

Método de extração subsequente de ácidos graxos e DNA genômico a partir de dípteros

AMANDA WEEGE DA SILVEIRA MERTINS¹; WILLIAM BORGES DOMINGUES²;
EDUARDO BIERHALS BLODORN²; KATHLEEN TAVARES WINKEL²; CLAUDIO
MARTIN PEREIRA DE PEREIRA²; VINICIUS FARIAS CAMPOS³

¹Universidade Federal de Pelotas – amandawege98@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – williamwwe@yahoo.com.br; edu.bblodorn@gmail.com;
claudiochemistry@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – fariascampos@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Chrysomya megacephala é uma espécie que apresenta distribuição mundial e é reportada como um dos necrófagos predominantes na colonização de carcaças. Os imaturos desenvolvem-se em substratos discretos e efêmeros, em matéria orgânica em decomposição, como fezes, carcaças e vísceras (ALVES, Ana Claudia; DOS SANTOS, Wellington, 2015). Por estar entre os primeiros e predominantes insetos envolvidos na decomposição cadavérica, pode ser utilizado como evidência criminal, sendo de grande interesse à entomologia forense (NETO, J.; GOMES, L., 2018). Os estágios imaturos podem auxiliar na estimativa de intervalo pós-morte, como amostra biológica para análise toxicológica, e ainda, para extração de DNA, auxiliando na identificação de vítimas e/ou suspeitos tendo em vista que se alimentam diretamente do cadáver (LÜ, Z. et al, 2014). A identificação adequada dos insetos é o elemento mais importante no campo da entomologia pois permite a utilização apropriada de dados de desenvolvimento e distribuição (VAIRO, K.; MELLO-PATIU, C.; DE CARVALHO, C., 2011). A quimiotaxonomia pode trazer muitos avanços para facilitar o trabalho pericial criminal, auxiliando na diferenciação de ordens de insetos através do perfil de ácidos graxos, uma vez que a composição lipídica é intrínseca à cada espécie.

Em relação aos ácidos graxos, a identificação é realizada pela extração desses compostos, utilizando metodologias baseadas em uma mistura de metanol e clorofórmio, porém a amostra necessita ser liofilizada e triturada (BRUM, A. A. S et al, 2009). Outra metodologia utilizando éter de petróleo e diclorometano vem sendo amplamente utilizada em insetos, onde não se tem necessidade de

liofilização e tritura do material, exigindo menor manipulação da amostra biológica e apresentando a vantagem de manter a ela intacta, podendo ainda ser utilizada para subsequentes análises taxonômicas e moleculares.

As metodologias convencionais utilizadas para extração de DNA genômico também requerem que todo, ou parte do espécime seja triturado, seguido por digestão das membranas celulares com proteases, e posterior uso de clorofórmio ou, álcool entre outros solventes orgânicos, para remoção de proteínas (BRITO, L. G. et al, 2004) e aumento da retenção de ácidos nucleicos em membrana de gel-sílica. Após essas etapas, o DNA genômico é separado e obtido em quantidade e qualidade satisfatórias. Os métodos convencionais ainda apresentam algumas desvantagens, como a destruição dos espécimes, que pode fazer com que informações importantes sejam perdidas, e a exigência do uso de solventes orgânicos, que não só podem causar danos ao operador, como também poluir o meio ambiente.

A ausência de um protocolo eficaz para a extração tanto ácidos graxos quanto DNA genômico a partir de um único indivíduo díptero tornou necessário o desenvolvimento de um método que resultasse na obtenção de ácidos graxos e DNA genômico livres de contaminantes biológicos, podendo ser aplicado em protocolos de bioquímica e biologia molecular, tais como cromatografia, reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento de DNA. Diante disso, a presente invenção teve como objetivo desenvolver um processo que permitisse a obtenção de ácidos graxos e DNA genômico de forma subsequente, a partir de indivíduos pertencentes à ordem Diptera.

2. METODOLOGIA

Cinco amostras de cada estágio de desenvolvimento da espécie *C. megacephala* (48h, 96h e adultos machos e fêmeas emergidos) foram coletadas e imersas em éter de petróleo, em seguida foram transferidas para uma solução de diclorometano em temperatura ambiente. Após a incubação em diclorometano, as amostras foram retiradas e armazenadas em tubos até a extração de DNA.

