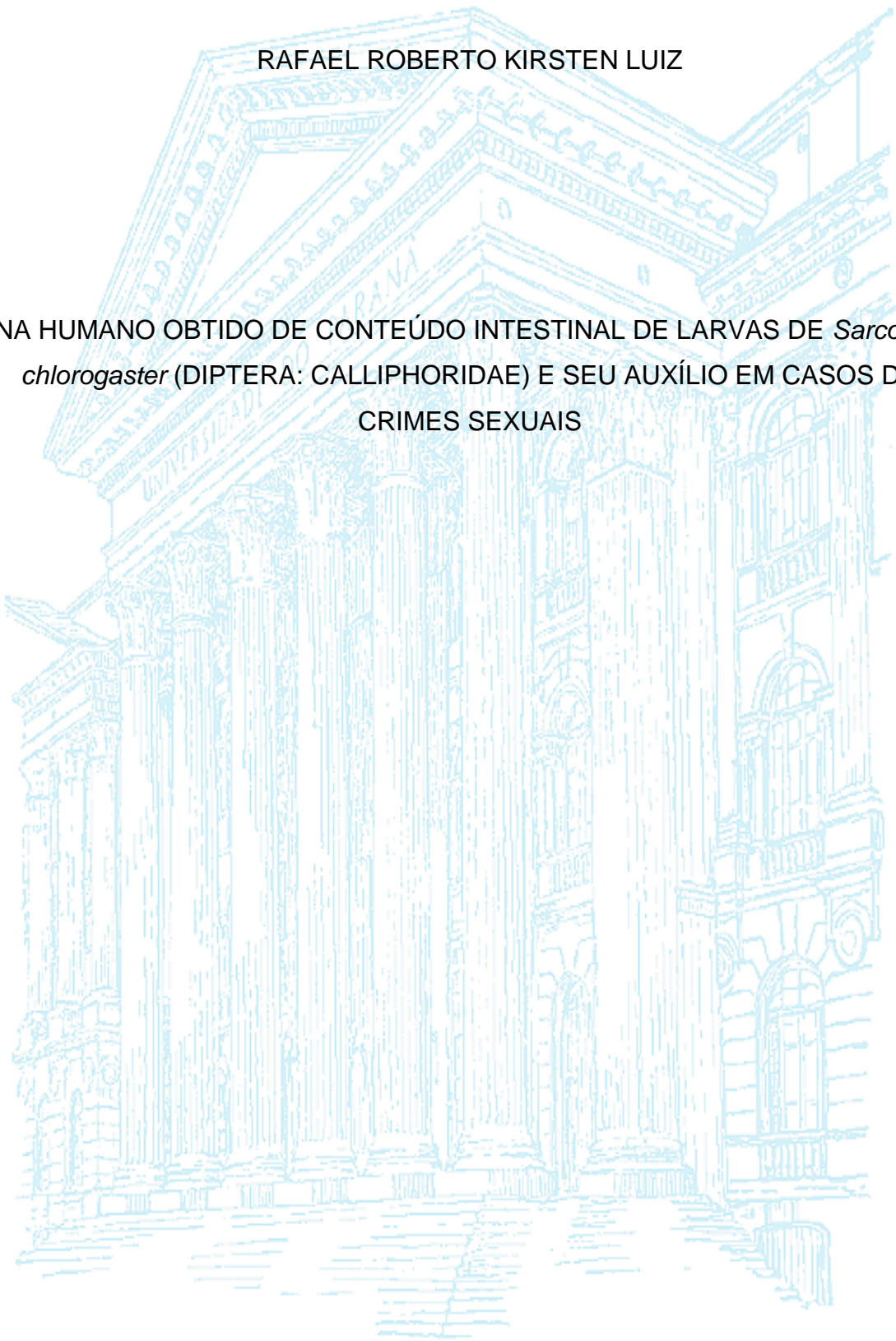


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

RAFAEL ROBERTO KIRSTEN LUIZ

DNA HUMANO OBTIDO DE CONTEÚDO INTESTINAL DE LARVAS DE *Sarconesia chlorogaster* (DIPTERA: CALLIPHORIDAE) E SEU AUXÍLIO EM CASOS DE CRIMES SEXUAIS



CURITIBA

2015

RAFAEL ROBERTO KIRSTEN LUIZ

DNA HUMANO OBTIDO DE CONTEÚDO INTESTINAL DE LARVAS DE *Sarconesia chlorogaster* (DIPTERA: CALLIPHORIDAE) E SEU AUXÍLIO EM CASOS DE CRIMES SEXUAIS

Monografia apresentada ao curso de Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas, como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas, pela Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Danielle Malheiros Ferreira

Co-orientadora: Dr<sup>a</sup> Karine Pinto e Vairo

CURITIBA

2015

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, Ana e Rubens, pelo incentivo, suporte e amor incondicional durante todos esses anos.

