

Bioprospecção de peptídeos antimicrobianos em larvas de Calliphoridae (Diptera): uma revisão sobre metodologias de extração, purificação e detecção

Bioprospection of antimicrobial peptides in Calliphoridae (Diptera) maggots: a review on extraction, purification and detection methodologies

Ronaldo Roberto Tait Caleffe, Stefany Rodrigues de Oliveira, Julio Cesar Polonio, Bruno Vinicius Daquila, Maria Claudia Colla Ruvolo Takasusuki, João Alencar Pamphile, Helio Conte, Eduardo Cesar Meurer

Como citar este artigo:

CALEFFE, RONALDO ROBERTO T.; DE OLIVEIRA, STEFANY R.; POLONIO, JULIO CESAR; DAQUILA, BRUNO VINICIUS; TAKASUSUKI, MARIA CLAUDIA C. R.; PAMPHILE, JOÃO A.; CONTE, HELIO; MEURER, EDUARDO CESAR; Bioprospecção de peptídeos antimicrobianos em larvas de Calliphoridae (Diptera): uma revisão sobre metodologias de extração, purificação e detecção. *Revista Saúde (Sta. Maria)*. 2021; 47 (1).

Autor correspondente:

Nome: Ronaldo Roberto Tait Caleffe
E-mail: ronaldo_caleffe@hotmail.com
Telefone: (44) 3011-4466
Formação Profissional: Biotecnólogo, Mestre em Biotecnologia Ambiental e Doutorando em Biotecnologia Ambiental.

Filiação Institucional: Universidade Estadual de Maringá
Endereço para correspondência: Rua: Av. Colombo, 5790. Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular, Universidade Estadual de Maringá, Brasil.
Bairro: Zona 7
Cidade: Maringá
Estado: Paraná
CEP: 87020-900

Data de Submissão:
06/08/2020

Data de aceite:
22/01/2021

Conflito de Interesse: Não há conflito de interesse



RESUMO

Os insetos apresentam a maior biodiversidade entre a classe Animal e são fontes ricas de produtos biotecnológicos. Espécies da família Calliphoridae (Diptera) apresentam hábitos necrófagos durante a fase larval, assim são expostas a diferentes microrganismos, produzindo peptídeos antimicrobianos (AMPs) como sistema de defesa. O objetivo deste trabalho foi realizar um levantamento bibliográfico dos principais peptídeos antimicrobianos identificados em Calliphoridae (Diptera), fornecendo dados para a bioprospecção de novos compostos. A revisão bibliográfica foi realizada nas plataformas: Google Acadêmico e *SciFinder* e foram selecionados 56 artigos para o desenvolvimento deste trabalho. Os AMPs possuem atividade contra amplo espectro de bactérias gram-positivas e gram-negativas, por isso apresentam grande interesse para tratamentos de feridas (e.g.: Terapia Larval) e bioprospecção de novos antibióticos. Estas moléculas são obtidas a partir do produto de excreção e secreção das larvas de Calliphoridae e sua ação tem como alvo primário a membrana celular das bactérias, devido interações eletrostáticas e interações de van der Waals com a membrana lipídica. A utilização de técnicas de separação acopladas com espectrometria de massas permitiu a identificação e caracterização de peptídeos da classe Defensina em diferentes espécies de califorídeos. A bioprospecção de novas moléculas antimicrobianas em moscas é uma área promissora dentro da biotecnologia, devido ao aumento do número de bactérias resistentes aos antibióticos atuais.

PALAVRAS-CHAVE: Defensinas; Peptídeos Catiônicos Antimicrobianos; Espectrometria de Massas por Ionização por Electrospray.

ABSTRACT

Insects demonstrate highest biodiversity between Animal and are source of biotechnology products. Species of Calliphoridae (Diptera) are necrophagous in larval stage, therefore exposed to different microorganisms, leading to a defense system based on antimicrobial peptides (AMP's). The objective of the work was performed a bibliographic review of main antimicrobial peptides identified in Calliphoridae (Diptera), supplying data to bioprospection of new molecules. The review was performed in the databases: Scholar Google and *SciFinder*, selecting 56 research articles. The AMP's have activity against a broad spectrum of bacterium gram-positive and negative, thus present an important role in maggot therapy and bioprospection of novel antibiotics. These molecules are obtained from excretion and secretion of maggots and its action have primary target the cell membrane of bacterium. The mechanism involves electrostatic interaction and van der Waals interaction with lipidic membrane. The utilization of separation techniques in addition with mass spectrometry allows the identification and characterization of Defensin peptides in Calliphoridae. The bioprospection of novel antimicrobial molecules of blowflies are promising area of biotechnology, since the increase of resistant antibiotic bacterium.

KEYWORDS: Defensins; Antimicrobial Cationic Peptides; Spectrometry, Mass, Electrospray Ionization.

INTRODUÇÃO

A terapia larval (TL) consiste na aplicação de larvas esterilizadas de moscas (Diptera: Calliphoridae) em ferimentos para auxiliar o debridamento, desinfecção e cicatrização. A espécie mais utilizada para a terapia é a *Lucilia sericata*, entretanto outras espécies são estudadas como alternativas¹. O processo de desinfecção ocorre devido a ingestão das bactérias e conseqüentemente sua morte no sistema digestório², além da atividade antimicrobiana da secreção extracorpórea^{3,4}.

Estudos focam na extração do produto de secreção e excreção (ES) das larvas e testes *in vitro* contra diferentes bactérias^{5,6,7,8}. Os resultados indicam que as moléculas são mais ativas contra bactérias gram-positivas do que as gram-negativas⁹. Pesquisadores¹⁰ demonstraram que a exposição das larvas à ambiente contaminado modula a atividade antimicrobiana positivamente. Entre as moléculas identificadas se destaca um peptídeo da classe *Defensin*, com 40 aminoácidos, denominado *Lucifensin*¹¹. Este peptídeo é mais expresso no corpo gorduroso de larvas expostas a ambiente contaminado, entretanto a glândula salivar o produz continuamente em ambientes contaminados e estéreis¹².

A atividade antimicrobiana de larvas também foi observada contra biofilmes, uma forma de resistência bacteriana à fatores bióticos e abióticos. O biofilme é uma comunidade de uma ou mais espécies bacterianas, situadas em uma matriz polimérica protetiva e aderida a uma superfície¹³. Em feridas crônicas, o biofilme causa sérios problemas devido ao seu potencial de promover a resistência sistêmica bacteriana contra agentes antimicrobianos e, conseqüentemente, dificulta o tratamento. Desta forma, a TL é apontada como uma alternativa para dissolver e inibir sua formação¹⁴. Estudos demonstraram atividade do ES contra biofilme de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*^{15,16}.

A identificação das moléculas que possuem atividade antimicrobiana é importante para compreensão do modo de ação da TL, assim como para o desenvolvimento de produtos biotecnológicos¹⁷. Dentre estas moléculas, os peptídeos antimicrobianos (AMPs) tem grande destaque. São componentes multifuncionais do sistema imune dos insetos, apresentando subgrupos de acordo com a composição dos aminoácidos: (a) *Cecropicin*, (b) *Defensin* e (c) peptídeos com a presença de resíduos de prolina e/ou glicina. Os AMPs possuem atividade contra um amplo espectro antibacteriano, antifúngico e antiviral, com promissora capacidade terapêutica e profilática¹⁸.

A família Calliphoridae (Diptera) apresenta aproximadamente 1500 espécies, abrangendo cerca de 150 gêneros, com distribuição mundial, sendo registradas mais de 130 espécies na região Neotropical¹⁹. A caracterização de moléculas provenientes destes insetos ainda é restrita a poucas espécies, e desta forma a bioprospecção de novas espécies é uma área promissora para a biotecnologia. A espectrometria de massas (MS) é uma técnica analítica que analisa relação massa/carga (m/z) de íons e permite a identificação de biomoléculas, como os AMP's²⁰.

