

UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Identificação de DNA Vertebrado a Partir do Conteúdo Gastrointestinal de Larvas de
Dípteras Necrofágicas.

Autor: Wedney Rodolpho de Oliveira
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Carina Elisei de Oliveira

Campo Grande
Mato Grosso do Sul
Agosto - 2014

UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Identificação de DNA vertebrado a partir do conteúdo gastrointestinal de larvas de dípteras necrofágicas.

Autor: Wedney Rodolpho de Oliveira.
Orientadora: Prof^a Dr^a. Carina Elisei de Oliveira.

Dissertação apresentada para fins de obtenção do título de MESTRE EM BIOTECNOLOGIA, no Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Católica Dom Bosco - Área de Concentração: Biotecnologia aplicada à saúde.

Campo Grande
Mato Grosso do Sul
Agosto - 2014

Ficha catalográfica

Oliveira, Wedney Rodolpho de
O48i Identificação de DNA vertebrado a partir do conteúdo gastrointestinal
de larvas de dípteras necrofágicas / Wedney Rodolpho de Oliveira;
orientação Carina Elisei de Oliveira. 2014
53 f.

Dissertação (mestrado em biotecnologia) – Universidade Católica Dom
Bosco, Campo Grande, 2014.

1. Entomologia forense 2. Perícia criminal 3. Tanatologia I. Oliveira,
Carina Elisei de II. Título

CDD – 595.7



UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
Valorizando talentos

**Identificação de DNA de Vertebrado a partir do Conteúdo Gastrointestinal
de Larvas Necrofagias de Dipteras**

Autor: Wedney Rodolpho de Oliveira
Orientadora: Profa. Dra. Carina Elisei de Oliveira

TITULAÇÃO: Mestre em Biotecnologia
Área de concentração: Biotecnologia Aplicada à Saúde.

APROVADO em 28 de agosto de 2014.

Profa. Dra. Carina Elisei de Oliveira - UCDB
(orientadora)

Profa. Dra. Gracia Maria Soares Rosinha - EMBRAPA

Profa. Dra. Antonia Railda Roel - UCDB

Profa. Dra. Jania de Rezende- UCDB

EPÍGRAFE

“Ta lá o corpo estendido no chão, em vez de um rosto uma foto de um gol.

Em vez de reza uma praga de alguém, e um silêncio servindo de amém. O bar mais perto de pressa lotou, malandro junto com trabalhador.

Um homem subiu na mesa do bar, e fez discurso pra vereador.

Veio camelô vender anel, cordão, perfume barato, e a baiana pra fazer pastel e um bom churrasco de gato.

Quatro horas da manhã baixou o santo na porta bandeira.

E a moçada resolveu parar, e então...

Ta lá o corpo estendido no chão, em vez de um rosto uma foto de um gol, em vez de reza uma praga de alguém, e um silêncio servindo de amém.

Sem pressa, foi cada um pro seu lado pensando numa mulher ou num time olhei o corpo no chão e fechei minha janela de frente pro crime.”

(De Frente pro Crime, estendido no chão
João Bosco e Aldir Blanc)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por me dar forças, sabedoria e paciência necessárias e, por ter me permitido concluir mais esta importante etapa de minha vida, superando todas as dificuldades encontradas à frente.

À minha orientadora, Professora Doutora Carina Elisei de Oliveira por sua dedicação, presteza, paciência, palavras trocadas, ideias discutidas todas as vezes que precisei.

À Maria Helena, Técnica do Laboratório de Biologia Molecular, por sua dedicação e persistência nos andamentos dos trabalhos laboratoriais e que sem a qual, certamente não alcançaria este momento.

À equipe de estagiários do Laboratório de Biologia Molecular, em especial às alunas Laís Albuquerque e Rafaela Prioste pelo auxílio na execução deste trabalho.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a conclusão deste trabalho monográfico que me apoiaram e foram meu refúgio todas as vezes que as dificuldades surgiram.

BIOGRAFIA DO AUTOR

WEDNEY RODOLPHO DE OLIVEIRA nasceu no interior de São Paulo, passando a residir no ano de 1984, no Estado de Mato Grosso do Sul.

No ano de 2001 formou-se no curso de Direito pela Universidade Católica Dom Bosco, em Campo Grande, MS.

Desde julho de 2002, é Perito Criminal Oficial do Estado de Mato Grosso do Sul.

No ano de 2004, realizou curso de Capacitação em Entomologia Forense pela Universidade de Brasília, em Brasília, DF.

A partir de setembro de 2006, até o presente momento, é professor do Curso de Direito e Biologia da Universidade Católica Dom Bosco.

Em 2007, tornou-se Especialista em Direito Criminal pelo Centro de Pós-Graduação pela Universidade Católica Dom Bosco, em Campo Grande, MS.

Graduado Bacharel e licenciatura no Curso de Ciências Biológicas, pela Universidade Anhanguera/Uniderp, em Campo Grande, MS.

No mês de julho de 2012 ingressou no Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia à nível de Mestrado, Biotecnologia aplicada à Saúde, na Universidade Católica Dom Bosco, realizando estudo na área de Biologia Molecular.

SUMÁRIO

	Página
EPIGRAFE	V
AGRADECIMENTOS	VI
BIOGRAFIA DO AUTOR	VII
RESUMO	09
ABSTRACT	10
1- INTRODUÇÃO	11
2- REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 Conceito de Perícia Criminal.....	13
2.2 A Importância da Perícia Criminal.....	14
2.3 O local de crime de morte violenta.....	14
2.4 Locais de achado de cadáver em estado tanatológico.....	15
2.5 A evolução da Entomologia Forense e sua aplicação na resolução de casos.....	16
2.6 Entomofauna de interesse forense.....	19
2.7 Análise genética.....	25
3. REFERÊNCIAS	31
4. OBJETIVOS	36
4.1 Objetivo Geral	36
4.2 Objetivos Específicos	36
5. ARTIGO CIENTÍFICO: Identificação de DNA Vertebrado a Partir do Conteúdo Gastrointestinal de Larvas de dípteras Necrofágicas	37
Resumo.....	37
Abstract.....	38
Introdução.....	39
Materiais e Métodos.....	40
Resultados e discussão.....	43
Conclusão.....	49
Referências.....	50

RESUMO

Larvas e adultos de insetos encontrados em cadáveres fornecem evidências importantes para a estimativa sobre o intervalo pós-morte. Determinar o ínstar de espécimes de insetos imaturos coletados a partir de um cadáver pode ser uma maneira eficiente para analisar os casos de interesse forense, pois os ovos de dípteras são geralmente depositados no cadáver após sua morte. A análise forense de DNA recuperado a partir do intestino das larvas de dípteras pode ser usado para identificar do que estas se alimentaram. Considerando-se que a aplicação da ciência forense para investigação do crime envolve rotineiramente identificação das espécies genéticas com base na similaridade de sequência de DNA. Objetivou-se neste estudo detectar DNA de vertebrados, a partir do conteúdo gastrointestinal de larvas de dípteras necrofágicas, através da utilização de técnicas moleculares, amplificando por PCR o gene da leptina (*lep*), específico para os vertebrados. Neste estudo foi demonstrado que os dados de sequência do gene *lep* podem ser obtidos a partir do conteúdo gastrointestinal dissecado de uma larva que se alimentou do tecido dos vertebrados. No entanto, considerando que análise do conteúdo a partir do trato digestório das larvas é uma técnica recente, ainda existem muitas limitações técnicas que não foram exploradas.

Palavras-chave: Perícia criminal, estado tanatológico, entomologia forense. gene *lep*, *Calliphoridae*.

ABSTRACT

Larvae and adult insects found on corpses provide important evidence for the estimation of the postmortem interval. Determine the instar specimens of immature insects collected from a corpse can be an efficient way to analyze the cases of forensic interest because of dipterous eggs are usually deposited on the corpse after his death. Forensic analysis of DNA recovered from the intestine dipterous larvae can be used to identify which of these are fed. Considering that the application of forensic science to crime investigation routinely involves identification of the genetic species based on DNA sequence similarity. The objective of this study was to detect vertebrate DNA from the gastrointestinal contents necrofágicas dipterous larvae, by using molecular techniques, the gene by PCR amplifying the leptin (LEP), specific to vertebrates. In this study it was shown that the data sequence of the LEP gene may be obtained from a gastrointestinal contents dissected larvae that fed on the tissue of vertebrates. However, considering that the content analysis from the digestive tract of the larvae is a recent technique, there are still many technical limitations that have not been explored

Keywords: Criminal forensics, tanatological state, forensic entomology, lep gene, *Calliphoridae*

1 - INTRODUÇÃO

Ao apreciar uma obra feita pelo artista geralmente não nos admiramos apenas por sua geometria ou dimensões, o que nos chama a atenção na verdade, são os pequenos detalhes e, quanto mais delineada a obra mais valiosa esta é. Assim é o trabalho do entomologista forense, que busca nos detalhes e nas minúcias provenientes da entomologia, provas robustas à elucidação dos crimes, conhecendo as características e oportunidades que os seres e insetos intimamente conectados à cena do crime podem apresentar como vestígio das mais diversas áreas do conhecimento biológico e, o que passaria despercebido pela maioria dos observadores.

A entomologia forense consiste no estudo da interação dos insetos com o corpo em decomposição, caracteriza-se pelo estudo desses e outros artrópodes associados a diversas questões criminais, servindo assim, como uma ferramenta auxiliar em procedimentos legais. Dessa forma, e considerada como a disciplina científica que interpreta as informações fornecidas pelos insetos (OLIVEIRA-COSTA, 2003).

A determinação do intervalo de colonização tanatológica de um cadáver tem sido o principal tema de entomologistas forenses desde o século XIX. O método utilizado se baseia nas fases de desenvolvimento dos artrópodes, especialmente de larvas de moscas, com relação à sua idade. A principal vantagem deste método frente à metodologia padrão para a determinação do intervalo pós-morte, tais como, a depressão da temperatura corporal, hipóstases e rigidez, é que os artrópodes podem representar uma medida precisa mesmo em fases posteriores do intervalo pós-morte, quando os métodos clássicos falham (BENECKE, 2005).

Na investigação de um crime muitas vezes o estado de putrefação e a base orgânica da maneira com que é encontrado o cadáver, não é mais eficiente para detecção do DNA por meio de técnicas moleculares tradicionais

como: a reação em cadeia da polimerase (PCR) e o sequenciamento, ou torna esta análise extremamente dificultosa. Sabe-se ainda que a utilização de ossos não tenha se mostrado eficiente devido à aparente interferência do cálcio na PCR e o tempo de que demanda para extração de material genético em ossos pela prática forense.

Insetos de interesse forense são bioindicadores e, neste trabalho foram utilizados como fonte de material genético, pois se buscou o protocolo adequado para coleta e preparação do DNA de vertebrados encontrados no interior do tubo digestório de larvas necrofágicas para fins futuros da aplicação na identificação de vítimas em estado tanatológico.

Deste modo, buscou-se com a execução deste trabalho, a conexão entre a observação dos detalhes entomológicos, com a vasta possibilidade de inovações trazidas pela entomologia forense em futuras aplicações em casos de crimes contra a vida.

Assim, para garantir a fidelidade da aplicação de técnicas moleculares em investigações periciais é necessária a padronização e a comprovação da eficiência desta técnica aplicada no qual, neste estudo, foi realizado o primeiro passo no extenso caminho de inovação tecnológica da possibilidade de se encontrar material genético da vítima em tubos digestórios de larvas necrofágicas.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Conceito de Perícia Criminal

A Perícia criminal alcança as mais diversas áreas do conhecimento desde a medicina legal à criminalística, sendo especialmente dividida em subáreas ou capítulos.

Já a entomologia forense trata basicamente das questões de identidade e identificação do cadáver a partir do estudo dos insetos (OLIVEIRA-COSTA, 2003).

Por sua vez, a genética forense está relacionada à determinação de paternidade, identificação por meio do DNA e casos ligados à herança genética.