Às minhas orientadoras, Danielle e Karine, pelo apoio, compreensão, dedicação e confiança no meu trabalho.

Aos amigos da Universidade: Lyvia, Saritha, Amanda, Fernando, Luana e todos aqueles que tornaram o caminhar durante esses anos mais leve e afável.

Aos amigos do Instituto de Criminalística, Marianna, Leonardo, Marcelo, Carlos, Hemerson, Claudia e Hellen, que muito me ensinaram ao longo de dois anos de convivência.

À Regina, Luana, Raphael, Mariana e Luiza os quais tenho como uma segunda família, pelo incondicional carinho, amor e fortaleza.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a minha formação, meu eterno obrigado.

## RESUMO

As ciências forenses são de grande utilidade para a solução de crimes que anteriormente não poderiam ser solucionados. A análise genética pode ser de grande auxílio quando se trata de corpos em avançado grau de decomposição ou quando não há a possibilidade de identificação por outros métodos, tais como a papiloscopia. Já a entomologia pode contribuir com dados sobre a possível movimentação de corpos em locais de crime e o cálculo do tempo de exposição do cadáver. O presente trabalho uniu as duas ciências com o objetivo de recuperar DNA humano a partir de larvas de *Sarconesia chlorogaster* alimentadas com material biológico de origem humana. Para tal, foram utilizados exemplares de 5 fases distintas de desenvolvimento (larvas de 1º, 2º e 3º instar, pupas e adultos) alimentadas com dieta artificial acrescida de sêmen humano em diferentes quantidades (500 µl, 1500 µl e 3000 µl). Utilizou-se 15 exemplares por tratamento para extração de DNA e obtenção de perfis genéticos. Tais perfis foram comparados com o doador de sêmen. Em 87% das amostras foi possível obter DNA, autossômico e/ou do cromossomo Y humanos. Nas larvas de 2º instar sob tratamento de 3000 µl, em ambas as frações masculina e feminina, separados por extração diferencial segundo protocolo do FBI, foi possível a amplificação dos 16 regiões STR do kit PowerPlex® 16 HS, sendo 13 deles incluídos no CODIS. Com esse resultado, foi possível a comparação com material biológico (sangue) do doador, anteriormente extraído por método de resina *Chelex*, e constatação de que o material proveniente da extração do trato gastrointestinal das larvas e o perfil do doador eram compatíveis. Este resultado indica que larvas de *Sarconesia chlorogaster* obtidas de corpos em decomposição podem conter DNA humano se estas tiverem ingerido sêmen do agressor. Portanto, esta é uma prática passível de ser implementada na rotina forense.

**Palavras chave:** Entomologia Forense, Genética Forense, larvas, recuperação de amostra, *Sarconesia chlorogaster*.

## ABSTRACT

The forensic sciences are very useful for solving crimes that previously could not be resolved. The genetic analysis can be of great help when it comes to corpses in an advanced state of decomposition or when there is the possibility of identification by other methods, such as fingerprints. Entomology already can contribute data about the possible movement of corpses at crime scenes and calculation of exposure time. The present work has joined both sciences with the objective to recover human DNA from *Sarconesia chlorogaster* larvae fed on biological material of human origin. To this end, we used representatives of 5 distinct stages of development (larvae of 1st, 2nd and 3rd instar, pupae and adults) fed on artificial diet plus human semen in different amounts (500  $\mu$ l, 1500  $\mu$ l and 3000  $\mu$ l). 15 representatives per treatment were used for DNA extraction and genetic profiling. Such profiles were compared with the sperm donor. In 87% of the samples, it was possible to obtain DNA, of autosomal and/or of the human Y chromosome. In the second instar larvae under 3000  $\mu$ l treatment, in both male and female, fractions separated by differential extraction according to FBI protocol, it was possible to amplify 16 STR PowerPlex® 16 HS kit, 13 of them being included in CODIS. With this result, it was possible to compare then with biological material (blood) from the donor, previously extracted by resin *Chelex* method, and find that the material comes from the extraction of the gastrointestinal tract of the larvae and the profile of the donor were compatible. This result indicate that larvae of *Sarconesia chlorogaster* obtained from decomposing corpses may contain human DNA if they have ingested semen of the assailant. Therefore, this is a practice wich can be implemented in routine.