O objetivo deste trabalho foi realizar um levantamento bibliográfico dos principais peptídeos antimicrobianos identificados em Calliphoridae (Diptera), em relação a sua extração, purificação e detecção, além de fornecer dados para

a bioprospecção de novos compostos.

MÉTODO

A revisão bibliográfica foi realizada nas plataformas: Google Acadêmico (138) e *SciFinder* utilizando as combinações de palavras: AMP's, Calliphoridae, *mass spectrometry* (espectrometria de massas), *antimicrobial peptides* (peptídeos antimicrobianos). A busca inicial, sem uma filtragem de período de publicação, resultou em 138 documentos na qual foram delimitados àqueles redigidos em língua inglesa para uma segunda etapa de busca e seleção. Após a análise dos artigos por meio das informações contidas nos seus respectivos títulos e resumos, 56 documentos atendiam a delimitação do tema e abordavam sobre metodologias de extração, purificação e detecção de peptídeos em Calliphoridae.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Terapia Larval (TL)

Os insetos apresentam a maior biodiversidade entre a classe Animal, representando aproximadamente 70% das espécies conhecidas²¹ e estima-se que existam cerca de 5-6 milhões de espécies²². Insetos podem ser encontrados em diferentes condições, portanto são os mais bem sucedidos colonizadores terrestres. Devido a sua biodiversidade e resiliência, apresentam uma fonte rica em moléculas com potencial medicinal e/ou biotecnológico. A TL consiste na aplicação de larvas estéreis produzidas em laboratório para o tratamento de feridas crônicas¹. Historicamente, a TL obteve reconhecimento durante a Primeira Guerra Mundial, onde utilizavam as larvas para tratar osteomielites e feridas gangrenadas em soldados²³. Após a descoberta da penicilina, a técnica foi pouco utilizada e só retornou a aparecer no final da década de 1980, devido à resistência de bactérias aos antibióticos. Atualmente as larvas são produzidas e comercializadas para diversos hospitais e centros especializados em diferentes continentes¹⁷.

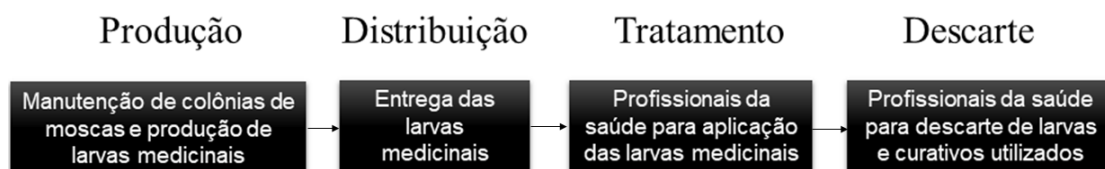
Os resultados da aplicação das larvas incluem, (a) remoção do tecido necrótico (debridamento); (b) eliminação de bactérias (desinfecção); e (c) cicatrização. O mecanismo de desinfecção envolve tanto a ingestão das bactérias e eliminação no intestino, como a ação antimicrobiana do produto de secreção e excreção (ES) no ferimento. O grande interesse pela TL é resultado da eficiência do processo, incluindo a eliminação de bactérias resistentes¹. Além disso, a identificação e caracterização de moléculas antimicrobianas é uma área biotecnológica promissora, uma vez que a utilização das larvas pode ser substituída por estas moléculas produzidas sinteticamente ou por meio de técnicas de engenharia genética.

Apesar da TL ser reconhecida como um processo eficiente de cicatrização, o entendimento dos processos celulares e moleculares ainda são desconhecidos. Os microRNAs (miRNAs) são importantes reguladores de vários processos fisiológicos, devido a característica de induzir respostas celulares. Wang et al.²⁴ demonstraram que o

proangiogênico cluster de miRNA, miR-17-92, obteve uma regulação positiva em pacientes que realizaram a TL. Estes dados sugerem que a TL promove a regulação da angiogênese, onde o miR-18a/19a tem como alvo direto o gene para Trombospondina 1 (TSP-1), servindo como base de futuros estudos em novas terapias e melhorias em tratamentos de glicemia, inflamações e revascularização. Em 2016, um robusto estudo²⁵ utilizou *L. sericata* transgênica, induzindo a expressão e produção do fator de crescimento humano derivado de plaquetas PDGF-BB pela larva. Este sistema tem o potencial de ser utilizado para entregar uma variedade de fatores de crescimento e peptídeos antimicrobiano no ferimento com o objetivo de aprimorar a cicatrização.

Outro fator a ser considerado é a cadeia de produção. Existem poucos fabricantes comerciais de larvas para a TL no mundo. O crescimento desta técnica é limitado devido a barreiras técnicas e sociais. A aplicação de larvas depende da liberação de ministérios da saúde dos diversos países²⁶. Na literatura existem diversos estudos^{23,64,65} relacionados a esterilização de ovos, desenvolvimento de dietas e ciclo de vida das moscas, entretanto são relacionados a entomologia forense, dificultando o conhecimento do processo, em suas peculiaridades, para a área médica. Outros pontos são a distribuição, na qual podem ser seguidas metodologias de vacinas, sangue e espécies patológicas; e a aceitação de pacientes e órgãos regulamentadores²⁶ (Fig.1).

Figura 1. Cadeia de produção simplificada para Terapia Larval. Adaptado²⁶.



Anatomia larval

A família Calliphoridae apresenta desenvolvimento holometábolo e hábitos necrófagos, assim as larvas estão expostas a diversas contaminações por microrganismos, e desta forma apresentam mecanismos de defesa às infecções. O corpo da larva contém glândulas salivares, papo, intestino, túbulos de Malpighi, corpo gorduroso, gânglios nervosos e traqueias. A massa corpórea de uma larva aumenta cerca de 100 vezes em 72h após a eclosão.

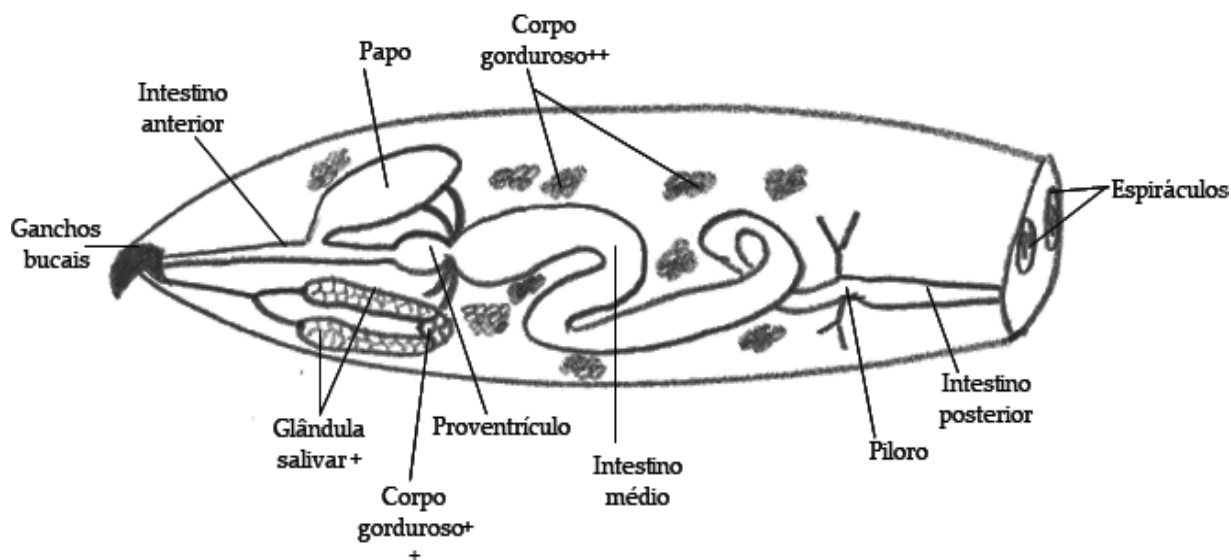
O par de ganchos bucais, facilitam o movimento e a quebra dos tecidos simplificando a ação de enzimas digestivas²⁷. A digestão realizada é extracorpórea, secretando diversas enzimas digestivas, como proteases, liquefazendo os tecidos para subsequente ingestão^{28,29}. A maioria destas enzimas são produzidas nas glândulas salivares, sendo um importante alvo para estudos³⁰. O papo serve para armazenamento de alimento, que será utilizado no processo de pupação. O tecido pré-digerido passa pelo proventrículo antes de alcançar o intestino médio³¹. O alimento então é

novamente digerido pelas enzimas do intestino, e bactérias provenientes do tecido ingerido são eliminadas e os nutrientes absorvidos pelas paredes do intestino, assim passando para a hemolinfa.