A criminologia preocupada com a origem e dinâmica do crime, particularmente sob o aspecto do criminoso e da vítima. A tanatologia forense que, como o próprio nome sugere (*thanatos* – grego = morte; *logus* = estudo) que possui por fundamento o estudo da morte, assim como os fenômenos desta decorrentes (DEL CAMPO, 2012).

Percebe-se assim, a aplicação autônoma e holística da perícia no mundo científico, e suas diversas implicações na realidade da busca da elucidação de fatos criminosos. Desde modo, o conceito de perícia se aglutina ao da criminalística. Podendo-se resumir o conceito de criminalística como: “Ciência que estuda os vestígios deixados pelo crime no local do fato, objetivando a sua comprovação e a identificação do criminoso” (CROCCE, 2012).

Assim, a criminalística é a disciplina que cogita do reconhecimento e análise dos vestígios extrínsecos relacionados com o crime ou com a identificação de seus participantes (DOREA, 2003).

2.2. A Importância da Perícia Criminal

A legislação brasileira relaciona que: “se não há prova, não há crime”. Deste modo, o Código de processo penal cita em seu artigo 386 que: “O juiz absolverá o réu (...) se, parágrafo II: “não haver prova da existência do fato”. Desse costume, pode-se dizer que, se o corpo da vítima não for encontrado, ou não for reconhecido, não há como condenar ou acusar o criminoso, acarretando prejuízo a toda a sociedade.

Percebe-se assim a importância da prova pericial, pois ao Perito criminal resta como função a produção da materialidade do fato criminoso, sua dinâmica e apontamento da autoria, todas estas provas denominadas materiais, sendo estas imutáveis.

Por determinação expressa do código de processo penal brasileiro, toda vez que restarem vestígios materiais decorrentes das infrações penais a prova pericial será imprescindível (JESUS, 2014).

O Perito ao elaborar um laudo está inferindo todos os elementos de certeza sobre o fato delituoso e todos os elementos materiais decorrem de sua interpretação que resultarão na apreciação por parte do magistrado que irá analisar o conjunto probatório carreado nos autos (CROCCE, 2012).

O próprio legislador em 1941, já anteviu a importância da prova científica, prevendo no artigo 158 do código de processo penal que “o juiz formulará sua convicção pela livre apreciação da prova”. A importância pericial consiste ainda na previsão das nulidades do artigo 564, inciso III, alínea b do Código de processo penal em que: “a nulidade ocorrerá nos seguintes casos... por falta das fórmulas ou dos termos seguintes... o exame de corpo de delito nos crimes que deixem vestígios” (DOREA, 2003).

2.3. O local de crime de morte violenta.

O perito de campo, devido à natureza abrangente de sua profissão, ao iniciar seus trabalhos nunca sabe com o que vai se deparar em seu plantão, quando em um mesmo dia se depara com casos triviais até aqueles mais complexos. Destaca-se ainda a problemática de que, no Brasil não há uma política de preservação do local do crime, que ainda carece de um grande

esforço por parte das autoridades no sentido de que a própria população não altere as condições de preservação da cena do crime

Dentre os trabalhos periciais, os locais de achado tanatológico são aqueles que realmente se destacam como os mais enternecedores aos profissionais da área, sendo que poucos se dedicam nesta modalidade (CROCCE, 2012).

Estudos indicam que a análise do conteúdo gastrointestinal de vermes pode ser usada para revelar o DNA de uma vítima. No entanto, esta abordagem não tem sido utilizada até hoje em investigações legais devido à não determinação de um protocolo definitivo e, portanto, sua utilidade prática é desconhecida (CAMPOBASSO *et al.* 2005).

2.4 Locais de achado de cadáver em estado tanatológico.

Quando em locais de morte violenta o profissional se depara com um cadáver humano em estado tanatológico, as condições do organismo e do ambiente impõem ao profissional uma gama de sensações organolépticas e sociais que requerem uma preparação psicológica anterior bastante sólida.

Ocorre que, muitas vezes devido ao estado de conservação do cadáver achado, a identificação visual se torna inviável ou impossível, pois o corpo em estado tanatológico adquire modificações visuais bastante severas e que se acentuam com o decurso de tempo.

Um cadáver tanatológico possui as seguintes características: Inicia-se com a autólise, resultante da alteração do pH e pressão osmótica do corpo após a morte, decorrendo no rompimento das membranas celulares e desintegrando os tecidos, esta acidificação é sinal evidente de morte, podendo ser comprovada com o uso de indicadores, tratando-se de fase inicial do fenômeno destrutivo tanatológico, a fase de putrefação acontece logo após a fase de autólise, devido à ação de bactérias aeróbias e anaeróbias, iniciando-se no intestino grosso na chamada “mancha verde abdominal”, tomando conta de todo o organismo, a fase cromática surge entre 20 e 24 horas após o óbito e pode durar até sete dias. Inicia-se, novamente, pela mancha verde abdominal da fossa ilíaca (DEL-CAMPO, 2012).

A fase gasosa decorre dos gases da putrefação que são formados no interior do corpo e fazem com que o cadáver adquira uma aparência de agigantamento, com destacamento da epiderme, com presença de grande quantidade de bolhas com conteúdo sero-sanguinolento. Esta fase inicia-se de dois a sete dias após o óbito e pode durar de sete a trinta dias ou até a fase de esqueletização (DEL-CAMPO, 2012).

O odor decorrente desta fase pode ser descrito como pútrido e penetrante que persiste no tempo, sendo de difícil condução nestes locais por parte do perito (CROCCE, 2012).

Tendo em vista ainda as grandes dimensões com vazios demográficos do Estado de Mato Grosso do Sul, muitas vezes quando do encontro de cadáveres humanos, estes já se apresentam em adiantado estado tanatológico o que impede o reconhecimento visual da pessoa e, muitas vezes, seu estado de conservação já se encontra em nível de fragmentação que dirimi ou impede a análise de seu perfil genético com base em seu material orgânico direto.

Fatores mesológicos como altitude, clima, vegetação determinam a distribuição de espécies necrófagas nas regiões tropicais (CORRÊA, 2010).

Devido à estes fatores organolépticos, a maior dificuldade que os peritos criminais enfrentam na identificação de cadáveres em estado tanatológico é que, sua conservação e época de encontro, tratam-se de fatores preponderantes à sua identificação.

2.5. A evolução da Entomologia Forense e sua aplicação na resolução de casos.

O primeiro caso de entomologia forense citado em manuais de medicina legal ocorreu na China medieval no ano de 1235. Um assassinato no campo de arroz levou a uma investigação, onde a autoridade policial, no dia seguinte, pediu que todos os trabalhadores colocassem suas foices no chão. Moscas foram atraídas pelo sangue de uma determinada foice. O autor, dono dessa foice, sentindo-se pressionado acabou por confessar o crime. Mas o primeiro caso incluindo a estimativa de intervalo pós-morte ocorreu na modernidade descrito por Bergeret em 1855 (*apud* CRUZ, 2014).

Entretanto, essa ciência só se tornou popular após 1894, com a publicação do livro “Le faune des cadavres” escrito por Mégnin. Este trabalho expande sua teoria anterior de quatro ondas de insetos para oito ondas sucessivas em corpos expostos livremente, e duas ondas para corpos enterrados (MACIEL, 2014).

No Brasil, foram realizadas pesquisas bem sucedidas, apesar das dificuldades relacionadas a dados taxonômicos, biológicos, técnicos e biodiversidade (DIAS, 2009). Entre os pesquisadores pode-se citar Oscar Freire e Roquete Pinto que trabalharam entre 1900 e 1930 (PUJOL-LUZ, 2008).

Depois o assunto permaneceu esquecido durante anos no Brasil, apesar do desenvolvimento da entomologia forense continuar mundialmente (OLIVEIRA-COSTA, 2003).

Atualmente vem crescendo o interesse de cientistas forenses e pessoas ligadas a instituições judiciais em como conduzir a entomologia junto a outras técnicas de investigação em caso de morte (CUNHA, 2013).

Entomologia forense é o estudo dos insetos, ácaros e outros artrópodes associados a um cadáver humano vítima de morte violenta, para se determinar o tempo da morte e quando possível, deduzir as circunstâncias que cercaram o fato antes do ocorrido ou que se seguiram depois (OLIVEIRA-COSTA, 2003).

O estudo da entomologia forense tem sido utilizado em todo o mundo como uma ferramenta pericial nas investigações criminais podendo ser realizada para determinar a origem de produtos estocados, a estimativa do intervalo *post-mortem*, toxicológico para detecção de substância entorpecentes, local da morte, maus tratos, dentre outros (GREDILHA, 2007).

Através da entomogenética tem sido possível a extração de material genético do trato gastrointestinal de larvas necrófagas e por meio da biologia molecular determinar a sequência genética do indivíduo a que a amostra pertence em que tanto se podem encontrar DNA da vítima quanto do suspeito (WELLS, 2001).

Neste estudo, o foco da entomologia forense resultante da análise de larvas necrofágicas, servirá de base à determinação do material genético da vítima, bem como determinar o tempo de morte (intervalo *post mortem*), cuja

identificação através dos tecidos presentes já não é mais viável devido à modificação visual e à lise das partes orgânicas (OLIVEIRA-COSTA, 2003)

Entretanto, não há no Brasil um protocolo utilizado para a análise de material genético em cadáveres em decomposição, posto que cada perito em cada Unidade da Federação utiliza de métodos empíricos na busca genética da vítima. Ocorre ainda que, não há na literatura brasileira nenhuma referência específica da prática forense oficial que determine as condições de coleta e análise do material genético da vítima em estado tanatológico (CRUZ, 2014).

Um dos entraves para a expansão da utilização de evidências entomológicas como ferramenta auxiliar na solução de crimes é o distanciamento entre a academia e os profissionais das polícias judiciárias responsáveis pela produção de provas materiais a partir do exame de cenas de crime e de cadáveres, bem como entre os peritos criminais e os médicos legistas (PUJOL-LUZ, 2008).

Os conhecimentos produzidos por equipes compostas por entomologistas, peritos criminais e médicos legistas são escassos atualmente e certamente contribuirão enormemente para o desenvolvimento da entomologia forense no Brasil. Pois irão associar o melhor de dois mundos: a experiência científica dos professores com a casuística dos peritos criminais e médicos-legistas (PUJOL-LUZ, 2008).

Deste modo, eventuais resultados são provenientes de pioneiros que tentaram empiricamente desvendar a identidade genética dos vitimados que estavam sob sua responsabilidade. Não há ainda na literatura forense da prática dos Peritos Oficiais, tabelas de determinação da ação da fauna cadavérica nas diferentes regiões e biomas brasileiros, sendo carente a literatura ainda do protocolo utilizado para determinação genética dos cadáveres em estados de decomposição orgânica.

A identificação humana por DNA é uma importante ferramenta na resolução de casos envolvendo questões criminais e de paternidade (DOLINSKY, 2007).

O DNA pode ser extraído de pequenas amostras biológicas, tais como, manchas de sangue, sêmen, cabelo, ossos, dentes, unhas, saliva, urina e fluídos biológicos; estes são os dois principais vestígios que podem ser encontrados nas cenas de crime.

Porém, o levantamento dos vestígios de material orgânico deve ser feito com bastante cuidado, pois a exposição do DNA a fatores como luz solar, microrganismos e componentes químicos pode provocar a sua degradação e interferir nos resultados (PARADELA, 2010).

Dessa forma, esta sendo construída uma aliança entre a criminalística e a justiça utilizando a biologia como ferramenta, e os insetos podem vir a serem peças fundamentais de alto valor criminalístico para fazer justiça.

Assim, a identificação humana por DNA é uma importante ferramenta na resolução de casos envolvendo questões criminais e de paternidade.

Esses vestígios podem ser utilizados para determinar o perfil genético do indivíduo e estabelecer alguma ligação entre a pessoa e o local do crime, uma vez que, é único o patrimônio genético de cada pessoa, pois existem sequências muito variáveis na molécula de DNA que devido ao seu alto grau de polimorfismo, podem ser utilizadas para distinguir indivíduos e estabelecer o vínculo genético entre os indivíduos envolvidos (MACIEL, 2014).