Para a extração de DNA genômico a amostra foi lavada com álcool 70% e posteriormente tratada com tampão de lise celular ATL (contido no kit comercial DNeasy Blood & Tissue Kit disponível pela Qiagen, Hilden, Alemanha) e proteinase K e incubada à 56°C para otimizar a lise das células. Posteriormente as amostras foram passadas por colunas com membranas de gel-sílica, foram

utilizados os buffers AL, AW1 e AW2 (contidos no DNeasy Blood & Tissue, disponível comercialmente pela Qiagen Hilden, Alemanha) para a separação e purificação do DNA. Após essas etapas o DNA foi eluído da membrana pela adição de água estéril. A concentração e qualidade do DNA extraído foram avaliadas por espectrofotometria. Posteriormente foi realizada a análise de expressão do gene HSP 70 por PCR em tempo real (qPCR).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na etapa de extração de DNA, levando em consideração a razão entre as absorbâncias 260nm e 280nm, todas as amostras extraídas apresentaram qualidade entre o intervalo considerado satisfatório de 1.7 à 1.9.

Em relação à concentração, as amostras de larvas com 48 h de desenvolvimento apresentaram média de 855 ± 45 ng/ μ l, enquanto que amostras extraídas de pré-pupas (96 h) apresentaram média de 1150 ± 60 ng/ μ l. E as amostras de DNA obtidas a partir de adultos macho e fêmea apresentaram concentrações de 1860 ± 50 ng/ μ l e 2115 ± 120 ng/ μ l, respectivamente.

Proteínas de choque térmico (*Heat Shock Proteins*, Hsps) são importantes chaperonas, as quais estão envolvidas em diferentes vias de sinalização e regulação de processos celulares. Estudos anteriores sugerem que algumas proteínas de choque térmico, como a HSP70, podem estar envolvidas diretamente no desenvolvimento de insetos (MARTÍNEZ-PAZ, P. et al.,2014). A análise da expressão do gene da HSP70 foi realizada para os 4 grupos experimentais: larvas (48h), pré-pupas (96h) e adultos emergidos (machos e fêmeas). A eficiência das reações de qPCR se apresentaram dentro de um limite considerado satisfatório para a análise da expressão gênica relativa. Os valores de coeficiente de correlação obtidos confirmaram de não houve qualquer tipo de contaminantes biológicos presentes nas amostras.

4. CONCLUSÕES

Através da metodologia desenvolvida pelo nosso grupo de pesquisa foi possível realizar a extração subsequente de ácidos graxos e DNA genômico a partir de dípteros com sucesso, e realizar a identificação do estágio de desenvolvimento de *C. megacephala* através da comparação dos perfis de ácido graxos bem como de expressão gênica obtidos com perfis previamente conhecidos em experimentação e literatura no campo da pesquisa científica.

A metodologia encontra-se registrada na forma de Patente de Invenção e depositado no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI), sob o número de acesso BR1020170264297, podendo vir a ser transferida para o setor privado.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

NETO, José de Jesus Corrêa; GOMES, Leonardo. Abundância e flutuação populacional de *Chrysomya albiceps* (Wiedmam, 1819)(Diptera: Calliphoridae) associadas à carcaças de *Sus scrofa* L, 1758 na Ilha do Marajó, Pará, Brasil. **Revista Brasileira de Zootecias**, v. 19, n. 1, 2018.

LÜ, Zhou et al. Effects of Ketamine on the Development of forensically important Blowfly *Chrysomya megacephala* (F.)(Diptera: Calliphoridae) and its Forensic Relevance. **Journal of forensic sciences**, v. 59, n. 4, p. 991-996, 2014.

WANG, Xiaoyun et al. *Chrysomya megacephala* larvae feeding favourably influences manure microbiome, heavy metal stability and greenhouse gas emissions. **Microbial biotechnology**, v. 11, n. 3, p. 498-509, 2018

ALVES, Ana Claudia Firmino; DOS SANTOS, Wellington Emanuel; CREÃO-DUARTE, Antonio José. Diptera (Insecta) de importância forense da região Neotropical. **Entomotropica**, v. 29, n. 2, p. 77-94, 2014

VAIRO, Karine Pinto; MELLO-PATIU, Cátia Antunes de; DE CARVALHO, Claudio JB. Pictorial identification key for species of Sarcophagidae (Diptera) of potential forensic importance in southern Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 55, n. 3, p. 333-347, 2011.

BRUM, Aelson Aloir Santana et al. Métodos de extração e qualidade da fração lipídica de matérias-primas de origem vegetal e animal. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 849-854, 2009.

BRITO, L. G. et al. Avaliação de diferentes protocolos de extração de DNA celular a partir de adultos de *Haematobia irritans* (Linnaeus, 1758)(Diptera: Muscidae). **Embrapa Pecuária Sudeste-Artigo em periódico (ALICE)**

MARTÍNEZ-PAZ, Pedro et al. Characterization of the small heat shock protein Hsp27 gene in *Chironomus riparius* (Diptera) and its expression profile in response to temperature changes and xenobiotic exposures. **Cell Stress and Chaperones**, v. 19, n. 4, p. 529-540, 2014.