A conexão entre o intestino médio e posterior é realizada por túbulos de Malpighi. Estas células funcionam como filtro do produto de excreção da hemolinfa e mantém a pressão osmótica. A excreção é novamente processada no intestino posterior e se mistura com o alimento parcialmente digerido proveniente do intestino médio. Assim o intestino posterior realiza o processo final de quebra da excreção e nutrição antes do produto ser excretado pelo ânus. O corpo gorduroso não participa diretamente do processo de digestão, mas reveste outros órgãos e está presente na hemolinfa. Sua função é metabólica, como armazenamento de energia em forma de glicogênio e lipídeos e participa diretamente na defesa imune do inseto, produzindo rapidamente peptídeos antimicrobianos³². Os gânglios nervosos estão localizados na cabeça, representando o centro nervoso das larvas.

O sistema de traqueias se apresenta em toda a larva, fornecendo oxigênio diretamente para os tecidos, e a troca de ar é realizada por dois espiráculos posteriores. Desta forma o conhecimento da anatomia larval fornece valiosas informações para sua utilização biotecnológica, pelo conhecimento dos seus mecanismos de eliminação de microrganismos tanto, interna como externamente²⁷ (Fig. 2).

Figura 2. Esquemática da anatomia larval de Calliphoridae (Diptera).



+ Produção de peptídeos antimicrobianos continuamente; ++ Produção de peptídeos antimicrobianos induzida. (Fonte: autor)

Peptídeos antimicrobianos (AMPs)

Os peptídeos antimicrobianos (AMPs) são moléculas presentes no sistema imune de organismos procariotos e eucariotos. Normalmente, consistem em moléculas de 12 a 50 aminoácidos, os quais podem sofrer substituições e assim

formar diversos subgrupos. A maior parte dos aminoácidos apresentam caráter hidrofóbico e sua estrutura secundária pode assumir 4 conformações, (a) α -hélice devido a presença de conformação *coiled*; (b) β - *stranded*; (c) β -*hairpin* ou *loop*; (d) conformação estendida¹⁸ (Tab. 1).

Tabela 1. Lista de peptídeos antimicrobianos baseado em características estruturais. Adaptado³³.

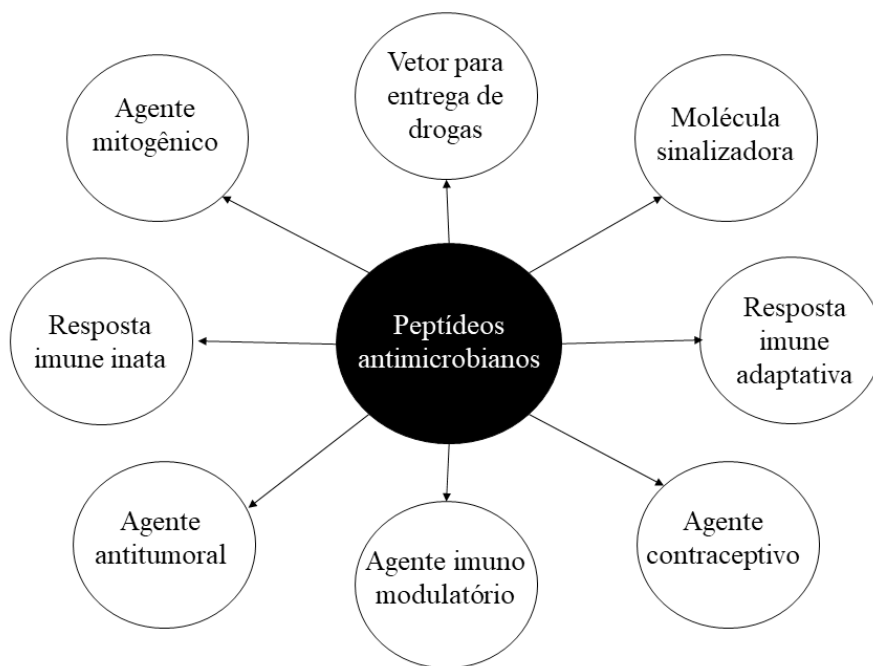
Classe de AMP	Característica estrutural	Peptídeo representativo	Estrutura
	Peptídeos formando estrutura de α hélice	<i>Cecropins</i>	α Hélice
	Ponte dissulfeto simples	<i>Thanatin</i>	Folha β
	Ponte dissulfeto dupla	<i>Tachyplesin II</i>	Folha β
	Ponte dissulfeto tripla	<i>Panaeidins</i>	Folha β
Peptídeos catiônicos	Mais de três pontes dissulfeto	<i>Drosomycin</i>	Estrutura α β
	Peptídeos ricos em prolina	<i>Pyrrhocoricin</i>	Estrutura α β
	Peptídeos ricos em glicina	<i>Diptericins</i>	-
	Peptídeos ricos em histidina	<i>Histatin</i>	Rico em H
	Peptídeos ricos em triptofano	<i>Indolicidin</i>	Estendida
	Moléculas derivadas de neuropeptídeos	<i>Secretolytin</i>	α Hélice
Peptídeos não catiônicos	Peptídeos ricos em ácido aspártico	<i>Dermcidin</i>	-
	Proteínas ligadas à oxigênio	<i>Lactoferricin</i>	Volta β

Os AMPs apresentam promissora aplicação terapêutica e profilática, devido a sua ampla ação contra bactérias, fungos e vírus, além de propriedades anticâncer (ex.: Aurein). Estas moléculas causam a quebra física da membrana celular das bactérias, sendo a membrana o alvo primário dos AMPs. Devido ao seu modo de ação, terapias combinadas com antibióticos se demonstram promissoras, facilitando os fármacos entrarem no citoplasma dos micro-organismos¹⁸.

O contato primário dos AMPs com as bactérias ocorre devido a interações hidrofóbicas e eletrostáticas, as quais dependem da composição lipídica da membrana. Esta interação altera a permeabilidade da membrana e afeta o balanço da pressão osmótica. Outros modos de ação dos peptídeos incluem desbalanço com enzimas intracelulares e DNA. As conformações secundárias, as quais os AMPs assumem, estão relacionadas com sua atividade na membrana celular. As

β e α -hélice contém ligações dissulfeto entre as cisteínas que estabilizam a estrutura e auxiliam a atravessar a membrana. A composição da carga, hidrofobicidade e tamanho do peptídeo são os principais fatores da ação antimicrobiana¹⁸ (Fig. 3).

Figura 3. Representação esquemática das multifuncionalidades de peptídeos antimicrobianos. Adaptado³³.



AMPs de Insetos

Os AMPs de insetos podem ser divididos em 3 grupos de acordo com sua sequência de aminoácidos e estrutura, (a) *Cecropicin*, peptídeos lineares com α -hélice e a ausência de resíduos de cisteína; (b) *Defensin* com 6-8 resíduos de cisteína conservados e estabilizados com pontes dissulfeto, apresentando 3 domínios que consistem em um loop flexível na região amino-terminal; e (c) peptídeos com a presença de resíduos de prolina e/ou glicina¹⁸.