2.6. Entomofauna de interesse forense

Existem dois grandes grupos de artrópodes: besouros e moscas, que são atraídos por cadáveres e fornecem a maioria das informações em investigações entomologia forense (BYARD, *et al*, 2002).

Existem atualmente, mais de 750.000 espécies de besouros e 86.000 espécies de moscas registradas em todo o mundo. Destes dois grupos as moscas são geralmente as primeiras a entrarem em contato com o cadáver (KOLLER *et al*, 2011).

Assim, identificar o ínstar e a espécie dos insetos presentes em um cadáver humano pode proporcionar uma estimativa relativamente precisa do tempo de morte do cadáver. A premissa fundamental é que o corpo não está em óbito há mais tempo do que levaram os insetos a chegarem até este.

Os insetos relacionados à decomposição de cadáveres podem ser divididos em grupos funcionais: Insetos que já habitavam o corpo antes da morte (piolho e pulga); espécies necrófagas (principalmente moscas); espécies predadoras que se alimentam de outros insetos que estão no corpo (alguns

besouros); onívoros, insetos generalistas que consomem algo do corpo ou insetos que estão no corpo (vespas); E espécies que passam pelo local e são atraídas pelo calor e umidade do cadáver, mas não participam da decomposição (CARVALHO, 2006).

Neste âmbito, a entomologia forense apresenta diversas áreas de concentração e aplicações, fazendo-se necessário entender que alguns questionamentos básicos devem ser respondidos durante a investigação, como: a ocorrência da morte, o local, o tempo e a maneira, seja ela natural, acidental ou criminal (OLIVEIRA-COSTA, 2003).

Os insetos necrófagos também são fonte de material genético da vítima, pois estes emitam de tecidos e fluidos do corpo em decomposição e é possível a extração e identificação do DNA destes componentes, presentes no sistema digestivo de tais insetos.

Outro fator importante é a comparação feita entre insetos necrófagos e os diferentes tipos de ambientes, colonizados por diferentes espécies. Desta forma, existem possibilidades de se verificar se houve algum tipo de deslocamento do cadáver (PUJOL-LUZ, 2008).

Devido à importância da entomologia forense, urge que se desenvolvam conhecimentos, tais como, diversidade, frequência das espécies em diferentes épocas do ano e aspectos detalhados da biologia das espécies necrófagas para que possam ser utilizadas na descoberta da causa, do modo, da localização e até mesmo do tempo de morte de um indivíduo (OLIVEIRA-COSTA, 2003).

Entretanto, já se sabe que, a maior parte da decomposição de um corpo é feita pelos dípteros. Apenas quando o corpo já está muito ressecado é que outros grupos de insetos, como dos coleópteros são atraídos para a continuidade ao processo.

Os dípteros são insetos que apresentam morfologicamente apenas um par de asas transparentes com nervuras, localizadas anteriormente e, as asas posteriores transformadas em estruturas menores denominadas halteres que são importantes na estabilidade ou equilíbrio durante o voo. Essa ordem pode variar muito de estilo de vida e tamanho (TURNER, 1999).

Atualmente, alguns pesquisadores no Brasil e na América latina vêm realizando experiências para obtenção de dados complementares para a

entomologia forense, o que é muito importante, pois o assunto ainda é pouco aceito e utilizado.

Dados sobre a entomofauna e biologia dos insetos associados à decomposição cadavérica podem fornecer peças essenciais em procedimentos legais, além de contribuir em estudos posteriores desta área do conhecimento (CARVALHO, 2006).

Entretanto, observa-se uma flutuação populacional das espécies moscas em razão das localidades onde são realizados os estudos, sendo os fatores ambientais diretamente determinantes da evolução das moscas (MIRA, 2009).

Isso faz com que possa dividir a abundância de moscas e conseqüentemente uma maior ou menos rapidez na decomposição do corpo em certas épocas do ano (CORRÊA, 2010).

Estudos indicam que as moscas cadavéricas ocorrem de acordo com o processo de decomposição do corpo, e acordo com seu estágio de sucessão, sendo que os Calliphoridae apresentam maior preferência no primeiro estágio da decomposição (MIRA, 2009)

Os Sarcophagidae têm maior incidência no período frio e no estágio avançado da decomposição e as Phoridae têm preferência pelo estágio final da decomposição (FLORES, 2009).

A família Calliphoridae se caracteriza por dípteros de tamanho médio a grande, coloração metálica (verde, azul, violeta, cobre), possui a arista plumosa até o ápice, em sua maioria são saprófagos (MIRA, 2009).

Suas larvas se alimentam de tecidos em decomposição e preferem os estágios iniciais de decomposição e tem grande importância forense na estimativa do intervalo pós-morte (BOONSRIWONG, 2007).

Já a família Sarcophagidae são moscas de tamanho médio, de coloração cinza, arista nua ou pilosa na base, mesonoto com três faixas longitudinais negras; abdome geralmente ornamentado de manchas com reflexos cinzentos ou negros em xadrez (CRUZ, 2014).

Este grupo se assemelha a alguns Calliphoridae quanto ao aspecto e hábitos; as espécies necrófagas são larvíparas; os Sarcophagidae colonizam carcaças nos períodos mais frios (outono e inverno) e prefere os estágios adiantados decomposição (MIRA, 2009).

A família Muscidae são geralmente espécies que, quando associadas a carcaças apresentam cor escura, algumas vezes se podem encontrar espécies de cor verde metálica que podem ser confundidas com Calliphoridae. O que as distingue é a quarta nervura média da asa. Suas larvas apresentam o corpo cilíndrico (CRUZ, 2014).

Levantamentos de campo de insetos necrófagos geralmente contam com armadilhas contendo iscas ou carcaças de animais, devido à ética e restrições logísticas de lidar com cadáveres. Tais armadilhas podem fornecer uma descrição estimada das espécies realmente envolvidas no cadáver em decomposição e de seu verdadeiro potencial em investigações forenses (OLIVEIRA, VASCONCELOS, 2010; LUIZ *et al.* 2012).

Trabalhos recentes realizados em Campo Grande, Mato Grosso do Sul, visando conhecer a diversidade e a abundância de moscas sinantrópicas, utilizando como iscas peixe deteriorado, descrevem que as famílias mais abundantes foram Calliphoridae (105.334); Muscidae (27.999); Sarcophagidae (21.083); Fanniidae (17.759) e Mesembrinellidae (305), respectivamente, totalizando 172.480 dípteros encontrados (LUIZ *et al.*, 2012). A Calliphoridae, com uma predominância superior a 61% das espécies presentes e as espécies que mais se destacaram foram *Chrysomya albiceps* com mais de 43% das espécies presentes, seguida por *Chrysomya megacephala* superior a 11%, *Cochliomyia macellaria* com 0.64% e *Lucilia eximia* com 0.53%, distanciando-se das demais espécies desta família que apresentaram valores irrisórios (LUIZ *et al.*, 2012).

No mesmo trabalho, os representantes da família Sarcophagidae foram compreendidos por mais de 12% das moscas presentes no estudo (LUIZ *et al.*, 2012).

Em outras localidades que realizaram estudos similares, como no Estado de Sergipe, em que foi utilizada uma carcaça suína e considerados os fatores mesológicos específicos daquela localidade, pode-se constatar que houve o aparecimento de sete espécies de moscas, pertencentes a três famílias: Calliphoridae, Sarcophagidae e Muscidae (CRUZ, 2014).

Destacando a presença da espécie de maior predominância e, a mais coletada que foi a *Chrysomya albiceps*, encontrada já após vinte e quatro horas, colonizando o orifício bucal, seguida pela *Musca domestica*, a qual foi a

segunda espécie mais frequente Cruz (2014), o que não ocorreu no experimento realizado em Campo Grande, MS, provavelmente pela diferença de ambiente e de isca utilizada.

Em outro estudo realizado no Estado de Pernambuco foi realizado o estudo forense em quatorze cadáveres provenientes do Instituto de Medicina Legal, daquele Estado. De acordo com as condições do corpo e o padrão de colonização por insetos, simultaneamente observou também a diversidade de insetos em torno do ambiente onde foram retirados os cadáveres, usando armadilhas com iscas, cinco espécies foram encontradas nos cadáveres, sendo estas: *Chrysomya albiceps*, *Chrysomya megacephala* e *Cochliomyia macellaria* (Calliphoridae), e *Oxysarcodexia riograndensis* e *Ravinia Belforti*, ambos representantes Sarcophagidae. Totalizando 4.689 insetos adultos, pertencentes a 24 espécies de sete famílias de dípteros: Calliphoridae, Sarcophagidae, Muscidae, Fanniidae, Phoridae, Anthomyiidae e Stratiomyidae (OLIVEIRA; VASCONCELOS, 2010).

No estudo realizado por Oliveira e Vasconcelos (2010) artigo cita que *Chrysomya albiceps* foi a espécie mais frequente sobre os cadáveres e a mais abundante nas armadilhas. Espécies referidas como de importância forense, tais como *Lucilia eximia*, *Chrysomya putoria*, *Oxysarcodexia modesta* e *Ophyra chalcogaster* foram coletados em armadilhas, mas não em cadáveres, parecendo haver uma colonização limitada de cadáveres no local da morte, apesar da presença das espécies necrófagas na região (OLIVEIRA; VASCONCELLOS, 2010).

Os resultados apresentados pelos autores contribuem para diferenciação entre as espécies que estão envolvidas em decomposição e aqueles encontrados dentro e ao redor das instalações do IML assim fornecendo pistas sobre a localização da morte e o *intervalo post-mortem* (OLIVEIRA; VASCONCELLOS, 2010).

No estudo realizado por Krüger *et al* (2010) avaliando a taxa de desenvolvimento de Díptera de importância forense no sul do Brasil, os autores coletaram larvas de dípteros em carcaças de coelhos-domésticos ao longo das quatro estações de 2005 no extremo-sul do Rio Grande do Sul, Brasil. As espécies mais abundantes na carcaça foram *Lucilia eximia* e *Chrysomya albiceps* (Calliphoridae) em todas as estações. Outras espécies como

Hemilucilia semidiaphana (Calliphoridae), *Synthesiomyia nudiseta*, *Muscina stabulans* (Muscidae) e *Fannia pusio* (Wiedemann) (Fanniidae) foram menos importantes porque ocorreram em alta abundância em determinadas estações do ano no decorrer dos primeiros dias de decomposição.

A ordem Díptera ocorre frequentemente sobre os corpos cadavéricos por serem atraídas pelo odor, além de serem as primeiras a colonizarem os corpos em decomposição. São de grande importância forense e dentre elas a família mais representativa tanto quantitativamente quanto qualitativamente são os Muscoides, por sua alta quantidade e diversidade de espécies, e também a família Calliphoridae que está presente em todas as fases de decomposição (OLIVEIRA-COSTA, 2013).

As moscas adultas depositam seus ovos na pele e orifícios do cadáver, sendo que quando os ovos eclodem as larvas começam a migrar para os tecidos internos do corpo, em que geralmente são essas larvas imaturas as responsáveis pelas lesões e deterioração dos tecidos moles de cadáveres devido à presença de estrutura bucal que permitem se alimentarem de partículas sólidas do cadáver, diferentemente das moscas adultas que possuem um aparato bucal sugador (FLOREZ, 2009).

O clima com características tropicais de nossa região faz com que haja um incremento no aparecimento de moscas, conseqüentemente, com presença de larvas cadavéricas na decomposição de carcaça animal.

A análise de DNA em casos forenses é extremamente importante, tanto em estudos de identificação quanto em casos criminais que podem ser utilizados para a resolução de crimes no qual não se têm suspeitos, possibilitando assim a identificação de indivíduos por meio dos vestígios encontrados no local do crime (CORRÊA, 2010).

No tocante à morte violenta, a análise dos insetos encontrados nos cadáveres tem sido de grande importância por fornecer informações sobre a identidade do morto, a causa ou modo da morte, o local onde ela ocorreu, quando ela ocorreu, se houve movimentação do cadáver, e permite ainda a associação de suspeitos com a cena do crime (MACIEL, 2014).

Desta forma, os estudos indicam que há a necessidade de se adequar os estudos entomológicos não apenas nos meios acadêmicos, mas também

com a realidade pericial, uma vez a diferença observada *in loco* pericial e a outra encontrada em ensaios acadêmicos.

