



ISOENZIMAS ESTERASES PARA A IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE CALLIPHORIDAE

Ronaldo Roberto Tait Caleffe (PIBIC/CNPq/Uem), Helio Conte (Co-orientador), Maria Claudia Colla Ruvolo Takasusuki (Orientador), e-mail: ronaldo_caleffe@hotmail.com.

Universidade Estadual de Maringá / Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular.

Ciências Biológicas: Genética (genética molecular e de microorganismos)

Palavras-chave: Chrysomya, PAGE, entomologia forense

Resumo:

O objetivo deste trabalho foi estabelecer o perfil eletroforético das esterases de Diptera da família Calliphoridae que ocorrem no *campus* da Universidade Estadual de Maringá/PR (UEM), para contribuir com a identificação das espécies. Foram realizadas eletroforeses PAGE (Eletroforese em géis de poliacrilamida) para a identificação de isoenzimas esterases de duas espécies de Calliphoridae, *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819) e *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794), sendo observadas seis regiões esterásicas em cada uma das espécies. De acordo com os testes de inibição em *C. megacephala* EST-1, EST-3, EST-4 e EST-5 foram classificadas como carboxilesterases subclasse I, EST-6 como acetilesterase e a EST-2 não foi possível classificar. A espécie *C. albiceps* as EST-1, EST-3 e EST-4 foram classificadas como carboxilesterases subclasse I, EST-2 como colinesterase subclasse II, EST-5 e EST-6 colinesterase subclasse I. As duas espécies possuem perfil eletroforético para esterases muito parecidos, contudo, o padrão de inibição das EST-5 e EST-6 possibilita a separação das duas espécies de *Chrysomya* analisadas.

Introdução

A entomologia forense utiliza-se de insetos necrófagos com o intuito de auxiliar nas investigações criminais e na estimativa do intervalo pós-morte (IPM). Dentre as espécies da ordem Diptera a família Calliphoridae é bastante importante para as análises forenses, pelo fato das espécies dessa família serem as pioneiras na colonização de cadáveres (OLIVEIRA-COSTA, 2011).



Além da importância forense, os califorídeos são utilizados na terapia larval, aplicando-se larvas vivas estéreis, providas em laboratório sobre lesões, feridas crônicas ou infectadas, com o objetivo de remover o tecido necrosado e assim facilitar o processo de cicatrização. Este é um tratamento eficaz comparado a tratamentos convencionais. A indicação desse tratamento é feita para feridas como osteomielite, queimaduras, feridas de pacientes diabéticos, úlceras de pressão, lesões traumáticas e tumores (MARTINI; SHERMAN, 2003).

De fundamental importância, tanto para a entomologia forense quanto para a terapia larval, é a correta identificação das espécies utilizadas. A identificação das espécies de Calliphoridae pode ser dificultada quando se utiliza chaves dicotômicas para a classificação dessas moscas, em especial quando se obtém apenas larvas. Assim, marcadores moleculares e Isoenzimas como as esterases podem contribuir com esse tipo de análise. Esse estudo teve como objetivo estabelecer o perfil eletroforético das esterases de Diptera da família Calliphoridae que ocorrem no *campus* da UEM em Maringá/Pr, para contribuir com a identificação das espécies.

Materiais e métodos

Local e procedimentos de Coleta

As coletas foram realizadas no *campus* da UEM, localizado na cidade de Maringá/PR (Lat.:23°25'S; Long.: 51°57'W e Altitude de 542 metros) localizado no noroeste de Paraná. O horário de coleta foi o vespertino entre 14:00 e 18:00 h, semanalmente, durante 6 meses (Outubro de 2014 a Março de 2015).

As moscas foram capturadas por meio de 2 armadilhas confeccionadas com garrafas PET2L contendo carne bovina moída, e identificadas por meio de chave dicotômica (GRELLA et al., 2015). As análises isoenzimáticas ocorreram no Laboratório de Genética Animal, Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular – DBC/UEM.

Preparo das amostras e eletroforese PAGE

Posteriormente à coleta e identificação, as moscas foram sacrificadas, tiveram as cabeça/tórax separadas do abdômen e foram estocadas individualmente em tubos de propileno de 1,5 mL contendo 80µl de β-mercaptoetanol 0,1% + glicerol 10% + 20µl de tetracloreto de carbono. Os tubos foram devidamente identificados e numerados, e estocados a -20°C. Para a análise das esterases foi utilizada a técnica de eletroforese vertical em géis de poliácridamida (PAGE) a 10% mais empilhamento a 5%, em sistema descontinuo. A corrida eletroforética foi realizada a 200 V por 4h30min a 4°C.