Defensin é um grupo de peptídeos com 18-45 aminoácidos contendo 6-8 resíduos de cisteína conservados, geralmente catiônicos e ricos em arginina. A maior parte das *Defensin* em insetos apresentam de 29-34 aminoácidos, estabilizados por 3 pontes dissulfeto e com conformação β -hairpin. Estas moléculas se ligam com a membrana celular ou formam poros para o efluxo de íons e nutrientes¹⁸.

Testes realizados em *L. sericata* utilizando hibridização do RNAm para a *Defensin Lucifensin* demonstraram que este peptídeo é produzido constantemente nos órgãos larvais que estão diretamente expostos à ambiente contaminado (e.g.: glândula salivar). Entretanto, órgãos que estão indiretamente ligados (e.g.: corpo gorduroso), só produzem esta molécula quando expostos aos microrganismos. Apesar da atividade contra bactérias gram-positivas e negativas, as *Defensins* são mais efetivas contra as gram-positivas, incluindo bactérias resistentes a antibióticos (e.g.: *Staphylococcus*

aureus)¹⁷.

Cecropin apresenta um grupo de peptídeos de cerca de 35 resíduos de aminoácidos com atividade antibacteriana para espécies gram-positivas e negativas, isolados de diversos lepidópteros e dípteros, constituindo a maior parte da imunidade *cell-free* dos insetos^{34,35}. A ação envolve a lise da membrana celular bacteriana e inibição da captação de prolina e vazamento das membranas^{36,37}. As *Cecropin A* são estabilizadas por estruturas α -hélice, e apesar de não estar elucidado o modo de ação, evidências indicam a membrana celular como alvo³⁸. O desequilíbrio dos íons regulada pela *Cecropin* induz a atividade apoptótica. A molécula pode reduzir o nível de NADPH e glutathione induzindo o estresse oxidativo formando espécies reativas de oxigênio^{39,40}.

A *Cecropin B* é um peptídeo catiônico linear de 35 aminoácidos, apresentando a maior atividade antibacteriana do grupo⁴¹. Este peptídeo também atua atenuando a motilidade do nematódeo *Brugia pahang* e apresenta atividade antifúngica contra *Candida albicans*^{42,43}. A *Cecropin C* é considerada um precursor ou um produto de degradação da *Cecropin A*, tendo sua atividade antibacteriana pouco descrita na literatura. *Cecropin D* apresenta homologia com a A e B, e uma molécula recombinante foi expressa na levedura *Pichia pastoris* demonstrando atividade contra bactérias gram-positivas e negativas. Uma das características que fazem ter esta ação é um resíduo de lisina C-terminal ativada por fosforilação^{34,44,45}.

Cecropin P1 forma a estrutura de α -hélice com a região C-terminal (Lys-Gly29) em lipopolissacarídeos da membrana externa de bactérias gram-negativas. Entre as espécies com sensibilidade estão *E. coli* e o fungo *C. albicans*, além de inibir partículas virais e atenuar a apoptose induzida por vírus^{46,47}. *Lucilin*, uma *Cecropin* de 36 resíduos de aminoácidos, foi identificada sua seqüência parcial no genoma de *L. sericata*. A proteína modificada GWLK-*Lucilin*-CPD-His8 demonstrou ação contra a bactéria multirresistente *E. coli*^{48,49}.

Entre os peptídeos ricos em glicina estão as *Attacins* e *Diptericins*. *Attacins* atuam bloqueando a síntese de proteínas da membrana externa de bactérias gram-negativas, causando o desequilíbrio da integridade da parede celular⁵⁰. As *Diptericins* apresentam cerca de 8 kDa e 82 aminoácidos, com ação contra bactérias gram-negativas. O alvo destas moléculas é a membrana citoplasmática das bactérias^{51,52}.

Entre os peptídeos ricos em prolina se destacam *Lebocin*, *Drosocin*, *Metchnikowin* e *Pyrrhocoricin*. *Lebocin* apresentam cerca de 32 aminoácidos e além de ricos em prolina, são peptídeos O-glicosilados e 41% similar a *Abaecin*, peptídeo antibacteriano presente em *Apis mellifera*. *Drosocin* apresenta 19 aminoácidos e a modificação O-glicosilado é necessária para a atividade biológica. A glicosilação é uma importante modificação pós-traducional nos peptídeos ricos em prolina, fazendo com que tenha ação contra *E. coli* e fungos^{53,54,55}.

Metchnikowin é um peptídeo linear com 26 resíduos de aminoácidos e ricos em prolina. Sua ação é contra bactérias gram-positivas e fungos. Nos fungos sua ação envolve a interação com a enzima $\beta(1,3)$ -glucanosiltransferase

Gel1 (FgBGT). Outro alvo é a subunidade (SdhB) da coenzima succinato Q redutase⁵⁶.

A *pyrrhocorin* é um AMP rico em prolina com 20 aminoácidos, o qual interage com a proteína *heat shock* DnaK. O peptídeo se liga e promove a atividade da ATPase da chaperona DnaK. Além disso pode agir como veículo de entrega por meio da membrana celular de parasitas^{57,58,59}.

Métodos de extração, purificação e detecção do ES

Com objetivo de extrair, caracterizar e testar os AMPs, diversas metodologias de extração do ES de larvas de Calliphoridae foram desenvolvidas. Em todas as metodologias o primeiro passo é criar as larvas até o final do segundo instar/início do terceiro instar (o tempo varia de acordo com a espécie), fase onde ocorre a maior produção de ES. A dieta onde os insetos se alimentam varia entre as espécies, entretanto a preferência é por substratos que se assemelham ao natural (e.g.: fígado bovino), ao invés de dietas artificiais que contém substâncias antimicrobianas^{60,11,61}.

Durante o desenvolvimento dos imaturos, normalmente são divididos dois grupos, os insetos que são mantidos em condições estéreis e àqueles que são expostos a bactérias¹⁰. Para atingir a condição de esterilidade, os ovos são tratados com diversas substâncias, incluindo hipoclorito de sódio à 0.5%, lisol à 3% e cloreto de mercúrio à 0.4% (Tab. 2).

Tabela 2. Comparação de diferentes métodos de esterilização dos ovos de Calliphoridae (Diptera).

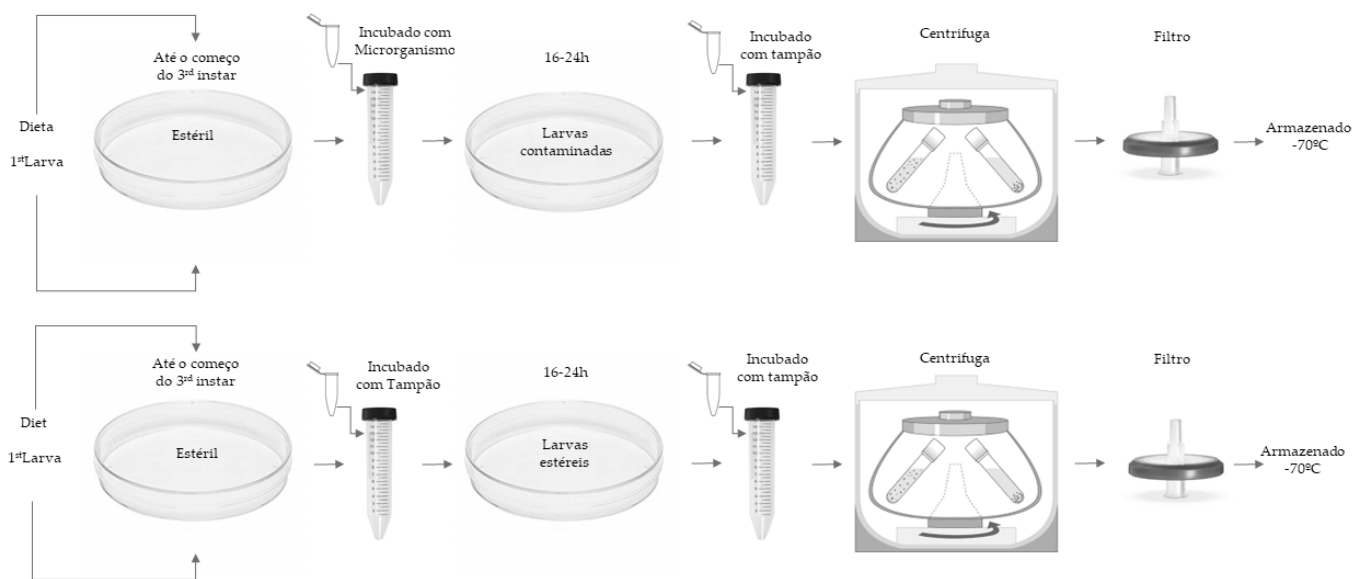
Espécie	Solução de esterilização	Tempo	Referência
<i>Lucilia sericata</i>	3% lisol	10min	62
	Biclorido de mercúrio 1:1.000/álcool etílico 25%/ácido hidrocloreto 0,5%	30min	23
	0,4% cloreto de mercúrio	10min	63
<i>Chrysomya megacephala</i>	0,5% NaClO	1min	64
<i>Chrysomya putoria</i>	0,5% NaClO	1min	64
	2% glutaraldeido	15min	65
<i>Cochliomyia macellaria</i>	0,5% NaClO	1min	64
<i>Phormia regina</i>	Biclorido de mercúrio 1:1.000/álcool etílico 25%/ácido hidrocloreto 0,5%	30min	23
<i>Chrysomya rufifacies</i>	0,4% Cloreto de mercúrio	10min	63
<i>Lucilia cuprina</i>	0,4% Cloreto de mercúrio	10min	63