2.7. Análise genética.

Atualmente a Entomologia Forense tem se beneficiado de várias técnicas moleculares de genotipagem durante o processo de investigação, sendo na identificação genética das espécies de inseto, como também na recuperação do DNA de vertebrado, do conteúdo gastrointestinal de várias espécies e estágios de desenvolvimento de artrópodes, como: moscas, coleópteras, piolhos, carrapatos e mosquito (REPLOGLE *et al.*, 1994; LORD, 1998, KREIKE, 1999; MUKABANA *et al.*, 2002; CAMPOBASSO *et al.*, 2005; LI *et al.*, 2011; MARCHETTI *et al.*, 2013).

Alguns estudos têm sugerido a detecção de DNA humano, dentro pupários vazio, e ou regiões externa ao pupários vazios, que estão em contato direto com o substrato (alimento), ou na membrana peritrófica e ou no meconiado, bem como em outras estruturas de larvas como, por exemplo, no esqueleto cefalofaríngeo (MARCHETTI *et al.*, 2013).

A análise do conteúdo intestinal dos insetos pode ser uma evidência crucial quando se tem dúvidas da procedência dos insetos utilizados na análise entomológica, se realmente desenvolveram e se alimentaram do cadáver em questão. Uma associação precisa entre o inseto e cadáver é de suma importância em casos, que partes do corpo estejam faltando ou se o corpo tenha sido removido do local, posteriormente à sua morte, ou quando são encontradas apenas as larvas vivas no local do crime (LINVILLE *et al.*, 2004; CAMPOBASSO *et al.*; 2005; WELLS e STEVENS, 2008).

Quando há uma fonte alternativa de alimento próxima ao cadáver e ocorre dúvida da interpretação de onde as larvas são; quando há muitas evidências no local; ou ainda quando os insetos de uma cena do crime são divididos e enviados para diferentes investigadores que chegam a conclusões divergentes.

A utilização de técnicas de biologia molecular tem se mostrado eficaz para identificar DNA humano presente no intestino de insetos, fornecendo um

perfil genético que pode ser comparado ao do corpo em questão, como observado por Wells *et al* (2001), que foram capazes de detectar e identificar DNA humano, após uma reação de PCR do conteúdo intestinal de insetos alimentados com um fígado humano removido de um transplante; e por Zehner *et al* (2004) que mostraram que a análise de regiões polimórficas (STR) do DNA humano recolhido do intestino de larvas, após realização de PCR e sequenciamento, poderia ser usada para associar esses insetos a um determinado cadáver.

A capacidade de identificar hospedeiros humanos individuais com base em análises de sangue recuperados do trato digestivo de artrópodes hematófagos tem sido utilizada há algum tempo na entomologia médica e forense (LORD, 1998).

O sistema digestivo dos artrópodes, em geral é um tubo que percorre todo o corpo do inseto, da boca até ânus. O tubo digestivo é composto pelo: estomodeo (intestino anterior), mesêntero (intestino médio), proctodeo (posterior intestino) (Figura 1) e também pelas glândulas anexas (DESSI, 2014).

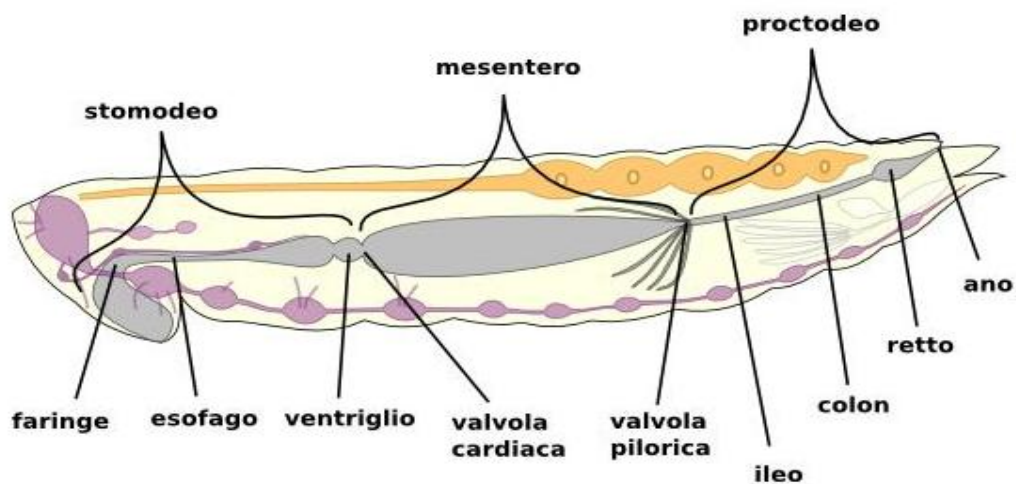


Figura 1. Representação esquemática do sistema digestivo de larva de mosca. Fonte: <http://www.giand.it/diptera/biblio/?lang=it> (Giancarlo Dessi , 2014)

O principal local de digestão e absorção dos alimentos é o intestino médio (mesentero), este corresponde a maior parte do sistema digestório, tanto em comprimento quanto em diâmetro, em muitos insetos neste local contém uma membrana semipermeável (TELLAM *et al.*, 1999).

Observações realizadas permitiram concluir, que o sistema digestivo dos artrópodes em geral é revestido por uma matriz peritrófica também denominada de membrana peritrófica (PM). Esta membrana é secretada pelo epitélio, e está em uma ou mais fases do ciclo de vida dos insetos. Tem um papel importante na facilitação dos processos digestivos e na proteção contra a invasão por microrganismos e parasitas (TELLAM *et al.*, 1999)

A matriz ou membrana peritrófica é uma fina camada acelular composta por quitina, proteínas e proteoglicanas, envolvendo o bolo alimentar e separando o epitélio do intestino médio (Figura 2), esta membrana está presente em muitas espécies de artrópodes (DESSI, 2014).

A PM pode ser classificada de dois tipos (I e II), de acordo com o local de síntese: Tipo I é sintetizado por todas as células do epitélio do intestino médio envolve o alimento “semelhante a uma bolsa”, e é formada principalmente em resposta a ingestão de alimento, pelo inseto. Tipo II é sintetizado por células especializadas na região de transição do estomodeo e mesêntero, iniciando-se na válvula cardíaca na junção entre intestino anterior e médio, estendendo-se ao longo de todo o mesêntero até o início do proctodeo (LEHANE *et al.*, 1997; TELLAM *et al.*, 1999). A PM do tipo II é mais estruturada que a do tipo I, e as proteínas que compõem esta membrana são determinantes na estruturação e formam ligações com a quitina, conseqüentemente, desempenham um importante papel na constituição desta membrana.

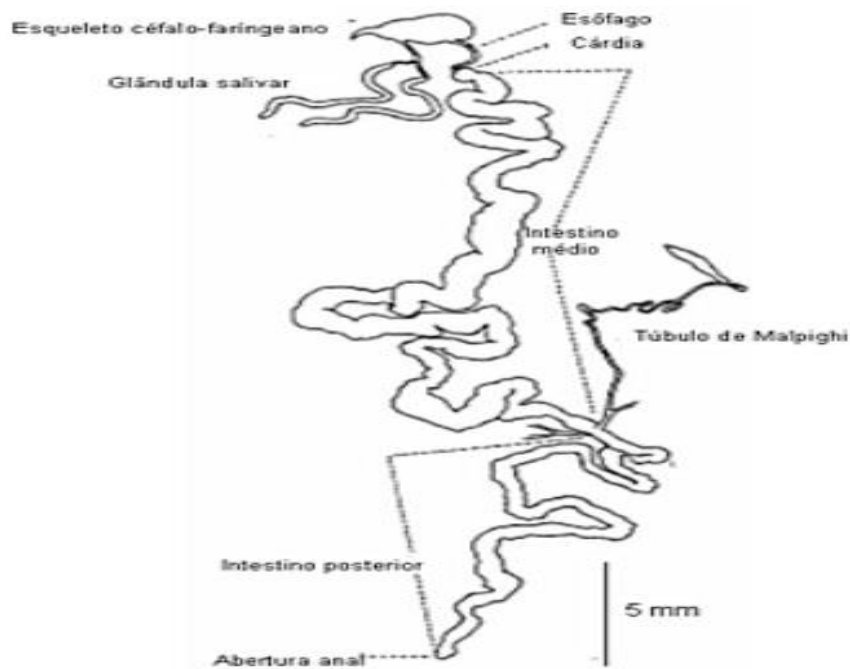


Figura 2. Representação esquemática do sistema digestivo de larva de terceiro estágio de *Dermatobia hominis*, com 20 dias pós-infestação (EVANGELISTA e LEITE, 2003).

O tecido ingerido pelas larvas de mosca é normalmente processado e eliminado pelo tubo digestivo, na fase larval após alimentação e ou na metamorfose (MARCHETTI *et al.*, 2013).

Durante o processo de digestão, alterações bioquímicas produzidas por enzimas proteolíticas quebram as ligações peptídicas entre os aminoácidos, estas enzimas são dominantes no ambiente intestinal dos insetos, responsáveis por 95% da atividade digestiva total. As enzimas presentes na saliva têm um papel fundamental na digestão oral são posteriormente incorporadas no saco gástrico, o que poderá explicar alguma da degradação do DNA durante a digestão larval (CANIÉ, 2010).

As amostras de tecidos, muito degradadas coletadas em cadáveres em um estado mais avançado de putrefação, e ou as provenientes do conteúdo gástrico larvar apresentam várias características desfavoráveis, que poderão ser responsáveis pelo insucesso da genotipagem, tais como a inibição da reação de PCR, a degradação do DNA e as alterações bioquímicas desta molécula (CANIÉ, 2010).

No entanto, muitos estudos têm sido realizados com amostras muito degradadas, como as provenientes do conteúdo gástrico larval, e os marcadores utilizados para a identificação de DNA humano e posterior comparação com uma amostra de referência do cadáver, são os: DNA nuclear das regiões repetidas em tandem (STR) (100-400 pb fragmentos) (ZEHNER *et al.*, 2004) e o DNA mitocondrial (mtDNA) e o gene amelogenina humano (AMEL 212-218 pb / 106-112 pb) (WELL *et al.*, 2001; LINVILLE *et al.*, 2002, LINVILLE e WELL, 2004).

Os marcadores microssatélites, também designados de STR (*short tandem repeats*) foram utilizados pela primeira vez como marcadores moleculares polimórficos em 1989 (LITT e LUTY, 1989). Como o tamanho dos alelos dos *loci* STR é relativamente pequeno, menor do que 350 pb (BRINKMANN, 1996), a análise se torna rápida e sensível, e podem ser estudados a partir de amostras com quantidades muito pequenas de DNA.

Para a identificação de seres humanos, análise do mtDNA é muito utilizada também, devido aos altos números de cópias dentro das células facilitando a detecção quando os tecidos são degradados (HOLLAND e PARSONS, 1999; MORLEY *et al.*, 1999).

Contudo, as alterações bioquímicas, que provavelmente podem sofrer o DNA durante o processo de digestão, parece não serem tão limitantes. Assim, alguma degradação do que ocorra no DNA ao longo do tubo digestivo, não parece ser a principal razão para uma falha na detecção do material genético a (CAMPOBASSO *et al.*, 2005).

No estudo, realizado por Zehner *et al.* (2004), que foi um dos primeiros estudos a demonstrarem a possibilidade de análise da STR em DNA humano presente no tubo digestivo de larvas necrófagos. As larvas foram coletadas em 13 cadáveres com intervalos variáveis de *pos-mortem*. E as regiões STR e as regiões hipervariáveis (HVR) foram amplificadas partir do conteúdo gástrico, destas larvas. Em sete casos, o perfil completo STR foi estabelecido, em dois casos, um conjunto incompleto de alelos foi obtido, e em quatro casos o STR não foi bem sucedido. Quanto à análise da região HVR foi bem sucedida quase todos os casos, exceto um. Estes autores também relataram que o acondicionamento e armazenamento das larvas, é fundamental para o sucesso da detecção do material genético.