As amostras de cabeça/tórax foram maceradas individualmente e centrifugadas a 10.000 rpm por 10min a 4°C. Em seguida 15µl do



sobrenadante do centrifugado foi aplicado no gel. Após a corrida eletroforética os géis foram corados para as Isoenzimas esterases empregando os substratos α e β -naftil acetato juntos. Após a coloração os géis foram incubados a 38°C no escuro, até a visualização das regiões de atividade esterásica.

Teste de inibição e classificação das esterases

Extratos de cabeça/tórax das moscas foram usados quatro vezes no mesmo gel PAGE, o primeiro como controle, o segundo como teste de inibição com organofosforado (60 μ l), o terceiro com sulfato de eserina (0,0324g) e o quarto com para-cloromercuriobenzoato (p -CMB - 0,0038g). Para cada inibidor foi realizada separadamente, coloração como descrito no item anterior, adicionando-se os inibidores a cada solução de coloração. A coloração do controle não continha inibidor. A classificação das esterases, de acordo com o modelo proposto por Healy et al. (1991).

Após a coloração para esterases e os testes de inibição os géis foram digitalizados e submetidos a secagem.

Resultados e Discussão

Durante o período de coleta, foram identificadas, por chave dicotômica, duas espécies de Calliphoridae, *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) e *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819).

Nas duas espécies estudadas foram observadas seis regiões de esterases, denominadas numericamente sendo a EST-1 a mais anódica. De acordo com a especificidade aos substratos α -naftil acetato e β -naftil acetato, as EST-1, EST-3, EST-4, EST-5 e EST-6 foram classificadas como $\alpha\beta$ -esterase (preferencialmente β), e a EST-2 $\alpha\beta$ -esterase (preferencialmente α) para as duas espécies.

As esterases em insetos podem ser divididas em quatro grupos de acordo com a sua sensibilidade aos grupos de inibidores: organofosforados, sulfato de eserina e p -CMB (HEALY et al., 1991). Assim, em *C. megacephala* as EST-1, EST-3, EST-4 e EST-5 foram classificadas como carboxilesterases subclasse I, a EST-6 como acetilesterase e a EST-2 não foi possível classificar. As EST-1, EST-3 e EST-4 de *C. albiceps* foram classificadas como carboxilesterases subclasse I, a EST-2 como colinesterase subclasse II, EST-5 e EST-6 colinesterase subclasse I.

A inibição com organofosforado mostrou que ocorreu uma ativação de esterases específicas nas duas espécies. Em *C. megacephala*, foram detectadas duas regiões de atividade esterásica próximas as EST-4 e EST-5. Em *C. albiceps* na presença de organofosforado foi observada uma esterase entre EST-2 e EST-3.



A resistência a inseticidas organofosforados em *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae) está relacionada a carboxilesterase E3 (E.C.3.1.1.1), que somente é observada com a presença de organofosforado. Esta enzima compartilha 64% dos aminoácidos com sua homóloga em *Drosophila melanogaster*, e também está relacionada com esterases envolvidas na resistência a organofosforados como a B1 em *Culex pipiens* (38%) e E4 em *Myzus persicae* (30%) (NEWCOMB *et al.*, 1997).

Conclusões

As duas espécies *C.albiceps* e *C.megacephala* apresentam seis regiões para esterases com perfil eletroforético muito parecidas, não permitindo separar as espécies. Contudo os padrões de inibição das EST-5 e EST-6 permitiram identificá-las.

Agradecimentos

Agradecimento ao CNPq pela bolsa de iniciação científica concedida.

Referências

GRELLA, M.D.; SAVINO, A.G.; PAULO, D.F.; MENDES, F.M.; AZEREDO-ESPIN, A.M.L.; QUEIROZ, M.M.C.; THYSSEN, P.J.; LINHARES, A.X. Phenotypic polymorphism of *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) may lead to species misidentification. **Acta Trop.**, v. 141, p. 60-72, 2015.

HEALY, M.J.; DUMANCIC, M.M.; OAKESHOTT, J.G. Biochemical and physiological studies of soluble esterases from *Drosophila melanogaster*. **Biochem. Genet.**, v. 29, p. 365-388, 1991.

MARTINI, R.K., SHERMAN, R.A. Terapia de desbridamento com larvas. **J. Bras. Med.**, v. 5, p. 82-85, 2003.

NEWCOMB, R.D.; CAMPBELL, P.M.; RUSSEL, R.J.; OAKESHOTT, J.G. cDNA cloning, Baculovirus-Expression and kinetic properties of the esterase, E3, involved in organophosphorus resistance in *Lucilia curpina*. **Insect Biochem. Molec. Biol.**, v. 27, p. 15-25, 1997.

OLIVEIRA-COSTA, J. **Entomologia Forense: Quando os insetos são vestígios.** 3 ed. São Paulo: Millennium 2011.