

13ª JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

BIOMEDICINA

EFEITO DA PROGESTERONA/ESTRADIOL NO DESENVOLVIMENTO PÓS- EMBRIONÁRIO LUCILIA CUPRINA (WIEDEMANN, 1830) DIPTERA: CALLIPHORIDAE): IMPLICAÇÕES EM ENTOMOLOGIA FORENSE

¹ Daniela Procaci de Araujo (IC UNIRIO); ¹ Marcela Teixeira Rebello (IC CNPq-PIBIC); ¹ Rafaela Pereira de Carvalho (Mestrado PPGBIO UNIRIO); ¹ Adriana Leal de Figueiredo (Mestrado PPGBIO UNIRIO); ¹ Wellington Thadeu de Alcantara Azevedo (Mestrado PPGBIO UNIRIO); ¹ Cláudia Soares Santos Lessa; ¹ Renato Geraldo da Silva Filho; ¹ Valéria Magalhães Aguiar (orientadora)

1 - Departamento de Microbiologia e Parasitologia; Instituto Biomédico; Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro. Apoio financeiro: CNPq; FAPERJ; UNIRIO.

Palavras-chave: dieta larval, biologia, entomotoxicologia.

INTRODUÇÃO

Corpos de animais em decomposição atraem uma grande variedade de organismos, dos quais os artrópodes constituem fauna dominante utilizando este micro-habitat temporário para se alimentar, viver e procriar (VON ZUBEN, 2001). Por esta razão, e também por serem geralmente os primeiros a encontrar o corpo em decomposição, os insetos podem ser utilizados em investigações criminais, auxiliando no cálculo da estimativa de intervalo pós-morte (IPM) (CATTS e GOFF, 1992). Sendo necessário conhecer o tempo de desenvolvimento das espécies que colonizam os cadáveres e a sucessão de insetos nas carcaças, além da dispersão larval pós-alimentar (VON ZUBEN, 2001; CARVALHO et al. 2004).

A taxa de desenvolvimento dos insetos necrófagos pode ser afetada por substâncias introduzidas no seu organismo através da sua alimentação (INTRONA et al. 2001) podendo afetar estudos como o IPM (ESTRADA et al. 2009). Desta forma, é importante analisar que tipo de influência determinada substância exerce sobre cada espécie. Ferraz et al., (2012) verificaram que o antibiótico ciproflaxacino testado em diferentes concentrações não alterou o desenvolvimento pós-embrionário de *Chrysomya putoria*. No entanto (Ferrari et al. em 2008) avaliaram a ação do hormônio masculino sobre o desenvolvimento de *Chrysomya albiceps* e constataram um aumento da taxa desenvolvimento do inseto. Porém, não se sabe qual o efeito que do hormônio feminino apresenta sobre o desenvolvimento do inseto.

NOREGYN® é um medicamento indicada para prevenir a gravidez, contraceptivo hormonal injetável que contém uma combinação de dois hormônios femininos: o enantato de noretisterona (um progestágeno) e o valerato de estradiol (um estrogênio). O medicamento apresenta em sua composição injetável, ampola de 1mL enantato de noretisterona (50mg), valerato de estradiol (5 mg), benzoato de benzila e óleo de rícino (1mL). É conhecido pelo nome genérico de enantato de noretisterona (DCB 06493) + valerato de estradiol (DCB 03612), apresentado como solução injetável – 50 mg/mL + 5 mg/mL – Embalagem contendo 1 ampola de 1 mL + seringa.

Alguns autores já criaram e testaram novas dietas para *Chrysomya megacephala* em laboratório, atestando que para criação em laboratório deve-se buscar uma dieta larval que potencialize o desenvolvimento do inseto a baixo custo (BARBOSA et al., 2004; DALLAVECCHIA et al. 2008; SOUZA et al., 2010). A moela de frango é potencialmente positiva como dieta para criar dípteros em laboratório, visto que é um produto acessível, possui custo inferior à dieta tradicionalmente utilizada, além disso, o conteúdo nutricional em moela de frango é semelhante à carne bovina (ESPOSITO et al. 2009). FERRAZ et al. (2011) utilizaram uma dieta a base de Ágar moela para criação de *Chrysomya putoria*, a qual se mostrou muito eficiente. A utilização do Ágar em dietas para insetos é muito comum, pois este proporciona consistência às mesmas, que geralmente, após preparo, obtém aspecto pastoso ou líquido. O que é uma vantagem, pois possibilidade adicionar substâncias químicas a serem testadas sobre o desenvolvimento dos insetos.

Responsável pela transmissão de microorganismos patogênicos de importância médica e sanitária *Lucilia cuprina* mantém alto grau de associação com ambientes modificados pelo homem, sendo comumente encontrada em carcaças e lixões (LINHARES, 1981; FERREIRA e LACERDA, 1993). É uma espécie dominante durante a fase de decomposição ativa de carcaças, sendo responsabilizada por parte da remoção destas. Além disso, a importância das larvas desta espécie como causadora de miíases primárias em ovinos e no homem, foi vastamente relatada na literatura internacional (DALLWITZ et al. 1984; TOWNEND, 1987; HALL e WALL, 1995), bem como sua utilização como indicadora forense em estudos de Medicina Legal (O'FLYNN, 1983; DAVIES e RATCLIFFE, 1994).