O valor forense do material genético na identificação do DNA de vertebrados, seja humano ou não, tem sido amplamente demonstrado. Vários experimentos são realizados no intuito do desenvolvimento e validação de novas técnicas analíticas, e na expansão da lista de tecidos biológicos para obtenção de DNA, que possam trazer benefícios significativos na identificação de cadáveres (WELLS, 2001; TELETCHEA *et al.*, 2005).

Os desafios técnicos, conceituais e moleculares na identificação de espécies em amostras forenses tende a aumentar exponencialmente. E vários métodos viáveis têm sido aplicados nas tentativas de identificar espécies em quase todos os tipos de substratos, sendo que algumas abordagens já produziram resultados significativos (DeSALLE *et al.*, 1996).

Na busca de mais marcadores o gene leptina (*lep*) pode ser uma bom candidato, este gene está presente no cromossomo 4 de bovinos é constituído por três éxons separados por dois íntrons, dos quais o éxon 1 não é transcrito. A leptina é um hormônio proteico de 162 aminoácidos de 16 kDa sintetizado pelo gene da leptina, produzida principalmente pelos adipócitos. Estudos têm demonstrado a homologia entre o gene da leptina de diversas espécies. O gene da leptina humana tem 84% de homologia com o gene da leptina de camundongos, 83% com o de ratos e 85% com o de bovinos e suínos (DOYON *et al.*, 2001; ZHANG *et al.*, 1994).

3. REFERÊNCIAS

BENECKE, M. Coding or non- coding, that is the question. *Embo reporta*. v.3, n.6, p.498 -502, 2002.

BOONSRIWONG, W. et al. Fine structure of the alimentary canal of the larval blow fly *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae). *Parasitology Research*, v. 100, n. 3, p. 561-574, 2007.

BRASIL, **Código de Processo Penal**. 1941. Brasil

BYARD, R.W.; JAMES, R.A.; GILBERT, J.D. Diagnostic Problems Associated with Cadaveric Trauma from Animal Activity. *Journal of Forensic Medicine and Pathology*, v. 23, n. 3, p.238 – 244, 2002.

CAINÉ, L.S.R.M. **Entomologia forense: Identificação genética de espécies em Portugal**. Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, 2010.

CAMPOBASSO, C.P; LINVILLE, J.G; WELLS, J.D; INTRONA, F. Forensic genetic analysis of insect gut contents. *Journal of Forensic Medicine and Pathology*, v. 26, n. 2, 2005.

CARVALHO, S. L. **Redescrição das larvas de terceiro ínstar de cinco espécies de dípteros Califorídeos (INSECTA, DIPTERA) de importância para entomologia Forense**. UNB, 2006.

CORDEIRO, K.B.B. **Desenvolvimento pré-embrionário de *Chrysomya albiceps* (diptera: calliphoridae) sob condições controladas em laboratório e contribuições para entomologia forense**. 2011. 27 f. Monografia (Graduação - Licenciatura em Biologia) - Universidade Estadual de Goiás, Goiás, 2011.

CORREA, C.L.; KOLLER, W.W.; BARROS, A.T.M. Abundância relativa e sazonalidade de espécies de *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) no Pantanal Sul-Mato-Grossense, **Brasil**. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 19, n. 2, p. 85-88, 2010.

CROCE, Delton. Delton Croce Júnior. **Manual de Medicina Legal**. Ed. Saraiva. 8ª edição. 2012.

CUNHA, A.M.J.S.; ARANTES, L.C.; QUEIROZ, P.R.M.: **Utilização do DNA mitocondrial em entomologia forense**. 2013 Disponível em: <http://www.cpgls.ucg.br/7mostra/Artigos/SAUDE%20E%20BIOLOGICAS/Utiliza%C3%A7%C3%A3o%20do%20DNA%20mitocondrial%20em%20entomologia%20forense.pdf>. Acesso em: 02/07/2014.

CRUZ, J.D.; SILVA, C.C.; RAPOSO-FILHO, J.R. Dipterofauna associada a cadáver de porco doméstico *Sus scrofa domesticus* (linnaeus, 1758) na cidade de Itabaianinha, Estado de Sergipe. **Cadernos de Graduação - Ciências biológicas e da saúde**, v. 2, n.1, p. 155-173, 2014.

DeSALLE, R.; BIRSTEIN, V. PCR identification of black caviar. **Nature**, v. 381, n. 1996, p. 197–198, 1996.

DEL-CAMPO, Eduardo Roberto Alcântara. **Medicina Legal II**. Ed. Saraiva. 2ª edição. 2012.

DESSI, G.; RICONOSCERE, I.: **la chiave dicotomica ai generi italiani. Quaderni della Stazione di Ecologia del Museo Civico di Storia Naturale di Ferrara**: 101-145. 2014.

DIAS, L.S. et al. Biodiversidade de moscas Calliphoridae no lixão urbano de Presidente Prudente, São Paulo, Brasil. **Arquivo Instituto Biológico**, v. 76, n. 4, p. 659-663, 2009.

DOLINSKY, P.D., PEREIRA, L.M.C.V. **DNA Forense**. Ver. Saúde e ambiente em Revista, *Duque de Caxias*, v.2, n.2, p.11-22. 2007.

DOREA, Luiz Eduardo Carvalho, et al. **Criminalística**. Ed. Millennium. 2ª edição. 2003.

DOYON, C.; DROUIN, G.; TRUDEAU, V.L.; MOON T.W. **Molecular evolution of leptin**. General and Comparative Endocrinology. v. 124, n.2, p.188–198. 2001.

EVANGELISTA, L.G; LEITE, A.C.R; Midgut ultrastructure of the third instar of *Dermatobia hominis* (Diptera: Cuterebridae) based on transmission electron microscopy. **Journal of Medical entomology**, v. 40, n. 2, p. 133-140, 2003

FLOREZ, E.; WOLFF, M. Descripción y clave de los estadios inmaduros de las principales especies de Calliphoridae (Diptera) de importancia forense en Colombia. **Neotropical Entomology**, v. 38. n.3. p.418-429, 2009.

GREDILHA, R.; PARADELA, E.R.; FIGUEIREDO, A.L.S. Entomologia forense: insetos aliados da lei. **Âmbito Jurídico**, v. 45, 2007
Disponível online em:
<http://www.ambitojuridico.com.br/site/index.php?artigo_id=2288&n_link=revista_artigos_leitura>. Acesso em: 07 jul 2014.

HSIEH, H.M.; HUANG, L.H.; TSAI, L.C.; KUO, Y.C; MENG, H.H.; LINACRE, A, LEE JCI. Species identification of rhinoceros horns using the cytochrome b gene. **Forensic Science International**, v. 136, n. 1-3, p. 1-11, 2003.

JAN, M. et al. A case of oral myiasis caused by *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) in Korea. **Korean Journal Parasitology**. v. 51, n. 1. 119-123, 2013.

JESUS, D. **Direito penal** vol. 1. 35ª Ed. 2014. Saraiva.

JOSEPH, I.; MATHEW, D.G.; VARGHEESE, G. **The use of insects in forensic investigatios: An overview on the scope of forensic entomology**. J. forensic, 2011. 89-91. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3296382/>>. Acesso em: 01/07/2014.

KOLLER, W.W; BARROS, A.T. M.; CORRÊA, E.C.: **Abundance and seasonality of *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae) in Southern Pantantal Brasil**. Rev. Bras. Parasitol. Vet., Jaboticabal, v. 20, n. 1, p. 27-30, jan.-mar. 2011

LI, X. et al. Mitochondrial DNA and STR analyses for human DNA from maggots crop contents: A forensic entomology case from central-southern China. **Tropical Biomedicine**, v. 28, n. 2, p. 333–338, 2011.

LORD, W. D.; STEVENSON, J. R.. 1986. **Directory of forensic entomologists**. 2 ed. Misc. Publ. Armed Forces Pest Mgt. Board, 42 p. 1998.

LUIZ, H.L.; TAIRA, T.L.; KOLLER, W.W. New records of Muscidae (Diptera) in Campo Grande, MS, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, n. 4, p. 412-414, 2012 .

MACIEL, C.S.; ARANTES, L.C. **Aplicações das técnicas de biologia molecular na entomologia forense**. Disponível em: <<http://www.cpqls.ucg.br/ArquivosUpload/1/File/V%20MOSTRA%20DE%20PR ODUO%20CIENTIFICA/SAUDE/40.pdf>>. Acesso em: 04/07/2014.

MARCHETTI, D.; ARENA, E.; BOSCHI, I.; VANIN, S. Human DNA extraction from empty puparia. **Forensic Science International** 229 (2013) e26–e29. 2013. www.elsevier.com/locate/forsciint.

MELKI, J.A.D; MARTIN, C.C.S.; SIMÕES, A. L. **Procedimentos em exumação para investigação de vínculo genético em ossos**. Ver Saúde pública. **Ribeirão Preto, SP**. 2001. Disponível em: <http://conic-semesp.org.br/anais/files/2013/trabalho-1000016039.pdf>. Acesso em 05/06/2014.

MIRA, L. D. A; FRANCISCO, O. **Fauna cadavérica de importância forense associada a carne suína**. 2009. Disponível online em: <http://fio.edu.br/cic/anais/2009_viii_cic/Artigos/04/04.82.pdf>. Acesso em: 04/07/2014.

MOUGENOT, Edilson Bonfim. **Curso de Processo Penal**. Ed. Saraiva. 8ª edição. 2013.

MUNIZ, S.S.; SILVA, P.Q. **A utilização de marcadores moleculares de DNA aplicados nas investigações forenses**. Disponível online em: <<http://www.cpgls.ucg.br/ArquivosUpload/1/File/V%20MOSTRA%20DE%20PR%20ODUO%20CIENTIFICA/SAUDE/80.pdf>>. Acesso em: 04/07/2014.

OLIVEIRA, T.C.; VASCONCELOS, S. D. **Insects (Diptera) associated with cadavers at the Institute of Legal Medicine in Pernambuco, Brazil: Implications for forensic entomology**. *Forensic Science International* v. 198, n.1-3, p. 97-102, 2010.

OLIVEIRA-COSTA, J. **Entomologia Forense**. Ed. Millenium. 1ª edição. 2003.

PFEIFFER, I.; BURGER, J.; BRENIG, B. Diagnostic polymorphisms in the mitochondrial cytochrome b gene allow discrimination between cattle, sheep, goat, roe buck and deer by PCR-RFLP. **BMC Genetics**, v. 5, n. 30, p. 1- 5, 2004.

PARADELA, R.E.; FIGUEIREDO, S.L. O DNA vai ao tribunal: O impacto das tipagens genéticas. In: **Âmbito Jurídico**. 2010. Disponível em: <http://www.ambitojuridico.com.br/pdfsGerados/artigos/1790.pdf>>

PUJOL-LUZ, J. R; ARANTES, L. C.H; CONSTANTINO, R. **Cem anos da entomologia forense no Brasil (1908 – 2008)**. São Paulo, Revista Bras. Entomologia. 2008.

RODRÍGUEZ, M. A.; GARCÍA, T.; GONZÁLEZ, I.; ASENSIO, L.; MAYORAL, B.; LÓPEZ-CALLEJA, I.; HERNÁNDEZ, P.E.; MARTÍN, R. **Identification of goose, mule duck, chicken, turkey, and swine in foie gras by species-specific polymerase chain reaction**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 51, n. 6, p. 1524-1529, 2003.

RABELLO, E. **Curso de criminalística**. Sagra Luzzato, Porto Alegre. 1996.

TELLAM, R.L. Peritrophic matrix proteins. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 1998.

TELETCHEA, F.; MAUDET, C.; HANNI, C. **Food and forensic molecular identification: update and challenges**. *TRENDS in Biotechnology*, v. 23, n. 7 p. 360-366, 2005.

TURNER, B.; WILTSHIRE, P.: **Experimental validation of forensic evidence: a study of decomposition of buried pigs in heavy clay soil.** 1999. Disponível em:
[http://www.fsijournal.org/article/S0379-0738\(99\)00018-3/abstract?cc=y?cc=y](http://www.fsijournal.org/article/S0379-0738(99)00018-3/abstract?cc=y?cc=y)
Acesso em 02/07/2014.

