

# ESTABELECIMENTO DE PROTOCOLO PARA MANUTENÇÃO DE *COCHLIOMYIA HOMINIVORAX* (DIPTERA: CALLIPHORIDAE) EM LABORATÓRIO PARA O ESTUDO DO MICROBIOMA DE LARVAS

Palavras-Chave: MOSCA-VAREJEIRA, MIÍASE, CRIAÇÃO

LUIZA BASCOPÉ REIS, LEI-DBA, IB – UNICAMP

MATHEUS SALUSTIO CAMPISTA PETRUCCI, LEI-DBA, IB – UNICAMP

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. PATRÍCIA JACQUELINE THYSSEN, LEI-DBA, IB – UNICAMP

---

## INTRODUÇÃO

*Cochliomyia hominivorax* (Coquerel) (Diptera, Calliphoridae), conhecida popularmente no Brasil como mosca-das-bicheiras, tem hábito parasitário e, por acometer principalmente animais de criação, é responsável por significativa perda econômica nas regiões tropicais e subtropicais estimada em mais de 300 milhões de dólares anuais (Hall; Wall, 1995; Grisi et al., 2014). Além do óbito, a infestação por *C. hominivorax* resulta em lesões traumáticas graves (Thyssen et al., 2012).

O inovador e bem sucedido método ou técnica de liberação de machos estéreis denominado como SIT (do inglês, *sterile insect technique*) foi usado pela primeira vez para a erradicação e controle populacional de *C. hominivorax* (Marcondes; Thyssen, 2017). Consistia em liberar machos estéreis por meio de radiação no ambiente para competir com machos férteis selvagens por fêmeas, o que resultaria em ovos não viáveis e conseqüentemente estabeleceria uma diminuição gradual da população de moscas (Marcondes; Thyssen, 2017). Para tanto, era primordial a criação massiva dos espécimes em laboratório e considerando que se trata de uma mosca parasita, diversos obstáculos para sua manutenção consistiram primariamente em obter dietas artificiais que assegurassem um desenvolvimento tão ótimo quanto ao observado para aqueles espécimes que se criaram em hospedeiros vivos (Graham, 1985; Mastrangelo et al., 2014).

A manutenção de espécimes em laboratório tem como fim fornecer a nutrição apropriada dos insetos, no que diz respeito às necessidades de qualidade e quantidade de nutrientes, para garantir sua sobrevivência e conseqüente crescimento populacional (Chen et al., 2014). Adicionalmente, o uso de dietas e protocolos bem estabelecidos em laboratório, além de promover um melhor entendimento sobre os parâmetros biológicos e fisiológicos dos insetos, torna fácil a manipulação e criação de condições experimentais controladas (Taylor et al., 1987; Estrada et al., 2008; Chen et al., 2014), fundamentais para o estudo do microbioma (Guerrero, 2018).

Desse modo, o presente estudo teve como objetivo estabelecer protocolos para manutenção de *C. hominivorax* em laboratório visando promover a facilitação de pesquisas sobre a interação microbioma e larvas. Para tal, foram avaliados parâmetros como tempo de desenvolvimento e peso máximo larval.

## METODOLOGIA

As colônias de *C. hominivorax* foram estabelecidas no Laboratório de Entomologia Integrativa (CELEI, 2024) do DBA-IB, UNICAMP, a partir de larvas em pré-pupa coletadas das feridas produzidas pela mosca em um porco-espinho *Coendou prehensilis* (Linnaeus) (Rodentia, Erethizontidae) encontrado no campus universitário (22°49'03" S; 47°04'11" O). Após a coleta, o animal debilitado foi a óbito.

As larvas coletadas e identificadas (PRADO et al., 2023) foram acondicionadas em frascos contendo serragem de madeira estéril como substrato para a pupariação e transferidas para uma câmara climática com temperatura ( $29\pm 1^{\circ}\text{C}$ ), umidade ( $50\pm 10\%$ ) e fotoperíodo (12 h) controlados. Após quatro dias a serragem foi peneirada e as pupas acondicionadas em gaiolas de plástico teladas (30x20x40 cm) permanecendo em sala climatizada ( $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ ,  $70\pm 10\%$  UR e 12 h fotoperíodo) (Figs. 1A e 1B) até a emergência dos adultos de 24 a 48 h depois.

