.l.], v. 17, n. 4, 2017. DOI 10.1590/1089-6891v17i437176.
- TEMPONE, A. G. *et al.* Natural products to anti-trypanosomal drugs: an overview of new drug prototypes for American trypanosomiasis. **Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 5, n. 3, p. 222-235, 2007.
- THOMAS, S. *et al.* The anti-microbial activity of maggot secretions: results of a preliminary study. **Journal of Tissue Viability**, [s.l.], v. 9, n. 4, p. 127-132, 1999.

TIZOTTI, M. K. et al. X-ray characterization and in vitro biological evaluation of 1-(4-amidophenyl)-3-(4-acetylphenyl)triazene and the gold(I) triazenide complex. **Inorgan Chim Acta**, n. 441, p. 78-85, 2016.

TUNES, L. G. **Estudo pré-clínico de complexos de ouro (Au) como metalofármacos antileishmania e antitumoral**. 2019. 125 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, 2019.

URBINA, J. A. *et al.* In vitro and in vivo activities of ravuconazole on *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. **International Journal of Antimicrobial Agents**, [s.l.], v. 21, p. 27-38, 2003b.

URBINA, J. A. *et al.* Parasitological cure of acute and chronic experimental Chagas disease using the long-acting experimental triazole TAK-187. Activity against drug-resistant *Trypanosoma cruzi* strains. **International Journal of Antimicrobial Agents**, [s.l.], v. 21, p. 39-48, 2003a.

VALACHOVÁ, I. *et al.* Expression of lucifensin in *Lucilia sericata* medicinal maggots in infected environments. **Cell and tissue research**, [s.l.], v. 353, n. 1, p. 165-171, 2013.

VANAERSCHOT, M. *et al.* Treatment failure in leishmaniasis: drug-resistance or another (epi-) phenotype?. **Expert review of anti-infective therapy**, [s.l.], v. 12, n. 8, p. 937-946, 2014.

VIANA, A. R. **Atividade biológica de *Vassobia breviflora* (Sendtn) Hunz. (Solanaceae), frente à células de B16Ff10 e modelo in vivo de melanoma**. 2018. 78f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde e da Vida) – Centro Universitário Franciscano, Santa Maria, RS, 2018.

VON ZUBEN, C. J. *et al.* Competição Larval em *Chrysomya megacephala* (F.) (Díptera, Calliphoridae): Efeitos De Diferentes Níveis De Agregação Larval Sobre Estimativas De Peso Fecundidade e Investimento Reprodutivo. **Rev. Brasil. Biol.**, 60(2): 195-203, 2000.

WALL, R. Ovine cutaneous myiasis: effect on production and control. **Vet Parasitol**, [s.l.], v. 189, p. 44-51, 2012.

WEN, X. *et al.* Deconvoluting the role of reactive oxygen species and autophagy in human diseases. **Free Radical Biology e Medicine**, [s.l.], v. 65, n. 6, p. 402-410, 2013.

WHO. World Health Organization. **Control of the leishmaniasis**: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. Geneva: Expert Committee on the Control of the Leishmaniasis & World Health Organization, mar. 2010.

WHO. World Health Organization. **Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases**: second WHO report in neglected tropical diseases. Geneva: World Health Organization, 2013.

WIEDEMANN, C.R.W., **Brasilianische Zweiflugler**. **Zoologisches Magazin** 1(3), 40-56, 1819.

WYLLIE, S.; CUNNINGHAM, M. L.; FAIRLAMB, A. H. Dual Action of Antimonial Drugs on Thiol Redox Metabolism in the Human Pathogen *Leishmania donovani*. **The Journal of**

Biological Chemistry, [s.l.], v. 279, n. 38, p. 39925-39932, 2004. DOI 10.1074/jbc.M405635200.

YANG, A. S.; CHAPMAN, P. B. The history and future of chemotherapy for melanoma. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, [s.l.], v. 23, n. 3, p. 583-597, 2009.

YANG, H.; SHI, G.; DOU, P. The tumor proteasome is a primary target for the natural anticancer compound withaferin a isolated from "indian winter cherry". **Molecular Pharmacology**, [s.l.], v. 71, p. 426-437, 2007.

YAP, T.; WORKMAN, P. Exploiting the Cancer Genome: Strategies for the Discovery and Clinical Development. **The Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, [s.l.], v. 52, p. 549-573, 2012.

YI, H. Y. *et al.* Insect Antimicrobial Peptides and Their Applications. **Appl Microbiol Biotechnol**, [s.l.], v. 98, n. 13, p. 5807-5822, jul. 2014. DOI 10.1007/s00253-014-5792-6.

ZEYREK, F. Y.; KORKMAZ, M.; ÖZBEL, Y. Serodiagnosis of anthroponotic cutaneous leishmaniasis (ACL) caused by *Leishmania tropica* in Sanliurfa Province, Turkey, where ACL Is highly endemic. **Clin Vaccine Immunol**, [s.l.], v. 14, n. 11, p. 1409-1415, 2007.

ZHANG, L. *et al.* Apoptotic and autophagic pathways with relevant small-molecule compounds, in cancer stem cells. **Cell Proliferation**, [s.l.], v. 48, n. 4, p. 385-397, 2015.

ZHANG, Y.; CHEN, T. Targeting nanomaterials: future drugs for cancer chemotherapy. **International Journal of Nanomedicine**, [s.l.], v. 7, p. 5283-5286, 2012.

ZHAO, Y. *et al.* Unravelling the relationship between macroautophagy and mitochondrial ROS in cancer therapy. **Apoptosis**, [s.l.], v. 21, n. 5, p. 517-531, 2016.

ZHENG, D. *et al.* MicroRNA-299-3p promotes the sensibility of lung cancer to doxorubicin through directly targeting ABCE1. **Int J Clin Exp Pathol**, [s.l.], v. 8, n. 9, p. 10072-10081, 2015.

ZHUANG, C. *et al.* Chalcone: A Privileged Structure in Medicinal Chemistry. **Chem. Rev.**, [s.l.], v. 117, p. 7762-7810, 2017. DOI 10.1021/acs.chemrev.7b00020.