**Keywords:** Forensic Entomology, Forensic Genetics, larvae, sample recovery, *Sarconesia chlorogaster*.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>6</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>7</b>
2.1	OBJETIVO GERAL	7
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	7
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>8</b>
3.1	HISTÓRICO DAS CIÊNCIAS FORENSES	8
3.1.1	USO DA ENTOMOLOGIA NAS CIÊNCIAS FORENSES	8
3.1.2	MARCADORES MOLECULARES NA IDENTIFICAÇÃO HUMANA	8
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>12</b>
4.1	AMOSTRAS	12
4.1.1	SÊMEN	12
4.1.2	CULTIVO DAS LARVAS	12
4.2	ANÁLISE LABORATORIAL	13
4.2.1	EXTRAÇÃO DE DNA	13
4.2.2	QUANTIFICAÇÃO DO DNA	15
4.2.3	PCR E ANÁLISE DOS STR	16
4.2.4	ANÁLISE DOS RESULTADOS	17
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>18</b>
5.1	AVALIAÇÃO DA QUANTIFICAÇÃO	18
5.2	ANÁLISE DOS STR	21
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>25</b>
<b>7</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>28</b>
<b>8</b>	<b>INSTITUIÇÕES ENVOLVIDAS</b>	<b>29</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>30</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Ciência forense é o resultados dos esforços de geração e transferência de tecnologia e conhecimento com o intuito de esclarecer questões de segurança pública e judicial (FACHONE & VELHO 2007). Dentre várias áreas abordadas pela ciência forense duas, em particular, serão abordadas com maior ênfase nesse trabalho: a entomologia e a genética forense. Em um primeiro momento, serão tratadas de maneira isolada para melhor entendimento de suas particularidades e posteriormente serão utilizadas em conjunto para condução do trabalho. De acordo com o Sistema Nacional de Informações de Segurança Pública (SINESP), o registro de ocorrência de crimes sexuais no Brasil aumentou de 25.485 no ano de 2009 para 48.031 em 2012. Destas vítimas, muitas são mortas e têm seus corpos ocultados por longos períodos. Quando encontrados, estes se encontram em estágios diversos de putrefação, situação que dificulta a obtenção de material genético do agressor em virtude da degradação sofrida por este material pela ação do tempo, tornando inviável para análise. Dentro deste contexto, torna-se importante a utilização de diversos métodos para a identificação dos suspeitos.

Há a possibilidade de obtenção de material genético mais preservado a partir do trato intestinal de larvas de dípteros necrófagos. Portanto, procurando simular situações ocorrentes em casos de abuso sexual seguido de morte e ocultação de cadáveres, este trabalho teve por objetivo recuperar DNA humano passível de análise a partir do intestino de larvas de dípteros necrófagos alimentadas com dieta artificial acrescida de sêmen humano.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

- Recuperar DNA humano em moscas necrófagas alimentadas com sêmen humano para fins de identificação individual.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Cultivar dípteros necrófagos e alimentá-los artificialmente com diferentes quantidades de sêmen humano;
- Avaliar a qualidade do DNA humano recuperado a partir de diferentes estágios de desenvolvimento - instares larvais, pupas e adultos;
- Analisar STR (unidades de repetição curtas em tandem de pares de base do DNA) do doador de esperma a partir de conteúdo gastrointestinal das larvas, pupas e adultos;
- Estimar a quantidade mínima de DNA passível de ser amplificada e analisada.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Histórico das ciências forenses