Para avaliar o tempo de desenvolvimento de imaturos, todas as etapas vitais foram acompanhadas a cada 12 h até a emergência do adulto. O peso máximo larval, correspondente ao terceiro estágio de desenvolvimento anterior à fase de dispersão, foi obtido de 10 larvas retiradas aleatoriamente da dieta com uso de balança analítica de precisão de quatro décimos.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 1. Protocolo para criação de *C. hominivorax* em laboratório

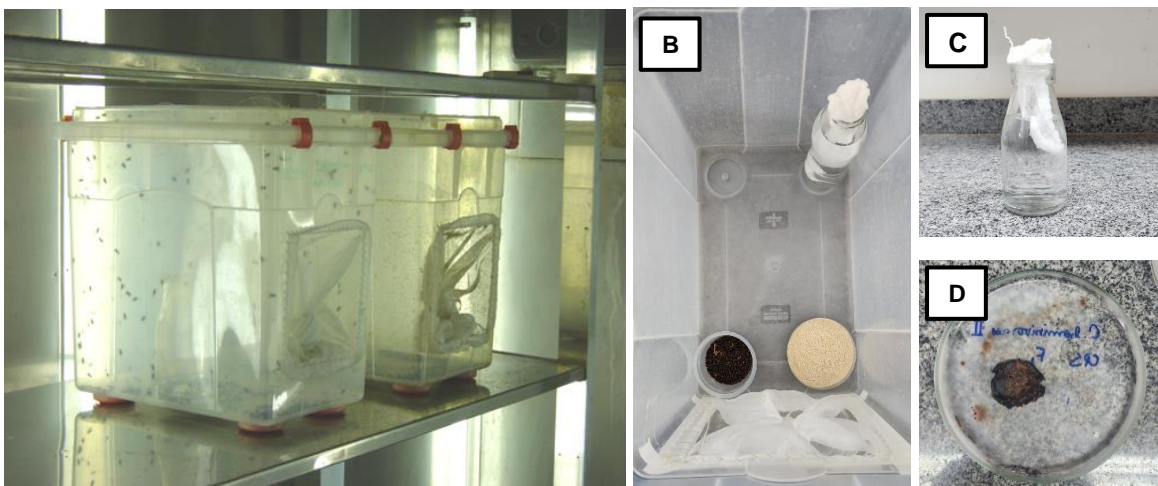
#### **Etapa 1 – sobre a manutenção e sobrevivência dos adultos e desenvolvimento ovariano.**

Fêmeas e machos emergidos devem receber água *ad libitum* e uma dieta seca a base de levedo de cerveja, açúcar e leite integral em pó (1:1:1) (Estrada et al., 2009) (Figs. 1B e 1C). Para promover o desenvolvimento ovariano, uma porção de 50 g de fígado bovino acrescido de 1 mL de sangue bovino contendo citrato de sódio, diluído em água filtrada 1:1, deve ser oferecido no 3º e 5º dia pós-emergência por um intervalo de 180 e 90 min, respectivamente (Fig. 1D).

**Etapa 2 – sobre o estímulo para postura e obtenção dos ovos.** O substrato para postura deve ser composto de uma porção de 50 g de carne moída bovina mantida 24 h antes sob temperatura ambiente acrescido de 5 mL de sangue bovino contendo citrato de sódio, diluído em água filtrada 1:1, sobre placa de Petri coberta por papel filtro umedecido também com sangue diluído. Para simular a temperatura do hospedeiro, uma vez que *C. hominivorax* tem hábito parasitário, uma placa de aquecimento deve ser disposta embaixo da gaiola para manter a temperatura controlada em  $33^{\circ}\text{C}$ .

Em nosso estudo, como esperado, os ovos foram depositados ao redor do substrato, pois as fêmeas, naturalmente, costumam depositar seus ovos nas margens das feridas (Marcondes; Thyssen, 2017).

**Etapa 3 – sobre o desenvolvimento dos imaturos.** Com auxílio de um pincel umedecido e sob estereomicroscópio, os ovos devem ser transferidos para um frasco com capacidade de 50 mL contendo 50 g de carne moída bovina fresca acrescida de 15 mL de sangue bovino contendo citrato de sódio, diluído em água filtrada 1:10, gentilmente homogeneizado. Este frasco deve ser depositado no interior de outro frasco plástico com capacidade a partir de 500 mL, coberto por tecido sintético, e mantido em câmara climática com temperatura ( $29\pm 1^\circ\text{C}$ ), umidade ( $50\pm 10\%$ ) e fotoperíodo (12 h) controlados. As larvas devem ser removidas da dieta a cada 24 h e transferidas para outro frasco contendo a mesma dieta fresca por sete dias consecutivos. No último dia, as larvas devem ser removidas e depositadas em pote contendo serragem de madeira estéril para pupariação.



**Figura 1.** Gaiola plástica telada mantida em sala climatizada (A) para abrigar espécimes adultos contendo água e dieta para sobrevivência (B) de *Cochliomyia hominivorax*. Em detalhe, a garrafa de vidro preparada para a água subir por capilaridade (C) e a porção de fígado bovino usada para estimular o desenvolvimento ovariano de fêmeas (D).