Já para exposição a bactérias duas metodologias podem ser sugeridas: (a) injetar na hemolinfa os micro-organismos, com auxílio de microagulhas; e, (b) mergulhar as larvas em solução contendo os micro-organismos. A

injeção, apesar de apresentar resultados positivos, não se assemelha as condições existentes durante a TL, além de ser um processo mais laborioso. Já a opção (b), mimetiza a exposição sofrida pelos insetos nas condições da terapia. As larvas são mergulhadas em solução contendo concentrações padronizadas das bactérias por determinado período (e.g.: 30min) devolvidas para dieta e mantidas por 16h-24h expostas a contaminação¹⁰.

Após o período de incubação com as bactérias, as larvas são transferidas para tubos contendo um tampão (e.g.: PBS) ou água ultrapura e mantidos por 1h no escuro à 35°C. Assim o líquido é retirado e centrifugado 10.000g-20.000g por 5min-15min à 4°C. O sobrenadante então é esterilizado utilizando filtros 0.22µm ou 0.45µm (Fig. 4)^{10,11,60}.

Figura 4. Método geral de extração do produto de excreção e secreção (ES) de larvas de Calliphoridae (Diptera).



(Fonte: autor)

Diversos pesquisadores tiveram como objetivo detectar AMPs no ES de larvas de Calliphoridae e determinar sua estrutura primária. O uso de técnicas de separação como a cromatografia líquida de alta performance (HPLC) foi de grande importância para a purificação e descoberta destes peptídeos. As características, descritas anteriormente para estas moléculas, se adequam a misturas de solvente acetonitrila/água/ácido trifluoroacético 0,5%, além de sucessivas ultrafiltrações, exclusão por tamanho e HPLC de fase reversa^{11,66}.

A ionização por eletrospray (ESI) é uma técnica suave de ionização, a qual permite ionizar proteínas inserindo nelas múltiplas cargas. Devido a estas cargas, os valores de razão massa/carga (m/z) se tornam menores e dentro da faixa de análise de diversos tipos de analisadores. Esta técnica é fundamental para a produção de íons em fase gasosa de moléculas biológicas e sua consequente identificação^{67,68}.

Os peptídeos da classe *Defensin* de Calliphoridae apresentam massa molecular com cerca de 4kDa constituídos de 40 aminoácidos. Para sua identificação das massas moleculares dos peptídeos, os íons carregados de uma relação

m/z detectada são multiplicados por fatores de 3 – 6 vezes dependendo de sua carga e subtraindo os prótons de massa obtida¹¹. Já para peptídeos antimicrobianos menores (e.g.: Sarconesin), os íon duplo-carregado fornece a massa do peptídeo com relação m/z detectada multiplicando por 2 e subtraindo dois prótons (Tab. 3)^{69,60}. O seqüenciamento é feito pela fragmentação dos íons intactos e o padrão de fragmentação fornece as seqüências.

Tabela 3. Comparação das seqüências dos peptídeos com atividade antimicrobiana de Calliphoridae (Diptera).

Espécie	Peptídeo	Método	Seqüência de aa	Massa molecular	Íon precursor	Referência
<i>Phormia terranovae</i>	<i>Phormia A</i>	VG-ZAB-SE	ATCDLLSGTGINHSA CAAHCLLRGNRGGY CNGKGVVCVRN (40aa)	4.060,22 Da	m/z 4.061,22 [M + H] ⁺ ; m/z 2031,11 [M + 2H] ²⁺	70
<i>Phormia terranovae</i>	<i>Phormia B</i>	VG-ZAB-SE	ATCDLLSGTGINHSA CAAHCLLRGNRGGY CNRKGVVCVRN (40aa)	4.159,16 Da	m/z 4060,16 [M + H] ⁺ ; m/z 2.080,58 [M + 2H] ²⁺	70
<i>Lucilia sericata</i>	<i>Lucifensin</i>	ESI/Q-Tof	ATCDLLSGTGVKHS AAHCLLRGNRGGY CNGRAICVCRN (40aa)	4.113,89 Da	m/z 1.372,29 [M + 3H] ³⁺ ; m/z 1029,4 [M + 4H] ⁴⁺ ; m/z 823,77 [M + 5H] ⁵⁺ ; m/z 686,64 [M + 6H] ⁶⁺	11
<i>Lucilia sericata</i>	<i>Lucimycin</i>	ESI/micrO TOF II	MAKLFIIVLFALIAVVL AQHGYGAGGHGQQ GYGSQHSSHAPQG GHVVREQGFSGHVH EQQAGHHHEAGHHE QAGHHEQSGQQVH GQGHGYKSHGY (77aa)	8.200 Da	Não apresentado	61
<i>Lucilia cuprina</i>	<i>Lucifensin II</i>	ESI/Orbitrap	ATCDLLSGTGKHS AAHCLLRGNRGGY CNGRAICVCRN (40 aa)	4.127,93 Da	m/z 1.032,98 [M + 4H] ⁴⁺ ; m/z 826,58 [M + 5H] ⁵⁺ ; m/z 688,98 [M + 6H] ⁶⁺	66
<i>Sarconesiopsis magellanica</i>	<i>Sarconesin</i>	ESI/Orbitrap	TPFLLVGTQIDLR (13aa)	1.471,83 Da	m/z 736,9266 [M + 2H] ²⁺	69
<i>Sarconesiopsis magellanica</i>	<i>Sarconesin II</i>	ESI/Orbitrap	VALTGLTVAEYFR (13aa)	1.439,6 Da	m/z 720,8 [M + 2H] ²⁺	60

Os peptídeos *Lucifensin II*, *Sarconesin* e *Sarconesin II* foram analisados pela Orbitrap. Neste método os íons são presos em uma órbita envolta ao eixo do eletrodo central. Este eletrodo confina os íons de forma que orbitem pelo centro e oscilem para frente para trás ao longo do eixo. A oscilação gera uma frequência no detector dependente da m/z do íon. Assim os Orbitraps possuem alta precisão nas medidas de massas, alta sensibilidade boa faixa de análise⁷¹.