A utilização da ciência para a elucidação de crimes teve seu início paralelamente ao surgimento da civilização, entretanto a utilização de conhecimentos químicos para esse fim é datado do final do século XVII (FARIAS, 2007). Nascida da Medicina Legal, a Ciência Forense é uma área interdisciplinar que abrange conhecimentos da Química, Biologia, Física, Matemática, e outras ciências para a elucidação de crimes (MAIA, 2012). Pode-se dizer que a criminalística foi fundada por Hans Gross, ao escrever “Handbuch für Untersuchungsrichter: Als System der Kriminalistik” (Manual para Juizes de Investigação: Como Sistema da Criminalística, em português), uma vez que foi o primeiro a utilizar esse termo, sendo desde então considerado o pai dessa ciência (MAIA, 2012). Entretanto, existiu outro personagem histórico o qual merece esse título: Song Ci (1186-1249) teria sido um médico legista chinês do século XIII e também autor de “*Xi Yuan Ji Lu*” (Coletânea de Casos de Injustiça Retificados, em português), manual constendo regras para que médicos legistas não cometessem erros durante uma necropsia. Também foi o primeiro a reunir informações sobre a utilização de insetos na elucidação de um crime, dando origem à entomologia forense.

##### 3.1.1 Uso da entomologia nas ciências forenses

O estudo dos insetos torna-se importante para as ciências forenses, por serem considerados os principais artrópodes atuantes na decomposição de carcaças e cadáveres, realizada tanto por organismos adultos, quanto por seus imaturos. Tal característica ressalta a importância desses animais para a elucidação do tempo de colonização do cadáver por meio da identificação dos insetos, bem como de seus estágios de desenvolvimento (THYSSEN, 2008).

Além da determinação do tempo de colonização do cadáver, a coleta de insetos encontrados em cadáveres apresenta outras importantes finalidades, tais como determinar se houve deslocamento do corpo entre localidades que apresentam entomofauna diferentes. Entretanto, para atingir esses objetivos, há a necessidade de chaves de identificação, bem como especialistas, além da devida conservação do espécime e acompanhamento de seu desenvolvimento, o que nem sempre acontece e é possível na rotina pericial (TOMBERLIN, 2011).

O estudo da entomologia torna-se importante não apenas para a apuração do tempo de exposição do cadáver ao ambiente, mas também para uma possível identificação de cadáveres, utilizando-se insetos necrófagos que podem ser encontrados nesse tipo de matéria em estado de decomposição (THYSSEN, 2008). Através do isolamento, amplificação e caracterização do material genético humano, o qual pode ser encontrado no trato digestivo de insetos hematófagos e necrófagos, pode-se prover a identidade do indivíduo do qual as larvas se alimentaram ou do suspeito, em caso de estupro, quando as larvas se alimentam do sêmen (THYSSEN, 2008).

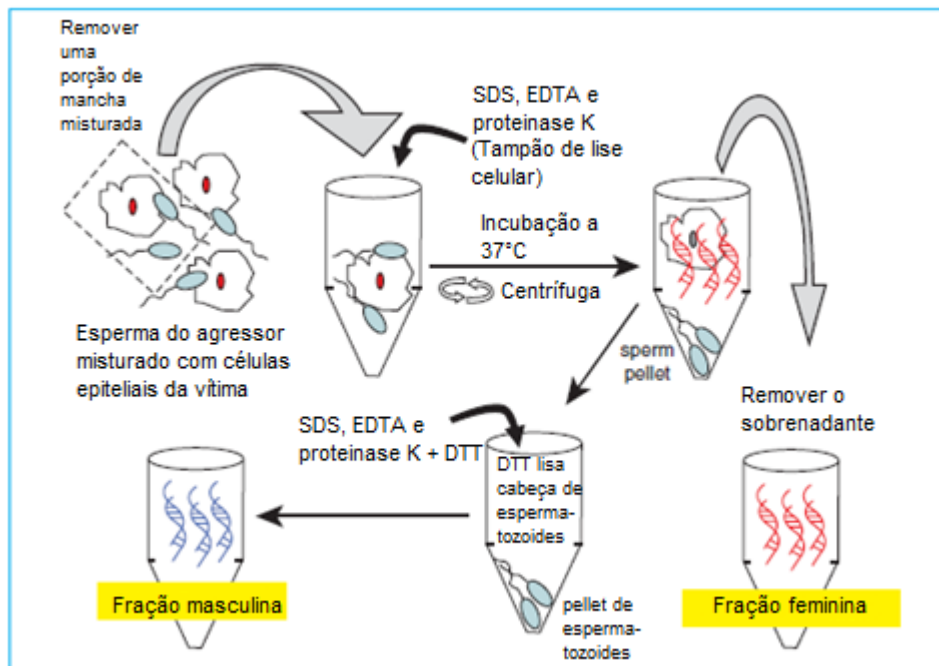
Além da utilização do DNA, especialmente o mitocondrial, para a identificação de estágios imaturos de insetos encontrados em cadáveres, pode-se identificar os restos humanos dos quais as larvas presentes se alimentaram (DIZINNO *et al.* 2002). A identificação pode também ser realizada, coletando-se o material armazenado no papo, localidade em que não há ação de enzimas digestivas, possibilitando a preservação do material genético (OLIVEIRA-COSTA, 2011).