WAN, Q. H.; FANG, S.G. **Application of species-specific polymerase chain reaction in the forensic identification of tiger species.** Forensic Science International, v. 131, n. 1, p. 75–78, 2003.

WELLS, J.D.; INTRONA, F. Jr; CAMPOBASSO, D.V.; SPERLING, F.A.H. **Human and insect mitochondrial DNA analysis from maggots.** 2001. J Forensic Sci 2001;46(3):685–687. Disponível em:
http://www.denverda.org/DNA_Documents/DNA%20Analysis%20from%20Maggots.pdf. Acesso em 30/06/2014.

ZEHNER, R.; AMENDT, J.; KRETTEK, R.; STR typing of human DNA from fly larvae fed on decomposing bodies. **Journal Forensic Sci.** 49:337-340. 2004

4 - OBJETIVOS

Objetivo Geral

Determinar a viabilidade de obtenção de material genético de vertebrados a partir do conteúdo gastrointestinal de larvas de dípteras necrofágicas alimentadas com carne bovina.

Objetivos Específicos

1. Análise da eficiência de técnicas de obtenção de DNA de vertebrados a partir do conteúdo gastrointestinal de larvas necrofágicas.
2. Determinação do protocolo específico para a análise genética do material
3. Identificar os gêneros de larvas coletadas.

O artigo a seguir foi elaborado seguindo as normas da revista Forensic science international

Identificação de DNA vertebrado a partir do conteúdo gastrointestinal de larvas de dípteras necrofágicas.

Identification of vertebrate DNA from the gastrointestinal contents of necrophagous diptera larvae.

Wedney Rodolpho de Oliveira¹, Maria Helena de Araújo², Ariadne Barbosa Gonçalves³, Carina Elisei de Oliveira⁴

¹Bacharel em Direito pela Universidade Católica Dom Bosco. Bacharel em Biologia pela Universidade Anhanguera/Uniderp. Acadêmico de Pós-graduação *stricto sensu* em Biotecnologia pela Universidade Católica Dom Bosco (UCDB). Avenida Tamandaré, 6000, Campo Grande, MS. CEP: 79.117-900, Brasil. Email: wedney7@hotmail.com

²Técnica do laboratório de Biologia molecular da Universidade Católica Dom Bosco (UCDB).

³Discente da Pós-graduação *stricto sensu* em Biotecnologia pela Universidade Católica Dom Bosco (UCDB).

⁴Docente da Pós-graduação *stricto sensu* em Biotecnologia pela Universidade Católica Dom Bosco (UCDB).

RESUMO

A evidência entomológica forense é frequentemente utilizada para estimar o intervalo *post mortem*. Larvas de artrópodes necrófagos podem ser fonte de DNA de vertebrados dos quais os mesmos se alimentaram. Esta análise forense de DNA recuperado a partir do tubo digestivo de larvas pode ser usada para identificar aquilo que esta se alimentou. Objetivou-se por meio deste trabalho detectar DNA de vertebrado por meio da utilização de técnica molecular, amplificados pela PCR utilizando o gene *lep*, específico para vertebrados, que corresponde à última refeição realizada pelo estágio larval do artrópode. No entanto, como se trata de uma técnica recente, a análise do conteúdo da larva do tubo digestório, há muitas limitações da técnica que ainda não foram exploradas. Entretanto, os resultados encontrados em nossos de nossos estudos sugerem que larvas necrofágicas alimentadas ativamente sobre o cadáver vertebrado podem ser consideradas como fonte eficiente de DNA de vertebrados.

Palavras-chave: Entomologia forense, identificação por PCR, amplificação de DNA.

ABSTRACT

A forensic entomological evidence is often used to estimate the post mortem interval. Larvae of carrion arthropods can be a source of vertebrate DNA from which they fed. This forensic analysis of DNA recovered from the gut of larvae can be used to identify what is fed. The objective of this work by detecting vertebrate DNA through the use of molecular techniques amplified by PCR using PET, gene specific to vertebrates, which corresponds to the last meal performed by larval arthropod. However, as this is a recent technique, the analysis of the content of the larva of the digestive tract, there are many limitations of the technique have not yet been explored. However, the results from our studies suggest that our necrofágicas larvae actively fed on vertebrate body can be considered as an efficient source of vertebrate DNA.

Keywords: Genetic Profile, forensic entomology, human identification, DNA amplification.

Identificação de DNA vertebrado a partir do conteúdo gastrointestinal de larvas de dípteras necrofágicas.

Identification of vertebrate DNA from the gastrointestinal contents of necrophagous diptera larvae.

INTRODUÇÃO

Em uma cena de crime a ciência forense busca variados tipos de materiais biológicos, os quais podem ser caracterizados como vestígios que, após analisados e comprovados podem se tornar provas conclusivas para elucidar ações criminosas.

As larvas e adultos de dípteros necrófagos encontrados próximos ou nos cadáveres podem fornecer importantes indícios para as estimativas criminais, como: o intervalo de tempo pós-morte (IPM), indicações do local do crime, fonte de material genético que possa ser utilizado para a identificação da vítima e achado taxológicos (WELLS, 2001, CAMPOBASSO *et al.* 2005; CARVALHO, 2006; PUJOL *et al.*, 2008).

As fases de decomposição de um cadáver atraem diferentes tipos de insetos que utilizam este recurso como fonte de alimentação. Estudos realizados demonstraram quatro categorias da entomofauna estão associadas à decomposição de cadáveres, onde as principais atoras seriam as Muscoides (CARVALHO, 2006; OLIVEIRA e VASCONCELOS, 2010; CORRÊA, 2010; KOLLER *et al.*, 2011; OLIVEIRA-COSTA, 2003).

Os avanços nas técnicas de biologia molecular permitiram a análise do conteúdo gastrintestinal de insetos que podem se tornar uma evidência crucial na elucidação de crimes.

A utilização de técnicas moleculares com marcadores tem se mostrado eficiente na detecção e caracterização do DNA de vertebrado presente no conteúdo gastrointestinal, fornecendo um perfil genético que pode ser comparado ao do cadáver (CAMPOBASSO *et al.*, 2005). Consequentemente podem vir a ser uma evidência crucial para ligar um suspeito à vítima ou a cena, e ainda reconstruir as circunstâncias do crime, ou estabelecer a credibilidade das declarações feitas por uma testemunha. (LI, *et al.*, 2011).

Entretanto, para a utilização deste material de cunho forense faz-se necessários alguns cuidados, como a coleta e identificação correta das larvas, o ínstar larval, a voracidade e, a preservação das larvas imediatamente após a coleta no local do crime, devido à pequena quantidade amostral do DNA a ser encontrado (WELLS, 2001; ZEHNER et al., 2004; CAMPOBASSO *et al.*, 2005).

Objetivou-se assim, com este trabalho a detecção através do gene *lep* de DNA de vertebrado em larvas de dípteros necrófagos alimentados com tecido bovino.

MATERIAIS E MÉTODOS

1.1. Amostra, coleta e sua preservação.

O experimento *in loco* foi realizado no campus Universidade Católica Dom Bosco, localizada à Avenida Tamandaré, 8000, Bairro Jardim Seminário, zona urbana da cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, latitude: 20°24'23.49"S; longitude: 54°36'54.77"O. No início da primavera do ano de 2013.

Para referencial do marcador genético foi utilizado como amostra de vertebrado uma parte de tecido muscular bovino com massa de 2,3 quilogramas adquirida em estabelecimento comercial comum.

Para a proteção desta amostra contra predadores indesejados foi preparada uma gaiola com dimensão de 1m x 1m x 0,6m revestida com tela metálica de 12 milímetros possibilitando a entrada de moscas biontofugas, ao mesmo tempo impedindo a ação da mastofauna indesejável neste procedimento.

O local em que esta gaiola foi colocada se caracterizava por um campo limpo, antropofizado, com cobertura vegetal gramínea rasteira e, sob o sombreamento de uma árvore de médio porte típica desta região do bioma cerrado que abrange esta região do país.

As larvas de moscas foram coletadas com auxílio de pinças descartáveis sob ou no interior do substrato bovino e, acondicionadas em tubos tipo *falcon* de 50 mL e transportadas ao Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Católica Dom Bosco.

No laboratório, as larvas foram lavadas em água corrente, para a retirada do excesso de impurezas impregnadas. Logo após estas foram submetidas à banhos consecutivos de água destilada e uma solução de hipoclorito a 0,1% e preservadas em etanol 70%, a -85°C.

1. 2 Identificação Morfológica por Microscopia Ótica (MO)

Para o estudo morfológico em microscopia ótica, foram utilizados 10 exemplares de larvas por amostra coletada. A metodologia utilizada foi baseada em Carvalho (2006).

1.2.1 Preparação das amostras.

As larvas foram seccionadas com a ajuda de um bisturi no segundo segmento torácico (porção anterior) e no oitavo segmento abdominal (porção posterior), totalizando três partes, utilizando-se a porção mediana para obtenção do DNA vertebrado.

Durante o processo de dissecação foram obtidas, as seguintes estruturas: espiráculo posterior e esqueleto cefalofaríngeo, estes foram observados em microscópio ótico e foto documentados com câmera digital comum para determinação do gênero dos espécimes.

1.3 Extração de DNA

As larvas obtidas foram separadas em dois grupos contendo entre três e 20 larvas, as quais foram submetidas às diferentes métodos de extração de DNA com intuito de comparação.

1.3.1. Extração de DNA com o Kit QIAamp ®

Foram maceradas 20 larvas em cadinho, com nitrogênio líquido e o material obtido foi extraído utilizando o Kit QIAamp ® colunas (Vallencia, CA) seguindo as instruções do fabricante.

1.3.2. Extração de DNA *in house*

A extração do DNA genômico foi realizada a partir da região mediana de três larvas (do segundo ao oitavo segmento) maceradas com auxílio de um

bastão de vidro e acrescentado 200 μL de PBS. A seguir, foi adicionado 25 μL de proteinase K (20mg/mL). As amostras foram homogeneizadas e incubadas a 56°C por 60 minutos. Após a remoção das amostras do banho-maria foi acrescido 250 μL de Dodecil Sulfato de Sódio – (SDS) 20%; com homogeneização das amostras por inversão e incubação 60 minutos em banho-maria a 65°C. Após foi adicionado 800 μL de clorofórmio e 400 μL da solução de precipitação protéica (3M $\text{C}_2\text{H}_3\text{KO}_2$, 2M CH_3COOH). As amostras foram centrifugadas por 14000xg durante 10 minutos, o sobrenadante foi coletado e tratado com 1mL de etanol absoluto, após as amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a 14000xg/5minutos. O sobrenadante foi descartado e adicionado 1mL de etanol 70% ao sedimento formado. Logo após, a amostra foi centrifugada por 14000xg/3minutos e o sobrenadante descartado. O sedimento foi seco em temperatura ambiente e ressuspenso em 150 μL de água ultrapura, incubado a 65°C/5minutos em banho-maria e estocado a -20 °C (SAMBROOK *et al*, 1989) com as devidas adaptações.

1.4. PCR – Reação em Cadeia da Polimerase:

Foi realizada a análise do exon 2 do gene leptina (*lep*) pela técnica de PCR, com base em protocolos padronizados.

Para a amplificação do fragmento foram utilizados o par de oligonucleotídeos *lep* 5'ATGCGCTGTGGACCCCTGTATC 3') e (5' TGGTGTCATCCTGGACCTTCC 3') (BUCHANAN *et al*, 2002).

As reações de PCR foram realizadas com o volume final de 25 μL contendo 50 ng de DNA; tampão de PCR 10X, 25 mM de MgCl_2 , 20 mM de cada dNTP, 0,5 U de *Taq* DNA polimerase (INVITROGEN) 5 pMol de cada oligonucleotídeo. A amplificação foi realizada em termociclador (Peltier Thermal Cycler-modelo PTC-100 TM) com o seguinte protocolo: 35 ciclos de 94°C/5min; 94°C/1min; 54°C/1min; 72°C/1min e um ciclo final de 72°C/5min. Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese a 100V por 2 hora em gel de poliacrilamida 10%, corado com nitrato de prata e foto documentados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

2. 1. Identificação Morfológica por Microscopia Ótica (MO)

Na identificação morfológica das larvas coletadas com cinco dias após o início do experimento, foi possível observar dois morfotipos, que apresentaram as seguintes características típicas do grupo Cyclorrapha, família Calliphoridae, como: corpo vermiforme divididos em segmentos cefálico, torácico e abdominal.