Estudar a influência que hormônios femininos exercem sobre o desenvolvimento deste díptero trará informações úteis a serem aplicadas na entomologia forense.

OBJETIVO

Objetivou-se avaliar a influência do hormônio feminino progesterona/ estradiol sobre o desenvolvimento pós-embrionário de *Lucilia cuprina*.

METODOLOGIA

A criação dos dípteros utilizados em toda a parte experimental foram realizadas no Laboratório de Estudos de Dípteros (LED), Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO).

A colônia de *L. cuprina* foi iniciada com adultos coletados em uma zona rural do município de Rio Bonito, localizada no estado do Rio de Janeiro. Foram utilizadas três armadilhas seguindo o modelo de MELLO et al. (2007), contendo sardinha como isca e expostas por aproximadamente 5 horas, na parte

13ª JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

da manhã. Após a coleta dos adultos e das larvas de dípteros muscóides, os insetos foram levados para o LED, onde foi feita a triagem e a identificação taxonômica dos mesmos de acordo com Mello (2003).

As moscas foram criadas em gaiolas de plástico transparente (40x30x20cm) com abertura na parte superior para arejamento e abertura frontal revestida com tecido escaline em forma de manga de camisa para permitir o acesso ao interior da gaiola, sendo alimentadas com água, solução de mel e água (50 %) e moela de frango ou carne bovina como fonte de proteínas, substrato de oviposição e maturação de ovários. A metodologia de criação seguiu descrição de Barbosa et al. (2004) e Ferraz et al. (2011b).

As larvas de primeiro instar da 3ª geração em laboratório foram transferidas com o uso de pincel fino para becheres de vidro de 100mL contendo 60 gramas de dieta de homogenato de moela em Agar 65% (Ferraz et al. 2012) em cada. A dieta foi selecionada por ser prática para homogeneizar substâncias a serem testadas e estéril (autoclavada), o que torna o anticoncepcional totalmente disponível para agir somente nas larvas inseridas.

O anticoncepcional utilizado foi Noregyna[®] enantato de norestisterona (DCB 06493) + valerato de estradiol (DCB 03612). Foram realizados dois tratamentos, no primeiro tratamento cada repetição recebeu 1mL do anticoncepcional a concentração de 10µg/mL e no segundo tratamento cada repetição recebeu o mesmo volume de medicamento a concentração de 100µg/mL.

As concentrações foram escolhidas a partir da concentração sérica de progesterona (representadas no medicamento na forma sintética- enantato de norestisterona. Na fase folicular, a progesterona (sérica ou plasmática) tem valor médio de 1 ng/mL, elevando-se após a ovulação até uma taxa média de 10 ng/mL (T1), mantida por 7 a 10 dias. Uma única dosagem entre o 21º e o 23º dias do ciclo é suficiente para defini-la. Na gravidez a progesterona eleva-se acompanhando a gonadotrofina coriônica até 8 a 10 semanas, quando decresce momentaneamente, para em seguida elevar-se novamente, o que traduz a origem placentária em substituição ao corpo amarelo gravídico. Na primeira elevação atinge 20 a 30 ng/mL, e quando volta a subir, a normalidade traduz-se por valores acima de 40 ng/mL, (T2 de 100 ng/mL) ao mesmo tempo que se desfaz o pico gonadotrófico. A partir daí a ascensão é regular, alcançando números entre 160 e 200 ng/mL, no final da gestação.

Cada concentração do antibiótico testado e o controle foram replicados quatro vezes, sendo 40 larvas para cada repetição.

Foram realizados dois controle um constituído de homogenato Ágar-moela, a qual foi adicionada 1 mL óleo de rícino, base do antibiótico, e outro sem adição desta substância.

Cada béquer de cada repetição foi inserido em outro béquer maior (400 mL) contendo serragem esterilizada para permitir a pupariação das larvas maduras após o abandono da dieta e vedado com escaline e elástico. Os tratamentos foram mantidas em câmara climatizada a 28°C dia e 27°C noite, 70 + 10% U.R. e 14 horas de fotoperíodo. Foram realizadas observações diárias sempre no mesmo horário (12h).

A massa corporal das larvas, após abandono da dieta, foram registradas em lotes de cinco em balança analítica e armazenadas em tubos de ensaio vedados com tecido de náilon e elástico para observação da emergência. Foram acompanhadas as datas de pupariação, emergência e a razão sexual, assim como anormalidades morfológicas dos adultos.