### 3.1.2 Marcadores moleculares na identificação humana

A genética teve sua primeira utilização para fins de identificação criminal em 1985, na Inglaterra, em um caso de estupro, no qual a partir do sangue coletado de um suspeito, o autor do delito foi identificado, tornando-se desde então uma das principais ferramentas das ciências forenses na elucidação de crimes sexuais, bem como de identificação de cadáveres e testes de paternidade (AMABIS E MARTHO, 1995). O método mais usado é o

que utiliza marcadores moleculares hipervariáveis denominados microssatélites ou STR (do inglês, *Short Tandem Repeats*), referindo-se a regiões polimórficas curtas e repetitivas do DNA (BUTLER, 2005). Tal estudo é feito a partir da amplificação do material genético através da reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*), que permite a análise de DNA a partir de quantidades pequenas de amostras biológicas, como as provenientes de cabelo, manchas de sangue e outras que podem ser coletadas na cena de um crime. Em seguida à obtenção e amplificação do DNA é feita a análise de tamanhos dos fragmentos amplificados. Uma vez que tais regiões são hipervariáveis é possível se obter um perfil característico e único de cada indivíduo. Polimorfismos presentes no DNA mitocondrial e nuclear são passíveis de serem utilizados, cada qual com propósitos distintos (THYSSEN, 2008).

Como mencionado acima, a utilização de marcadores moleculares do tipo STR tem como objetivo a detecção de perfis genéticos e a ligação de vítimas ao suspeito. Em casos de violência sexual pode-se utilizar a técnica de extração de DNA diferencial. Esta permite que em amostras biológicas coletadas da vítima se separe a fração masculina (células provenientes do agressor, principalmente espermatozoides) da fração feminina (células epiteliais, provenientes principalmente da vítima, portanto a denominação feminina) e, então, é possível realizar a extração de DNA das amostras separadas (Figura 1). Tal procedimento é importante para impedir que, durante a PCR, haja uma amplificação preferencial do DNA da vítima, já que a quantidade de material genético obtido desta é, em geral, muito superior à quantidade de material genético obtido do agressor (BUTLER, 2005).



**Figura 1.** Extração diferencial para obtenção de DNA da fração masculina e feminina.  
 Fonte: modificado de Butler (2005). Legenda: EDTA: ácido etilenodiaminotetracético; SDS: dodecilsulfato de sódio; DTT: ditiotreitól.

Atualmente, alguns países possuem banco de dados contendo perfis genéticos coletados de vítimas de abuso sexual, mantendo não apenas perfis obtidos a partir de marcadores STR autossômicos, mas também dos microssatélites oriundos do cromossomo Y em crimes nos quais não há suspeitos. Atualmente são utilizados 13 marcadores STR pelo CODIS (*Combined DNA Index System*), programa criado nos Estados Unidos, que são utilizados por apresentarem alta variabilidade entre a população e foram inicialmente organizados pelo FBI. Atualmente outros países, inclusive o Brasil, que recentemente utiliza o sistema CODIS para a armazenagem de perfis genéticos de crimes sem solução, além de criminosos sexuais.

A utilização do DNA na esfera forense tornou-se muito ampla, podendo ser utilizado na identificação de suspeitos de crimes sexuais; identificação de cadáveres em decomposição, carbonizados, relacionando instrumentos lesivos e vítima; abortos provocados; paternidade nos casos de gravidez resultante de estupro (LEITE *et al.*, 2005).