Sarconesin II foi purificado utilizando RP-HPLC. Após liofilizado e suspenso em água ultrapura, as frações foram testadas contra *M. luteus*, indicando a atividade antibacteriana no eluido com tempo de retenção de 43,7 min na coluna C18. Para o RP-HPLC o extrato de ES liofilizado foi eluido em coluna Jupiter C18 (10mm x 250 mm, 10 µm; 300 Å), utilizando gradiente linear B 0-80% em 80min, sendo o solvente A: 0,05% TFA(ácido trifluorocético)/ACN(acetonitrila) e solvente B: 0,05% TFA/H₂O com taxa de fluxo 1,5mL/min, e o monitoramento a 225nm⁶⁰.

Para *Sarconesin* o ES foi eluido em 80% de ACN em cartucho Sep-Pak como primeira etapa do RP-HPLC. O extrato de ES liofilizado foi eluido em coluna Jupiter C18 (10mm x 250 mm, 10 µm; 300 Å), utilizando gradiente linear B 0-80% em 60min, sendo o solvente A: 0,05% TFA/ACN e solvente B: 0,05% TFA/H₂O com taxa de fluxo 2mL/min, monitorado a 225nm. As frações com tempo de retenção 8,1; 50,9; 51,7; 52,1 e 64,9 min apresentam atividade antimicrobiana. A fração 3 foi purificada novamente no mesmo sistema em coluna Jupiter C18 (10mm x 250 mm, 10 µm; 300 Å) em 44-54% na solução B por 6 min, assim a fração 3,2 foi identificada como *Sarconesin*⁶⁹.

Para obtenção da *Lucifensin* II o extrato da hemolinfa larval foi ultrafiltrada em membrana de 50kDa, o filtrado foi novamente ultrafiltrado em membrana de 3kDa e o material retido foi submetido a RP-HPLC e HPLC de exclusão por tamanho e por último RP-HPLC. O material retido da membrana de 3kDa foi liofilizado e eluido em gradiente de solventes de 5 a 70% de ACN/H₂O 1% TFA aplicado por 60min com taxa de fluxo de 1mL/min. A fração 3 com tempo de retenção 22,7-23min apresentou atividade contra *M. luteus* e então foi submetida a HPLC de exclusão por tamanho na coluna Bio-Sil (300 por 7,8mm, 5µm). A taxa de fluxo foi de 1mL/min, utilizando tampão acetato de amônio 0,1M, pH 4,4 como fase móvel. A fração 10 com tempo de retenção de 16 min foi repurificada em RP-HPLC com gradiente de solvente A 75% e B 45% por 60 min com taxa de fluxo 1mL/min. A detecção foi a 220nm com solvente A ACN-H₂O 5%, 0,1% de TFA e solvente B ACN-H₂O 70%, 0,1 TFA. *Lucifensin* correspondeu ao pico com tempo de retenção 15,7min⁶⁶.

Já para os peptídeos *Lucimycin* e *Lucifensin*, foi utilizado o equipamento TOF (tempo de voo). Para medir os íons, esta técnica utiliza um campo elétrico para acelerar os íons no mesmo potencial, assim a medida da razão m/z é calculada pelo tempo em que o íon leva para chegar ao detector. Se as moléculas possuem a mesma carga, suas energias cinéticas serão as mesmas, o que torna a sua velocidade dependente apenas da massa, fazendo com que íons de massa menor cheguem primeiro ao detector⁷².

O peptídeo *Lucifensin* foi purificado por HPLC exclusão por tamanho, a retido da ultrafiltração em membrana de 10kDa foi liofilizado e analisado em 220nm na coluna Bio-Sil (300 por 7,8mm, 5µm). A taxa de fluxo utilizado foi de 1mL/min, tampão acetato de amônio 0,1M, pH 6,2 como fase móvel. As frações 13 e 14 com tempo de retenção 11min foram repurificadas em RP-HPLC com gradiente de solvente de 5 a 70% de ACN-H₂O, 0,1% de TFA com taxa de fluxo 1mL/min por 60min. A *Lucifensin* apresenta pico com tempo de retenção de 23,5min¹¹.

A análise do transcriptoma de *L. sericata* revelou a presença de mRNA que codifica um peptídeo sinal de 18

resíduos e um domínio maduro de 77 resíduos. Este peptídeo maduro tem sua massa molecular predita em 8,2kDa. O peptídeo denominado *Lucimycin* foi expresso como produto recombinante em *E. coli* como proteína de fusão com thioredoxin e tag HIS6. Com este mecanismo o peptídeo pode ser separado do lisado celular com cromatografia de afinidade baseada em íons metálicos de cobalto imobilizados. Após a remoção do sal e imidazole do eluente por cromatografia por exclusão de tamanho, a proteína de fusão foi clivado com fator Xa para liberação do peptídeo e o resultado da fragmentação foi separado com HPLC troca de ânions. Os produtos da clivagem então foram confirmados por SDS-PAGE corado com comassie-blue⁶¹.

Os peptídeos Phormia A e Phormia B foram purificados com cromatografia de troca catiônica. 30mL do plasma larval foi tratado com calor e aplicados na coluna CM-Trisacryl (2,5 x 18cm). Sete picos apresentaram atividade antibacteriana, sendo os picos A e B efetivos contra *M. luteus*. A e B foram submetidos a coluna C18 (Waters) em proporções crescentes de ACN-H₂O, 0,1% de TFA. Para o RP-HPLC a fração ativa foi diluída em 0,11% TFA em coluna C18 (0,46 x 25 cm). A eluição foi realizada em gradiente linear de ACN-H₂O, 0,1% TFA com taxa de fluxo 1mL/min e monitorados e 210nm⁷⁰.

Tabela 4. Comparação dos peptídeos antimicrobianos de Calliphoridae e atividade contra bactérias gram-positivas, gram-negativas e fungo.

Peptídeo	Gram-positivas	Gram-negativas	Fungo	Referência
<i>Phormia A</i>	+	-	-	70
<i>Phormia B</i>	+	-	-	70
<i>Lucifensin</i>	+	-	-	11
<i>Lucifensin II</i>	+	-	-	66
<i>Lucimycin</i>	-	-	+	61
<i>Sarconesin</i>	+	+	-	69
<i>Sarconesin II</i>	+	+	-	60

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A bioprospecção de moléculas na família Calliphoridae é uma área promissora dentro da biotecnologia, devido a grande variabilidade existente nestes animais. O aumento do número de bactérias resistentes a antibióticos tem crescido na última década e assim são necessárias alternativas para seu controle. Os peptídeos antimicrobianos presentes nos insetos apresentam atividade bactericida contra espécies gram-positivas e gram-negativas. Seu modo de ação envolve interações eletrostáticas com a membrana das células. A espectrometria de massas é fundamental para a caracterização destas moléculas de interesse biotecnológico, destacando-se os peptídeos da classe *Defensin*.

REFERÊNCIAS

1. Sherman RA. Mechanisms of maggot-induced wound healing: what do we know, and where do we go from here? *Evid Based Complement Alternat Med*. 2014; 592419
2. Mumcuoglu KY, Miller J, Mumcuoglu M, Friger M, Tarshis M. Destruction of bacteria in the digestive tract of the maggot of *Lucilia sericata* (Diptera:Calliphoridae). *J Med Entomol*. 2001;38:161–166
3. Simmons SW. A bactericidal principle in excretions of surgical maggots which destroys important aetiological agents of pyogenic infections. *J Bacteriol*. 1935;30: 253–267
4. Pavillard ER, Wright EA. An antibiotic from maggots. *Nature*. 1957;180:916–917
5. Arora S, Sing LC, Baptista C. Antibacterial activity of *Lucilia cuprina* maggot extracts and its extraction techniques. *Int J Integ Biol*. 2010;9(1):43-48
6. Bexfield A, Nigam Y, Thomas S, Ratcliffe NA. Detection and partial characterization of two antibacterial factors from the excretions/secretions of the medicinal maggot *Lucilia sericata* and their activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Micro Infec*. 2004;6:1297–1304. DOI: 10.1016/j.micinf.2004.08.011
7. Masiero FS, Aquino MFK, Nassu MP, Pereira DIB, Leite DS, Thyssen PJ. First Record of Larval Secretions of *Cochliomyia macellaria* (Fabricius, 1775) (Diptera: Calliphoridae) Inhibiting the Growth of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Neotrop Entomol*. 2016. DOI: 10.1007/s13744-016-0444-4
8. Ratcliffe NA, Vieira CS, Mendon PM, Caetano RL, Queiroz MMC, Garcia ES, 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 Trop*. 2015;147:6–11
9. Andersen AS, Joergensen B, Bjarnsholt T, Johansen H, Karlsmark T, Givskov M, et al. Quorum-sensing-regulated virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* are toxic to *Lucilia sericata* maggots. *Microbiol*. 2010;156:400-407. DOI: 10.1099/mic.0.032730-0.