Para a análise bruta dos dados utilizou-se o programa Microsoft Excel e para as demais análises o programa PAST. A variação entre as médias da massa corporal de larvas e as durações dos estágios larvais, pupais e totais (neolarvas a adultos) foram analisadas por meio do Teste t de Student ($\alpha=5\%$). As viabilidades e as taxas de normalidade foram comparadas por ANOVA. A razão sexual foi testada em relação à frequência esperada, pelo teste do qui-quadrado (χ^2).

RESULTADOS

A colônia de *Lucilia eximia* foi estabelecida em laboratório com sucesso. A criação desta espécie de mosca varejeira no Laboratório de Estudo e Dípteros da UNIRIO é inédito, pois foi a primeira tentativa de estabelecimento e manutenção destes dípteros por nossa equipe de trabalho. Este fato, provavelmente justifica a necessidade de repetir o experimento biológico conduzido com insetos pertencentes a 3ª geração de laboratório, cujos resultados foram inconclusivos.

REFERÊNCIAS

- Barbosa, L. S., Jesus, D. M. L. & Aguiar-Coelho, V. M. Longevidade e capacidade reprodutiva de casais agrupados de *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) (Diptera: Calliphoridae) oriundos de larvas criadas em dieta natural e oligídica. *Revista Brasileira de Zoociências* 6: 207-217; 2004.
- Carvalho, LML. 2004. Detecção e efeito de drogas no desenvolvimento de formas imaturas e adultas de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) e *Chrysomya putoria* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae), duas moscas varejeiras de interesse forense. Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Parasitologia.
- Carvalho, L.M.L., Thyssen, P.J., Goff, M.L. & Linhares, A.X. 2004. Observations on the succession patterns of necrophagous insects onto a pig carcass in an urban area of Southeastern Brazil. *Aggrawal's Internet Journal of Forensic Medicine and Toxicology*, 5(1): 33-39.
- Catts, E. P. & Goff, M. L. 1992. Forensic entomology in criminal investigations. *Annual Review of Entomology*, 37: 253-272.
- Dallavecchia, D.L.; Ferraz, A.C.C.; Miranda, G.S.; Aguiar-Coelho, V.M.A. Desenvolvimento Ontogenético de *Chrysomya megacephala* (diptera: Calliphoridae) em dieta natural, sob condições controladas. In: 7º JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, UNIRIO, RIO DE JANEIRO, P. 77-79, 2008.
- Dallwitz, R.; Roberts, J.A; Kitching, R.L. Factors determining the predominance of *Lucilia cuprina* larvae in blowfly strikes of sheep in southern new south wales. *Journal of the Australian Entomological Society*, v. 23, n. 3, p. 175-177, 1984.

13ª JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

- Davies, L.; Ratcliffe, G.G. Development rates of some preadult stage in blowflies with reference to low temperature. *Medical and Veterinary Entomology*, v. 8, n. 3, p. 245-254, 1994.
- Esposito, A. B. M.; Lima, C. C.; Souza, F. N.; Ribas, F.; Korolhuk, J.; Luz, K. C.; Munaro, V.; Ribas, A. R.; Balbi, M. E. Avaliação de miúdos de *Gallus domesticus* como fonte proteica. *Visão Acadêmica*, Curitiba, v. 10, n. 2, p. 59-74, 2009.
- Estrada DA, Grella MD, Thyssen PJ, Linhares AX. 2009. Taxa de Desenvolvimento de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) em Dieta Artificial Acrescida de Tecido Animal para Uso Forense. *Neotropical Entomology* 38(2): 203-207
- Introna F, Campobasso CP, Goff ML. 2001. Entomotoxicology. *Forensic Science International* 120: 42-47.
- Ferreira, M.J.M. & P.V. Lacerda. 1993. Muscóides sinantropicos associados ao lixo urbano de Goiânia-GO. *Revista Brasileira de Zool.* 10 (2): 185-195. 1993.
- Hall, M.; Wall, R. Myiasis of humans and domestic animals. *Advances in Parasitology*, v. 35, p. 257- 334, 1995.
- Linhares, A. X. 1981. Synantropy of Calliphoridae and Sarcophagidae (Diptera) in the city of Campinas, São Paulo, Brazil. *Revista Brasileira de Entomologia*, São Paulo, 25(3):189-215. 1981)
- O'flynn, M.A. The sucession and rate of development of blowflies in carrion in Southern Queensland and the application of these data to forensic entomology. *Journal of Entomological Science*, v. 22, n. 2, p. 137-148, 1983.
- Sousa, A.G.P.; Ferraz, A.C.P.; Nascimento, A.L.O. & Aguiar-Coelho, V.M. Alternative natural diet for the creation of immature oriental latrine flies under controlled conditions. *Revista Brasileira de Zootecias*, no prelo, 2010.
- Twinn, C. Sheep strike and mulesing. *Parasitology Today*, v. 11, p. 252-261, 1987.
- Von Zuben, C.J. 2001. *Zoologia Aplicada: Recentes avanços em estudos de entomologia forense*. *Entomologia y Vectores*, 8(2): 173-183.