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Amostras

#### 4.1.1 Sêmen

A coleta do material vaginal através de *swab* em caso de estupro é muito importante para a possível identificação do agressor. Visando a simulação de casos de violência sexual e a utilização da entomologia forense como ferramenta para a obtenção de material degradado, foi introduzido sêmen humano na dieta artificial das larvas conforme descrito no item 4.1.2. O sêmen foi obtido de doador anônimo, do qual foi previamente obtido o perfil genético de 15 de marcadores STR e Amelogenina, o qual consiste em marcador sexual, para controle.

#### 4.1.2 Cultivo das larvas

A espécie utilizada para o estudo foi *Sarconesia chlorogaster* (Wiedemann) devido a sua abundância na região de Curitiba e trabalhos conhecidos realizados com tal espécie referentes ao tempo de colonização do cadáver (VAIRO *et al.*, 2015).

Para a obtenção das larvas, foi utilizado como substrato de oviposição carne bovina moída, na qual os adultos foram mantidos a  $27 \pm 1^\circ\text{C}$ , com fotofase de 12h e  $70 \pm 10\%$  de umidade relativa para a maturação de seus ovos, conforme descrito por Estrada e colaboradores (2009). Assim que houve oviposição, estas foram retiradas do substrato sob lupa com auxílio de um pincel fino umedecido e transferidas para recipientes de plástico com capacidade de 500 ml, contendo 1g de dieta artificial de carne bovina moída para cada larva. Em cada recipiente foram colocadas aproximadamente 100 larvas, e, portanto 100g de dieta.

Os recipientes contendo as larvas foram separados por quantidade de sêmen inoculado à dieta, sendo estes: 500  $\mu\text{l}$ , 1500  $\mu\text{l}$  e 3000  $\mu\text{l}$ .

Estes frascos foram inseridos em recipientes maiores com capacidade para 1000 ml (transparentes para facilitar a observação e identificação com data, número de exemplares e instar larval), contendo vermiculita para empupação das larvas errantes. Os recipientes foram armazenados em câmaras climatizadas a  $27 \pm 1^\circ\text{C}$ , fotofase de 12h e  $70 \pm 10\%$  de umidade relativa, sendo que as datas de fixação do material seguiram o desenvolvimento da espécie e mudanças de instares sob essas condições. Decorridas 24h após a eclosão das larvas, foram retiradas 15 larvas de primeiro instar, as quais foram lavadas com hipoclorito de sódio (NaClO) a 10%, para garantir que o material posteriormente amplificado fosse do interior da larva; e água destilada para limpar os resíduos de NaClO, uma vez que este é um conhecido inibidor de PCR. 24 horas após a fixação das larvas de primeiro instar foram fixadas as de segundo instar, seguindo o mesmo procedimento de lavagem. 96 horas após essa etapa, houve a fixação das larvas de terceiro instar, seguindo, também os mesmos procedimentos de lavagem a fim de evitar contaminação externa.

Observou-se que 48h após a fixação de larvas do terceiro instar, todas as larvas do tratamento com 3000  $\mu\text{l}$  de sêmen haviam empupado, as restantes empuparam apenas 24 horas depois, das quais 15 de cada tratamento foram fixadas e, após 168 horas, os adultos emergiram e 15 de cada tratamento foram fixados.

O ciclo de vida de *Sarconesia chlorogaster* mantida em condições laboratoriais (temperatura de  $27 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $70 \pm 10\%$  de umidade relativa, e fotofase de 12 horas), foi de aproximadamente 19 dias, conforme observado na literatura (BONATTO, 1996).

## 4.2 Análise laboratorial

### 4.2.1 Extração de DNA

A extração do material contido no intestino das larvas cultivadas e alimentadas com a dieta artificial suplementada com sêmen deu-se por maceração dos indivíduos e extração diferencial do DNA total do material. De maneira aleatória foram selecionadas 15 larvas de cada tratamento (500  $\mu\text{l}$ ,

1500 µl e 3000 µl de sêmen na dieta) e isto para cada um dos três instares larvais, além de pupas e adultos (Tabela 1).

**Tabela 1.** Desenho experimental mostrando o número de exemplares de cada tratamento utilizados para os ensaios de extração de DNA.