## 2. Tempo de desenvolvimento dos imaturos e peso máximo de espécimes criados sob condições de laboratório

A  $29^\circ\text{C}$ , o tempo de incubação dos ovos de *C. hominivorax* foi de aproximadamente 12 h, de larvas (de 1<sup>o</sup> a 3<sup>o</sup> estágio, incluindo a fase de pré-pupa) entre aproximadamente 144 e 168 h. Laake et al. (1936) registraram um tempo de incubação de ovos sobre a ferida de hospedeiros vivos variando entre 11 e 21,5 h, enquanto o tempo de desenvolvimento larval variou entre 139 e 259 h a  $37^\circ\text{C}$ . Dados similares foram observados por Thyssen et al. (2012).

Em nosso estudo, a  $26^\circ\text{C}$ , o tempo de desenvolvimento de pupa variou entre 120 e 168 h. Laake et al. (1936) reportaram o intervalo de pupa em 168 h.

As larvas no 6º dia de vida atingiram o peso máximo de  $62,4 \pm 0,4$  mg. Larvas de terceiro estágio removidas de feridas de cães do município de Campinas, SP, depositadas na CELEI (2024) foram pesadas (N= 5), a título de comparação, e as massas variaram entre 70 e 75 mg.

## CONCLUSÕES

Os dados biológicos e morfométricos observados de espécimes criados em laboratório não diferiram muito daqueles oriundos de feridas de animais. A implementação de um protocolo padronizado permitirá não apenas a manutenção de colônias saudáveis e viáveis em laboratório, mas também a realização de experimentos controlados que possam explicar as interações entre a mosca e seus microrganismos associados.

**Agradecimentos.** CNPq processo 308832/2020-5; FAPESP processos 2022/09029-0, 2023/11610-6 e 2024/09549-0.

## BIBLIOGRAFIA

CELEI, Coleção Entomológica do Laboratório de Entomologia Integrativa, 2024. Disponível em: <https://sites.google.com/unicamp.br/lei-dba-unicamp/>

CHEN, H. et al. Artificial diets used in mass production of the New World screwworm, *Cochliomyia hominivorax*. **Journal of Applied Entomology**, v. 138, n. 9, p. 708–714, 2014.

ESTRADA, D.A.; GRELLA, M.D.; THYSSEN, P.J.; LINHARES, A.X. Taxa de Desenvolvimento de *Crhysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) em Dieta Artificial Acrescida de Tecido Animal para Uso Forense. **Neotropical Entomology**, v. 32, p. 203-207, 2009.

GRAHAM, O.M. Symposium on eradication of the screwworm from the United States and Mexico Maryland. **Entomological Society of America**, 68 p, 1985.

GRISI, L. et al. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, n. 2, p. 150–156, 2014.

GUERRERO, E. B. **Análisis del microbioma de insectos: identificación y caracterización de glicosil hidrolasas**. 2018. Tese de Doutorado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

HALL, M.; WALL, R. Myiasis of human and domestic animals. **Advances in Parasitology**, London, v. 35, p. 257-334, 1995.

LAAKE, E.W.; CUSHING, E.C.; PARISH, H.E. Biology of the primary screwworm fly, *Cochliomyia americana*, and a comparison of its stages with those of the *Cochliomyia macellaria*. **Tech Bull**, vol. 500, p. 1-24, 1936.

MARCONDES, C.B.; THYSSEN, P.J. **Flies**. In: MARCONDES, C.B. (ed.) *Arthropod Borne and Diseases*. Switzerland: Springer, pp. 475-502, 2017.

MASTRANGELO, T.; BEZERRA, F.; FERNANDES, T. Dietas larvais alternativas para criação massal da mosca da bicheira, *Cochliomyia hominivorax*. **Ciência Rural**, v. 44, p. 672-677, 2014.

PRADO, A.M.; SAVINO, A.G.; THYSSEN, P.J. Interactive Key for Third Instar Larvae of Neotropical Blow Flies (Insecta, Diptera, Calliphoridae): the Contribution of Computational Tools to Assist in Species Identification. **Neotropical Entomology**, vol. 52, p. 373–379, 2023.

TAYLOR, D. B.; MANGAN, R. L. Comparison of Gelled and Meat Diets for Rearing Screwworm, *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae), Larvae1. **Journal of Economic Entomology**, v. 80, n. 2, p. 427–432, 1 abr. 1987.

THYSSEN, P. J. *et al.* Record of oral myiasis by *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae): case evidencing negligence in the treatment of incapable. **Parasitology Research**, v. 111, p. 957-959, 2012.