Morfotipo 1: Ínstar larval (L3). *Cochliomyia*. Comprimento: 12 a 15 mm (média: 13 mm); coloração aparente creme na porção ventral e castanho escuro na porção dorsal com presença de tubérculos na região dorsal e, na região ventral projeções papiliformes, região cefálica com gancho mandibular (figura 1); Estrutura do espiráculo posterior: grande, aberturas espiraculares curtas, peritrema grosso e incompleto (figura 02).

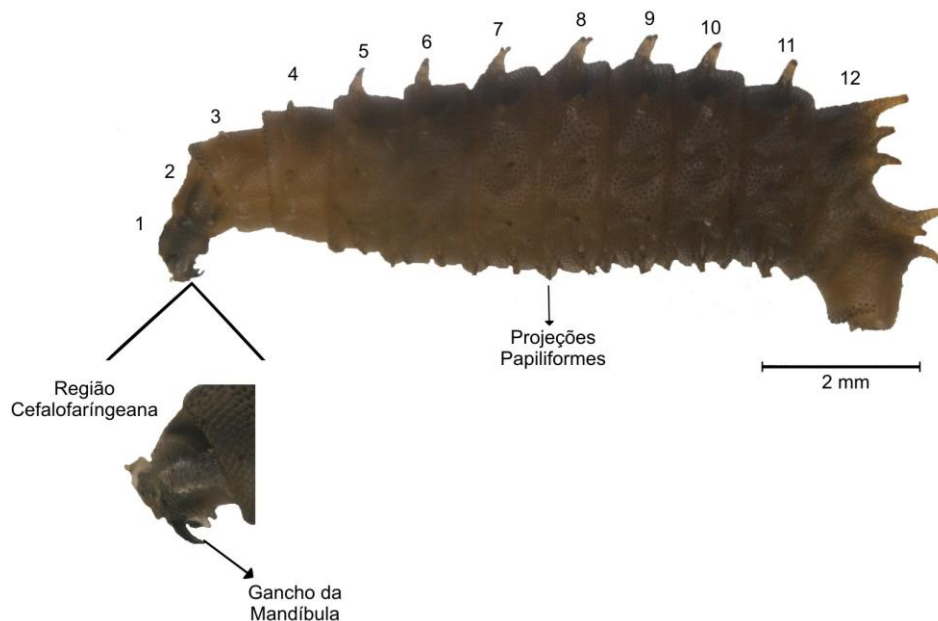


Figura 1: Morfologia lateral da larva de terceiro ínstar de *Cochliomyia* sp. Numeração 1 a 12: segmentos.

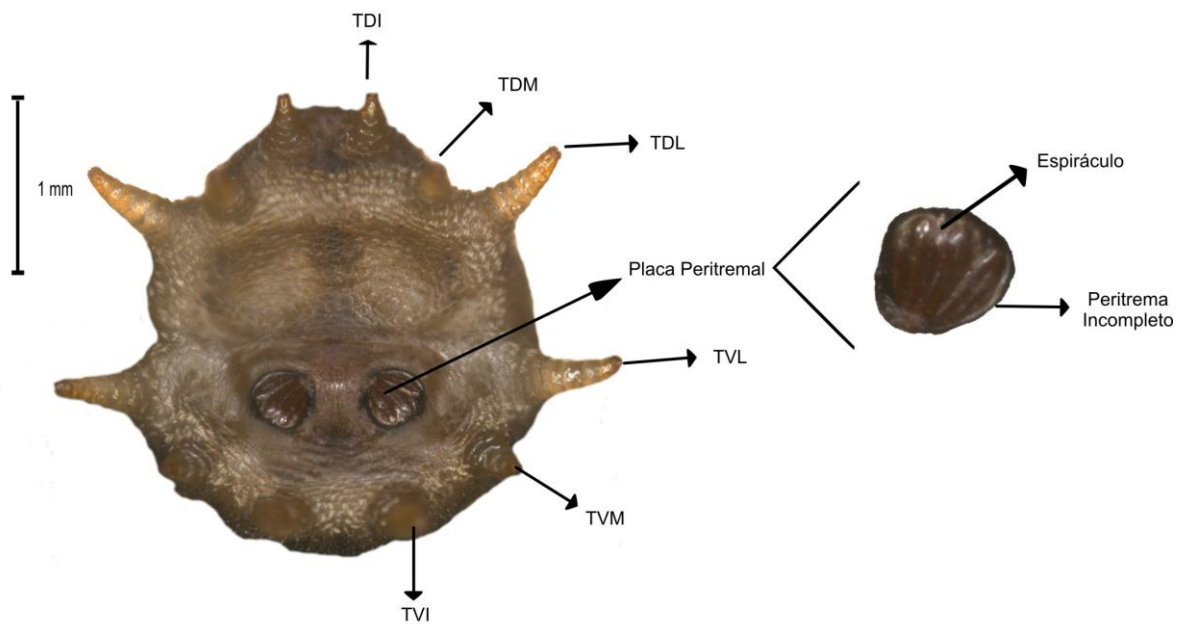


Figura 02: Morfologia da região posterior de *Cochliomyia sp.* TDI: tubérculo dorsal interno. TDM: tubérculo dorsal médio. TDL: tubérculo dorsal lateral. TVL: tubérculo ventral lateral. TVM: tubérculo ventral médio. TVI: tubérculo ventral interno.

Morfotipo 2: Ínstar larval (L3) *Lucilia sp.* Comprimento: 8 a 11 mm (média: 9 mm); coloração branca a creme; sem diferenciação quanto a coloração da região dorsal e ventral, ausência de tubérculos e espinhos (figura 3); Estrutura do espiráculo posterior: grande, fechados espiraculares curtas, peritrema fino e completo (figura 4).



Figura 3: Morfologia lateral da larva de terceiro ínstar de *Lucilia sp.* Numeração 1 a 12: seguimentos.

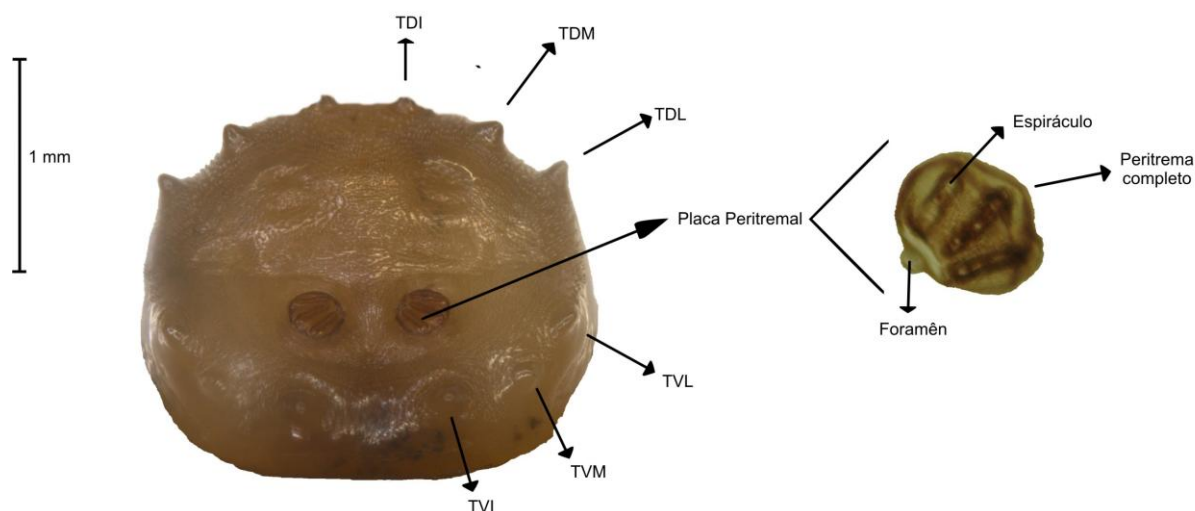


Figura 04: Morfologia da região posterior de *Lucilia* sp. TDI: tubérculo dorsal interno. TDM: tubérculo dorsal médio. TDL: tubérculo dorsal lateral. TVL: tubérculo ventral lateral. TVM: tubérculo ventral médio. TVI: tubérculo ventral interno.

Com base nos achados deste estudo e balizados em dados de literatura pode-se afirmar que as larvas do morfotipo 1 são do gênero *Cochliomyia* e do morfotipo 2 *Lucilia*.

Neste estudo foi possível coletar larvas de *Cochliomyia* sp. e *Lucilia* sp.; após cinco dias de experimentação, estes gêneros são relatados como os mais e mais frequentes na decomposição de carcaça em várias regiões do país (KOLLER, *et al* 2010; KRÜGER *et al* 2010; OLIVEIRA e VASCONCELLOS, 2010; LUIZ *et al.*, 2012 OLIVEIRA-COSTA *et al.*, 2013).

Vale ressaltar que, dos dois gêneros coletados, foi possível detectar a presença de DNA no trato gastrointestinal, de larvas do gênero *Cochliomyia* sp. Entretanto, a não detecção de DNA em larvas do gênero *Lucilia*.sp, pode estar correlacionado ao estágio avançado de desenvolvimento, ou seja, em larvas maduras, o processo de ingestão do alimento é cessado e o tubo digestivo pode estar vazio ou com muito pouco conteúdo, outro fato relatado na literatura é de que as larvas maduras possuem, geralmente, grandes concentrações de lipídios, que podem afetar a amplificação de DNA (CAMPOBASSO *et al.* 2005; CAINÉ, 2010). Além disso, diversos autores relatam, que uma das primeiras espécies de moscas que a frequentaram e colonizam a carcaça são do gênero

Lucilia (KOLLER, *et al* 2010; KRUGER *et al* 2010; OLIVEIRA e VASCONCELLOS, 2010; LUIZ *et al.*, 2012; OLIVEIRA-COSTA *et al.*, 2013).

2. 1. Detecção DNA de vertebrado.

2. 1. 2. Extração de DNA

Os dois métodos de extração foram comparados nas amostras utilizadas para detecção de DNA total (Tabela I). Para a avaliação do DNA de vertebrado presente no conteúdo gastrointestinal larval foi pela amplificação do gene *lep* (Figura 7).

Tabela I – Avaliação da quantidade e qualidade do DNA total, utilizando dois diferentes métodos de extração.

MÉTODO DE EXTRAÇÃO	CONCENTRAÇÃO (η g/ μ L)	O.D (260/280)
Kit Qiagen (= 20)*	241	1,78
<i>In House</i> (=3)*	2567	1,79
Controle positivo tecido bovino (<i>in house</i>)	313	1,69

* números de larvas

2. 1. 3. Amplificação por PCR

O valor forense do material genético na identificação DNA de vertebrados, seja este humano ou não, e de insetos tem sido amplamente demonstrado. Vários experimentos vem sendo realizados no intuito do desenvolvimento e validação de novas técnicas analíticas, e na expansão da lista de tecidos biológicos para obtenção de DNA, que possam trazer benefícios significativos na identificação (REPOGLE *et al.*, 1994; LORD, 1998, CAMPOBASSO *et al.*, 2005; TELETCHEA *et al.*, 2005; LI *et al.*, 2011; MARCHETTI *et al.*, 2013).

Os desafios técnicos, conceituais e moleculares na identificação de espécies em amostras forenses tende a aumentar exponencialmente. Em que vários métodos viáveis têm sido aplicados nas tentativas de identificar espécies em quase todos os tipos de substratos, sendo que algumas abordagens já produziram resultados significativos e interessantes, como por exemplo, em alimentos, para a identificação de espécies de caviar (DeSALLE *et al.*, 1996) e

de foie (RODRIGUEZ *et al.*, 2003); e ou em amostras forenses com espécies com ameaçadas de extinção (WAN e FANG, 2003).