Estágio de desenvolvimento	Quantidade de sêmen (µl) <sup>1</sup>	Número de exemplares <sup>2</sup>
1º instar	500	15
	1500	15
	3000	15
2º instar	500	15
	1500	15
	3000	15
3º instar	500	15
	1500	15
	3000	15
Pupas	500	15
	1500	15
	3000	15
Adultos	500	15
	1500	15
	3000	15

Nota: <sup>1</sup> Refere-se à quantidade de sêmen adicionada na dieta artificial das moscas. <sup>2</sup> Indica o número de exemplares utilizados para maceração e extração de DNA.

A extração diferencial de DNA foi feita a partir de tratamento com tampão de lise, proteinase K e DTT (ditiotreitól), seguido de extração orgânica por meio de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1), conforme procedimento operacional padrão (POP) do FBI, com modificações.

Os exemplares foram macerados em 200 µl de tampão de lise (10 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 100 mM NaCl, 2% SDS, pH 8,0), acrescidos de 40 µl de proteinase K (10 mg/µl) e mantidos em banho-maria a 56°C por 24h. Após esse período as amostras foram centrifugadas a 16500 x g por 5 minutos, sendo, em seguida, separado sobrenadante, chamado a partir de então de fração feminina (FF), por conter, em casos de violência sexual, predominantemente células epiteliais da vítima. Já a porção sedimentada, chamada *pellet*, é denominada fração masculina (FM) e foi submetida a três lavagens com tampão de lavagem de esperma (10 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 50 mM NaCl, 2% SDS, pH 7.5), sendo cada lavagem seguida de agitação e centrifugação (5 minutos a 16500 x g), retirando-se completamente

o tampão a cada lavagem. Em seguida, foi adicionado 300 µl de tampão de lise, 40 µl de proteinase K (10 mg/µl) e 15 µl de DTT (ditiotreitól) (1M). Após agitação, a amostra foi levada a banho-maria por 2h à 37°C. A adição do DTT apenas na segunda fase da extração dá-se pela razão de esse ser capaz de quebrar a membrana do acrossomo, região em que se encontra o material genético do espermatozoide.

Em seguida, realizou-se a extração orgânica. Foi adicionado 500 µl da solução de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) a cada amostra, seguido de agitação e centrifugação (5 minutos a 16500 x g) para separação entre as fases. Utiliza-se esse método de extração, pois o fenol possui propriedades que desnaturam e possibilitam a solubilização de proteínas; o clorofórmio, além de ajudar na desnaturação, possibilita a formação de fases com maior estabilidade, sendo possível a distinção do solvente (orgânico) contendo as proteínas e a fase aquosa contendo o DNA. Já o álcool isoamílico não permite a formação de espumas durante a agitação da amostra, anterior a centrifugação. Aplicou-se ao método de extração três vezes, até a obtenção de apenas duas fases na amostra (orgânica e aquosa), tornando a solução, teoricamente, livre de impurezas, como contaminantes e inibidores.

Posteriormente, foi feita a precipitação do DNA com 1000 µl de etanol absoluto e estes foram mantidos à -20°C por 24 horas. Após esse tempo, as amostras foram centrifugadas a 16500 x g por 5 minutos, e o sobrenadante foi retirado por inversão. O DNA foi então eluído em 50 µl de água destilada.

O perfil genético do doador de sêmen foi extraído pelo método de resina *Chelex*® (resina magnética que se liga ao DNA e evita sua solubilização), utilizando sangue armazenado em cartão FTA (papel filtro com propriedade de lise de membranas celulares), do mesmo.

#### 4.2.2 Quantificação do DNA

A quantificação do DNA obtido foi feita através de PCR de tempo real no equipamento Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR Systems, utilizando-se o Quantifiler® Duo DNA Quantification Kit (limite de detecção de 0,006 ng/µl) e o programa HID Real-Time PCR Analysis Software v1.1, consistindo em um método que utiliza o mecanismo de amplificação de DNA

feita pela PCR, juntamente com a detecção de fragmentos amplificados e a posterior quantificação por fluorescência produzida durante os ciclos de amplificação.