-
10. Kawabata T, Mitsui H, Yokota K, Ishino K, Oguma K, Sano S. Induction of antibacterial activity in larvae of the blowfly *Lucilia sericata* by an infected environment. *Med Vet Entomol.* 2010;24:375–381. DOI: 10.1111/j.1365-2915.2010.00902.x
 11. Čeřovský V, Zdarek J, Fucik V, Monincová L, Voburka Z, Bém R. Lucifensin, the long-shought antimicrobial factor of medicinal maggots of the blowfly *Lucilia sericata*. *Cell Mol Life Sci.* 2010;67:455-466
 12. Valachová I, Bohová J, Pálošová Z, Takáč P, Kozánek M, Maitán J. Expression of lucifensin in *Lucilia sericata* medicinal maggots in infected environments. *Cell Tissue Res.* 2013;353:165–171. DOI: 10.1007/s00441-013-1626-6
 13. Costerton JW. Introduction to biofilm. *Int J Antimicrob Agents.* 1999;11:217–221
 14. Cazander G, Kiril MD, van Veen EB, Bouwman LH, Bernardts AT, Jukema GN. The Influence of Maggot Excretions on PAO1 Biofilm Formation on Different Biomaterials. *Clin Orthop Relat Res.* 2009;467:536–545. DOI: 10.1007/s11999-008-0555-2
 15. van der Plas MJ, Van der Does AM, Baldry M, Dogterom-Ballering HC, Van Gulpen C, van Dissel JT, et al. Maggot excretions/secretions inhibit multiple neutrophil pro-inflammatory responses. *Microbes Infect.* 2007;9(4):507-14.
 16. van der Plas MJA, Dambrot C, Dogterom-Ballering HCM, Kruithof S, van Dissel JT, Nibbering PH. Combinations of maggot excretions/secretions and antibiotics are effective against *Staphylococcus aureus* biofilms and the bacteria derived therefrom. *J Antimicrob Chemother.* 2010;65:917–923. DOI: 10.1093/jac/dkq042. 2010.
 17. Valachová I, Bohová J, Kozánek M, Takáč P, Maitán J. *Lucilia sericata* medicinal maggots: a new source of antimicrobial compounds. *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education* (A. Méndez-Vilas, Ed.). 2013.
 18. Wu Q, Patocka J, Kuca K. Insect antimicrobial peptides, a mini review. *Toxins.* 2018;10:461. DOI: 10.3390/toxins10110461
 19. Carvalho CJB, Mello-Patiu CA. Key to the adults of the most common forensic species of Diptera in South

America. *Reva Bras Entomol.* 2008;52(3):390-406

20. Awad H, Khamis MM, El-Aneed A. Mass Spectrometry, Review of the Basics: Ionization. *Appl Spectrosc Rev.* 2014;50(2):158-175. DOI: 10.1080/05704928.2014.954046.
21. Chapman AD. *Numbers of Living Species in Australia and the World*, 2 ed. Australian Government, Department of the Environment, Water, Heritage and the Arts. 2009
22. Raven PH, Yeates DK. *Australian biodiversity: threats for the present, opportunities for the future.* 2007.
23. Baer WS. The treatment of chronic osteomyelitis with the maggot (larva of the blow fly). *J Bone Joint Surg Am.* 1931;13:438–475
24. Wang T, Wang W, Li F, Chen Y, Jiang D, Chen Y, et al. Maggot excretions/secretions promote diabetic wound angiogenesis via miR18a/19a-TSP-1 axis. *Diabetes Res Clin Pract.* 2020;165. DOI: 108140. 2020. 10.1016/j.diabres.2020.208140.
25. Linger RJ, Belikoff EJ, Yan Y, Li F, Wantuch HA, Fitzsimons HL, et al. Towards next generation maggot debridement therapy: transgenic *Lucilia sericata* larvae that produce and secrete a human growth factor. *BMC Biotechnol.* 2016;16:30. DOI: 10.1186/s12896-016-0263-z
26. Stadler F. The maggot therapy supply chain: a review of the literature and practice. *Med Vet Entomol.* 2020;34:1-9. DOI: 10.1111/mve.12397
27. Fleischmann W, Grassberger M, Sherman R. *Maggot Therapy: A Handbook of Maggot- Assisted Wound Healing.* Thieme Verlag Stuttgart. 2004.
28. Hobson RP. On an enzyme from blow-fly larvae (*Lucilia sericata*) which digests collagen in alkaline solution. *Biochem J.* 1931;25:1458–1463
29. Valachova I, Majtan T, Takac P, Majtan J. Identification and characterization of different proteases in

Lucilia sericata medicinal maggots involved in maggot debridement therapy. *J Appl Biomed*. 2014;12(3):171-177. DOI: 10.1016/j.jab.2014.01.001

30. Caleffe RRT, Oliveira SR, Gigliolli AAS, Ruvolo-Takasusuki MC, Conte H. Bioprospection of immature salivary glands of *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) (Diptera: Calliphoridae). *Micron*. 2018;112:55-62. DOI: 10.1016/j.micron.2018.06.007.

31. Grassberger M, Sherman RA, Gileve O, Kim C, Mumcuoglu KY. *Biotherapy - History, Principles and Practice*. Springer. 2013.

32. Yakovlev AY, Nesin AP, Simonenko NP, Gordyal NA, Tulin DV, Tulin DV, Kruglikoval AA, et al. Fat body and hemocyte contribution to the antimicrobial peptide synthesis in *Calliphora vicina* R.-D. (Diptera: Calliphoridae) larvae In Vitro. *Cell Dev Biol Animal*. 2016. DOI: 10.1007/s11626-016-0078-1.

33. Pushpanathan M, Gunasekaran P, Rajendhran J. Antimicrobial peptides: versatile biological properties. *Int J Pept*. 2013;675391. DOI: 10.1155/2013/675391

34. Hultmark D, Engström A, Bennich H, Kapur R, Boman HG. Insect immunity. Isolation and structure of cecropin D and four minor antibacterial components from *cecropia* pupae. *Eur J Biochem*. 1982;127:207–217

35. van Hofsten P, Faye I, Kockum K, Lee JY, Xanthopoulos KG, Boman IA. Molecular cloning, cDNA sequencing, and chemical synthesis of cecropin B from *Hyalophora cecropia*. *Proc Nat Acad Sci USA*. 1985;82:2240–2243

36. Moore AJ, Beazley WD, Bibby MC, Devine DA. Antimicrobial activity of cecropins. *J Antimicrobiol Chemother*. 1996;37:1077–1089

37. Bechinger B, Lohner K. Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1758:1529–1539

38. Fu H, Björstad A, Dahlgren C, Bylund J. A bacterial cecropin-A peptide with a stabilized α -helical structure possess an increased killing capacity but no proinflammatory activity. *Inflammation*. 2004;28:337–343