Um fragmento de aproximadamente 98 pb, referente ao gene *lep* de bovino foi amplificado com sucesso a partir de amostras do conteúdo intestinal de larvas de moscas do morfotipo 1 alimentadas em tecido de bovino. A sequência amplificada correspondente às posições 116-209 de *Bos taurus* Haplótipo AT leptin gene, exon 2 (GenBank número de acesso KC660113.1).

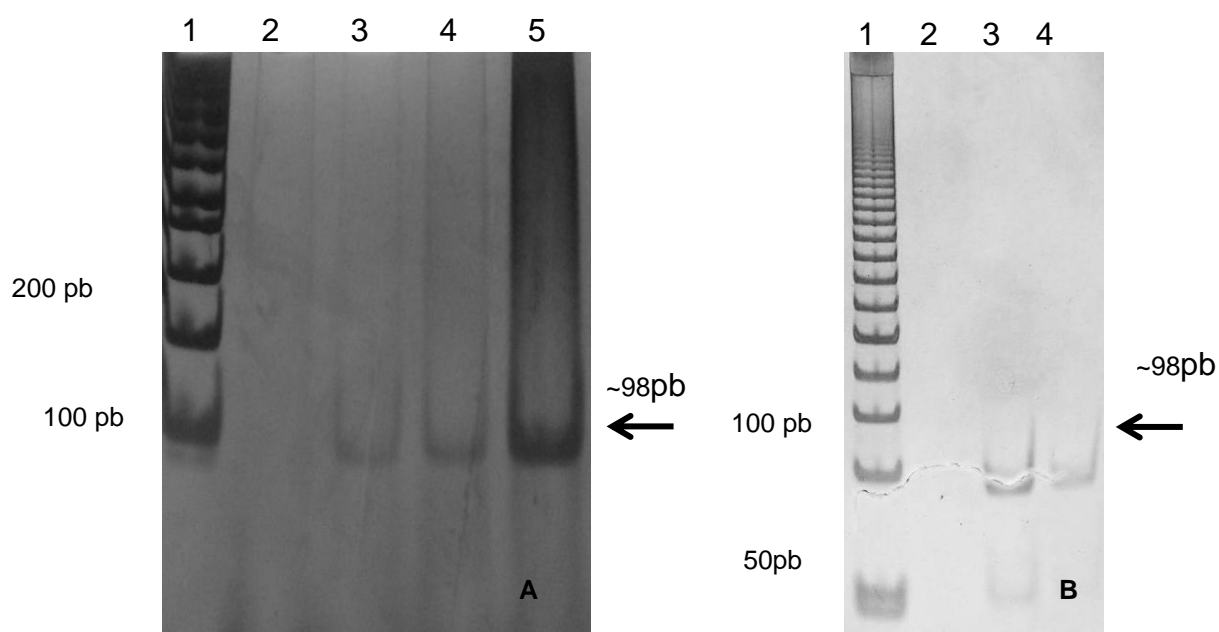


Figura 5: Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida 10%, da PCR do gene *lep*. **A:** (1) padrão de pares de base 100 pb Invitrogen®; (2) Controle negativo mix da PCR sem DNA; (3) e (4) DNA extraído de larvas coletadas com cinco dias após o início do experimento (DNA extraído com *Kit Qiagen*); (5) Controle positivo de DNA de carne bovina (DNA extraído *in house*). **B:** (1) Padrão de pares de base 50 pb Invitrogen®; (2) Controle negativo da PCR; (3) Controle positivo de DNA de carne bovina (DNA extraído *in house*); (4) DNA extraído de larvas coletadas com cinco após o início o experimento (extraído *in house*).

Durante o processo de digestão, alterações bioquímicas produzidas por enzimas proteolíticas quebram as ligações peptídicas entre os aminoácidos, estas enzimas são dominantes no ambiente intestinal dos insetos, responsáveis por 95% da atividade digestiva total. As enzimas presentes na saliva têm um papel fundamental na digestão oral são, posteriormente incorporadas no saco gástrico, o que poderá explicar alguma da degradação do DNA durante a digestão larval (CANIÉ, 2010).

As amostras de tecidos, muito degradadas coletadas em cadáveres em um estado mais avançado de putrefação, ou as provenientes do conteúdo gástrico larvar, apresentam várias características desfavoráveis, que poderão ser responsáveis pelo insucesso da genotipagem, tais como a inibição da reação de PCR, a degradação do DNA e as alterações bioquímicas desta molécula (CANIÉ, 2010).

No entanto, muitos estudos têm sido realizados com amostras muito degradadas, como as provenientes do conteúdo gástrico larval, e os marcadores utilizados para a identificação de DNA humano e posterior comparação com uma amostra de referência do cadáver, são os: DNA nuclear das regiões repetidas em tandem (STR) (100-400 pb fragmentos) (ZEHNER *et al.*, 2004) e o DNA mitocondrial (mtDNA) e o gene amelogenina humano (AMEL 212-218 pb / 106-112 pb) (WELL *et al.*, 2001; LINVILLE *et al.*, 2002, LINVILLE e WELL , 2004).

Na busca de mais marcadores o gene leptina (*lep*) pode ser um bom candidato. Este gene está presente no cromossomo 4 de bovinos é constituído por três éxons separados por dois íntrons, dos quais o éxon 1 não é transcrito. A leptina é um hormônio protéico de 162 aminoácidos de 16 kDa sintetizado pelo gene da leptina, produzida principalmente pelos adipócito. Vários estudos têm demonstrado a homologia entre o gene da leptina de diversas espécies. O gene da leptina humana tem 84% de homologia com o gene da leptina de camundongos, 83% com o de ratos e 85% com o de bovinos e suínos (DOYON *et al.*, 2001; ZHANG *et al.*, 1994)

Além disso, sugerimos que várias vias de investigação devem ser perseguidas de forma a refinar esta técnica, que possam ser determinados protocolo para coleta *in loco*; pois, as larvas coletadas durante uma investigação forense devem ser preservadas e fixadas utilizando uma ampla variedade de técnicas, fazendo-se necessário a observação dos prováveis efeitos que esses conservantes podem influenciar na extração do DNA.

Neste estudo, foi possível expandirmos a lista de fontes de provas de DNA, mostrando que a análise do gene *lep* pode ser potencialmente usada para associar uma larva ao cadáver, corroborando com as ciências forenses.

E finalmente, embora a análise aqui apresentada foi capaz de identificar o conteúdo gastrointestinal das larvas, não houve a determinação de quanto tempo a larva inicialmente seria eficaz na ingestão e quando cessa sua alimentação efetiva antes do conteúdo possa ser recuperado, também não foi possível afirmar quais instares larvais são mais favoráveis para obtenção e avaliação do gastrointestinal.

CONCLUSÃO

Os estudos realizados após as devidas adequações e adaptações para os fatores mesológicos e eventuais para a realidade deste Estado, houve a confirmação da tese que é possível a identificação de DNA de vertebrados a partir do conteúdo gastrointestinal de larvas de dípteras necrofágicas, bem houve a determinação do gênero das larvas.

REFERÊNCIAS

- BUCHANAN, F. C.; FITZSIMMONS, C. J.; VAN KESSEL, A. G.; THUE, T. D.; WINKELMAN-SIM, D. C.; SCHMUTZ, S. M. Association of a missense mutation in the bovine leptin gene with carcass fat content and leptin mRNA levels. *Genetic Selection Evolution*, v. 34, p. 105-116, 2002.
- CAMPOBASSO, C.P; LINVILLE, J.G; WELLS, J.D; INTRONA, F. Forensic genetic analysis of insect gut contents. **Journal of Forensic Medicine and Pathology**, v. 26, n. 2, 2005.
- CARVALHO, E.C.T.C.; QUEIROZ, P.R: **Descrição das principais famílias de diptera utilizadas na entomologia forense**. 2006. Disponível em: <http://www.cpgls.ucg.br/ArquivosUpload/1/File/V%20MOSTRA%20DE%20PRODUO%20CIENTIFICA/SAUDE/47.pdf>. Acesso em 25/06/2014.
- CORREA, C.L.; KOLLER, W.W.; BARROS, A.T.M. Abundância relativa e sazonalidade de espécies de *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) no Pantanal Sul-Mato-Grossense, **Brasil. Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 19, n. 2, p. 85-88, 2010 .
- KOLLER, W.W; BARROS, A.T. M.; CORRÊA, E.C.: **Abundance and seasonality of *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae) in Southern Pantanal Brasil**. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, Jaboticabal, v. 20, n. 1, p. 27-30, jan.-mar. 2011
- KRÜGER, R.F.; RIBEIRO, P.B.; CARVALHO, C.J.B. Desenvolvimento de *Ophyra albuquerquei* Lopes (Diptera, Muscidae) em condições de laboratório. **Revista Brasileira de Entomologia 47**: 643–648. 2010.
- LI, X. et al. Mitochondrial DNA and STR analyses for human DNA from maggots crop contents: A forensic entomology case from central-southern China. **Tropical Biomedicine**, v. 28, n. 2, p. 333–338, 2011.
- LORD, W. D.; STEVENSON, J. R.. 1986. **Directory of forensic entomologists**. 2 ed. Misc. Publ. Armed Forces Pest Mgt. Board, 42 p. 1998.
- MARCHETTI, D.; ARENA, E.; BOSCHI, I.; VANIN, S. Human DNA extraction from empty puparia. **Forensic Science International 229** (2013) e26–e29. 2013. www.elsevier.com/locate/forsciint
- OLIVEIRA-COSTA, J. *Entomologia Forense*. Ed. Millenium. 1ª edição. 2003.
- OLIVEIRA, T.C.; VASCONCELOS, S. D. **Insects (Diptera) associated with cadavers at the Institute of Legal Medicine in Pernambuco, Brazil: Implications for forensic entomology**. *Forensic Science International* v. 198, n.1-3, p. 97-102, 2010.

PUJOL-LUZ, J. R.; ARANTES, L. C.H; CONSTANTINO, R. **Cem anos da entomologia forense no Brasil (1908 – 2008)**. São Paulo, Revista Bras. Entomologia. 2008.

REPOGLE, J.; LORD, W. D.; BODOWLE, B.; MEINKING, T.; TAPLIN D. Identification of host DNA by amplified fragment length polymorphism (AMP-FLP) analysis of human crab louse excreta. **Journal of Medical Entomology** 31: 686–690. 1998.

RODRÍGUEZ, M. A.; GARCÍA, T.; GONZÁLEZ, I.; ASENSIO, L.; MAYORAL, B.; LÓPEZ-CALLEJA, I.; HERNÁNDEZ, P.E.; MARTÍN, R. **Identification of goose, mule duck, chicken, turkey, and swine in foie gras by species-specific polymerase chain reaction**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 51, n. 6, p. 1524-1529, 2003.

SAMBROOK, J.; FRITSCHI, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. p.

TELETSCHEA, F.; MAUDET, C.; HANNI, C. **Food and forensic molecular identification: update and challenges**. TRENDS in Biotechnology, v. 23, n. 7 p. 360-366, 2005.

WAN, Q. H.; FANG, S.G. **Application of species-specific polymerase chain reaction in the forensic identification of tiger species**. Forensic Science International, v. 131, n. 1, p. 75–78, 2003.

WELLS, J.D.; INTRONA, F. Jr; CAMPOBASSO, D.V.; SPERLING, F.A.H. **Human and insect mitochondrial DNA analysis from maggots**. 2001. J Forensic Sci 2001;46(3):685–687. Disponível em: http://www.denverda.org/DNA_Documents/DNA%20Analysis%20from%20Maggots.pdf. Acesso em 30/06/2014.

ZHANG, Y.; GUANG, H. XIAO, H. Pupal case hydrocarbons of *Chrysomya megacephala* as an indicator of the postmortem interval. **Forensic Science International**, 169 (2007) 1-5. 1994.

ZEHNER, R.; AMENDT, J.; KRETTEK, R.; STR typing of human DNA from fly larvae fed on decomposing bodies. **Journal Forensic Sci.** 49:337-340. 2004.