39. Yun J, Lee DG. Cecropin A-induced apoptosis is regulated by ion balance and glutathione antioxidant system in *Candida albicans*. *IUBMB Life*. 2016;68:652–662
40. Durell SR, Raghunathan G, Guy HR. Modeling the ion channel structure of cecropin. *Biophys J*. 1992;63:1623–1631
41. Srisailam S, Kumar TKS, Arunkumar AI, Leung KW, Yu C, Chen HM. Crumpled structure of the custom hydrophobic lytic peptide cecropin B3. *Eur J Biochem*. 2001;268:4278–4284
42. Chalk R, Townson H, Ham PJ. *Brugia pahangi*: The effects of cecropins on microfilariae in vitro and in *Aedes aegypti*. *Exp Parasitol*. 1995;80:401–406
43. Andrä J, Berninghausen O, Leippe M. Cecropins, antibacterial peptides from insects and mammals, are potently fungicidal against *Candida albicans*. *Med Microbiol Immunol*. 2001;189:169–173
44. Guo C, Huang Y, Zheng H, Tang L, He J, Xiao L, et al. Secretion and activity of antimicrobial peptide cecropin D expressed in *Pichia pastoris*. *Exp Ther Med*. 2012;4:1063–1068
45. Park SI, An HS, Chang BS, Yoe SM. Expression, cDNA cloning, and characterization of the antibacterial peptide cecropin D from *Agrius convolvuli*. *Anim Cells Syst*. 2013;17:23–30
46. Hou ZP, Wang WJ, Liu ZQ, Liu G, Souffrant WB, Yin YL. Effect of lactoferricin B and cecropin P1 against enterotoxigenic *Escherichia coli* in vitro. *J Food Agric Environ*. 2011;9:271–274
47. Baek MH, Kamiya M, Kushibiki T, Nakazumi T, Tomisawa S, Abe C, et al. Lipopolysaccharide-bound structure of the antimicrobial peptide cecropin P1 determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Pept Sci*. 2016;22:214–221.
48. Téllez GA, Castaño-Osorio JC. Expression and purification of an active cecropin-like recombinant protein against multidrug resistance *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*. 2014;100:48–53

-
49. Lu X, Shen J, Jin X, Ma Y, Huang Y, Mei H, et al. Bactericidal activity of *Musca domestica* cecropin (Mdc) on multidrug-resistant clinical isolate of *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2012;95:939–945
50. Carlsson A, Engström P, Palva ET, Bennich H. Attacin, an antibacterial protein from *Hyalophora cecropia*, inhibits synthesis of outer membrane proteins in *Escherichia coli* by interfering with *omp* gene transcription. *Infect Immun*. 1991;59:3040–3045
51. Cudic M, Bulet P, Hoffmann R, Craik DJ, Otvos LJ. Chemical synthesis, antibacterial activity and conformation of dipteracin, an 82-mer peptide originally isolated from insects. *Eur J Biochem*. 1999;266:549–558
52. Keppi E, Pugsley AP, Lambert J, Wicker C, Dimarcq JL, Hoffmann JA, et al. Mode of action of dipteracin A, a bactericidal peptide induced in the hemolymph of *Phormia terranova* larvae. *Insect Biochem Physiol*. 1989;10:229–239
53. McManus AM, Otvos LJ, Hoffmann R, Craik DJ. Conformational studies by NMR of the antimicrobial peptide, drosocin, and its non-glycosylated derivative: Effects of glycosylation on solution conformation. *Biochemistry*. 1999;38:705–714
54. Lele DS, Talat S, Kumari S, Srivastava N, Kaur KJ. Understanding the importance of glycosylated threonine and stereospecific action of Drosocin, a Proline rich antimicrobial peptide. *Eur J Med Chem*. 2015;92:637–647
55. Bulet P, Urge L, Ohresser S, Hetru C, Otvos LJ. Enlarged scale chemical synthesis and range of activity of drosocin, an O-glycosylated antibacterial peptide of *Drosophila*. *Eur J Biochem*. 1996;238:64–69
56. Levashina EA, Ohresser S, Bulet P, Reichhart JM, Hetru C, Hoffmann JA. Metchnikowin, a novel immune-inducible proline-rich peptide from *Drosophila* with antibacterial and antifungal properties. *Eur J Biochem*. 1995;233:694–700
57. Cociancich S, Dupont A, Hegy G, Lanot R, Holder F, Hetru C, et al. Novel inducible antibacterial peptides from a hemipteran insect, the sap-sucking bug *Pyrrhocoris apterus*. *Biochem J*. 1994;300:567–575.
58. Kragol G, Lovas S, Varadi G, Condie BA, Hoffmann R, Otvos LJ. The antibacterial peptide pyrrhocoricin

inhibits the ATPase actions of DnaK and prevents chaperone-assisted protein folding. *Biochemistry*. 2001;40:3016–3026

59. Boxell A, Lee SH, Jefferies R, Watt P, Hopkins R, Reid S, et al. Pyrrhocoricin as a potential drug delivery vehicle for *Cryptosporidium parvum*. *Exp Parasitol*. 2008;119:301–303
60. Díaz-Roa A, Espinoza-Culupú A, Torres-García O, Borges MM, Avino IN, Alves FL, et al. Antimicrobial Peptide Isolated from *Sarconesiopsis magellanica* Excretions and Secretions. *Molecules*. 2019;24:2077. DOI: 10.3390/molecules24112077
61. Pöppel AK, Koch A, Kogel KH, Vogel H, Kollwe C, Wiesner J, et al. Lucimycin, an antifungal peptide from the therapeutic maggot of the common green bottle fly *Lucilia sericata*. *Biol Chem*. 2014;395(6):649–656. DOI: 10.1515/hsz-2013-0263
62. Sherman RA, Tran JMT. A simple, sterile food source for rearing the larvae of *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). *Med Vet Entomol*. 1995;9:393-398
63. Mackerras MJ, Freney MR. Observations on the nutrition of maggots of Australian blowflies. *J Exp Biol*. 1932; 10:237-246
64. Thyssen PJ, Nassu MP, Nitsche MJT, Leite DS. Sterilization of immature blowflies (Calliphoridae) for use in larval therapy. *J Med Med Sci*. 2013;4(10):405-409. DOI: 10.14303/jmms.2013.142.
65. Dellavecchia DL, Filho RGS, Aguiar VM. Sterilization of *Chrysomya putoria* (Insecta: Diptera: Calliphoridae) Eggs for Use in Biotherapy. *J Insect Sci*. 2014;14:160. DOI: 10.1093/jisesa/ieu022
66. El Shazely B, Veverka V, Fůček V, Voburka Z, Žďárek J, Čeřovský V. Lucifensin II, a Defensin of Medicinal Maggots of the Blowfly *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae). *J Med Entomol*. 2013;50(3):571-578
67. Fen JB, Mann M, Menga CK, Wong SF, Whitehouse CM. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*. 1989;246(4926):64-71. DOI: 10.1126/science.2675315
68. Banerjee S, Mazumdar S. Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Infor-

69. Díaz-Roa A, Patarroyo MA, Bello FJ, Silva PI. Sarconesin: Sarconesiopsis magellanica Blowfly Larval Excretions and Secretions With Antibacterial Properties. *Front Microbiol.* 2018;9:2249. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02249

70. Lambert J, Keppi E, Dimarcq J, Wicker C, Reichhart J, Dunbar B, et al. Insect immunity: Isolation from immune blood of the dipteran *Phormia terranova* of two insect antibacterial peptides with sequence homology to rabbit lung macrophage bactericidal peptides (insect defensins/Gram-positive bacteria/amino acid sequence/fast atom bombardment mass spectrometry). *D Proc Natl Acad Sci USA.* 1989;86:262-266

71. Hu Q, Noll RJ, Li H, Makarov A, Hardman M, Cooks RG. The Orbitrap: a new mass spectrometer. *J Mass Spectrom.* 2005;40(4):430-443. DOI: 10.1002/jms.856

72. Mirsaleh-Kohan N, Robertson WD, Compton RN. Electron ionization time-of-flight mass spectrometry: Historical review and current applications. *Mass Spectrom Rev.* 2008;27(3):237-285. DOI: 10.1002/mas.20162