#### 4.2.3 PCR e análise dos STRs

O material quantificado foi submetido à amplificação por PCR utilizando-se o *kit* comercial *PowerPlex® 16 HS System PCR Amplification Kit* (Promega). Os alelos dos *locus* STR são diferenciados pelo número de cópias da sequência de repetição contido na região amplificada e são distinguidos uns dos outros utilizando detecção de fluorescência após separação eletroforética. Este kit é amplamente utilizado no âmbito forense e permite a co-amplificação por meio da detecção de 3 diferentes fluoróforos, resultando na análise de 16 *locus*, sendo 15 STRs (Penta E, D18S51, D21S11, TH01, D3S1358, FGA, TPOX, D8S1179, vWA, Penta D, CSF1PO, D16S539, D7S820, D13S317 E D5S818) e mais a Amelogenina (marcador que permite identificação sexual).

Destes, 13 marcadores STR estão inclusos no CODIS (Sistema Combinado de Índices de DNA, em tradução livre), que se trata de um banco de dados criado por laboratórios criminais, a fim de identificar suspeitos de crimes. Os STR utilizados pelo CODIS são: CSF1PO, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, D21S11, FGA, TH01, TPOX, vWA e Amelogenina.

A mistura de reação, a qual contém Taq Polimerase e iniciadores específicos foi realizada seguindo o protocolo do kit com adaptações (Tabela 2).

**Tabela 2.** Reagentes utilizados para a reação de amplificação.

Reagentes	Volume/Quantidade
DNA molde	0,5-1ng
PowerPlex® 16 HS 5X master mix	2,5µl
PowerPlex® 16 HS 10X primer pair mix	1,75µl

Água

q.s.p. 12,5µl

Após o preparo da reação a amplificação foi realizada com a termociclagem indicada pelo fabricante (Tabela 3).

**Tabela 3.** Condições de ciclagem utilizadas na PCR.

Nº CICLOS	TEMPERATURA	TEMPO
1 ciclo	96°C	2 minutos
10 ciclos	94°C	30 segundos
	60°C	30 segundos
	70°C	45 segundos
	90°C	30 segundos
22 ciclos	60°C	30 segundos
	70°C	45 segundos
	60°C	30 minutos
1 ciclo	4°C	∞

O produto amplificado foi submetido à análise de fragmentos por meio do sequenciador Applied Biosystems® 3130 Genetic Analyzer, juntamente com a escala alélica (*allelic ladder*), o tamanho padrão ILS600 (*size standard*) e formamida Hi-Di e posteriormente submetido à análise pelo software GeneMapper® ID v.3.2 para comparação entre o perfil genético encontrado nas amostras e o perfil do doador.

#### 4.2.4 Análise dos resultados

Após a obtenção dos resultados das análises quantitativas, foi feito levantamento do número de amostras em que se obteve material proveniente de cromossomos autossômicos e do cromossomo Y e então tabulados com os respectivos valores de material genético obtido.



## 5 RESULTADOS

### 5.1 Avaliação da quantificação

As concentrações de DNA obtidas de cada tratamento são mostradas na Tabela 4. Na maior parte dos tratamentos e seus respectivos instares conseguiu-se obter DNA humano proveniente do conteúdo gastrointestinal das larvas, pupas e até mesmo adultos. As maiores concentrações de DNA foram obtidas em larvas de 2º instar sob tratamento de 3000 µl de sêmen inserido na dieta. Neste, obteve-se na fração masculina, 0,034678 ng/µl para autossômicos e 0,022609 ng/µl para cromossomo Y.

As larvas de 1º instar sob tratamento de 500 µl de sêmen inserido na dieta separado em fração masculina, 3º instar sob tratamento de 500 µl separado em fração masculina e feminina, 3º instar sob tratamento de 1500 µl de material biológico separado em fração feminina não amplificaram nem material autossômico nem do cromossomo Y. Já em larvas de 1º instar sob tratamento de 1500 µl de sêmen separado em fração masculina, 2º instar sob tratamento de 500 µl de sêmen separado em fração feminina, 3º instar sob tratamento de 3000 µl de material biológico inserido na dieta separado em fração masculina e feminina, pupas submetidas aos três tratamentos de material biológico inserido na dieta, separadas em fração feminina, e adultos submetidos aos tratamentos de 500 µl e 1500 µl de material biológico inserido na dieta separados em fração feminina, obteve-se apenas material amplificado proveniente de cromossomos autossômicos.

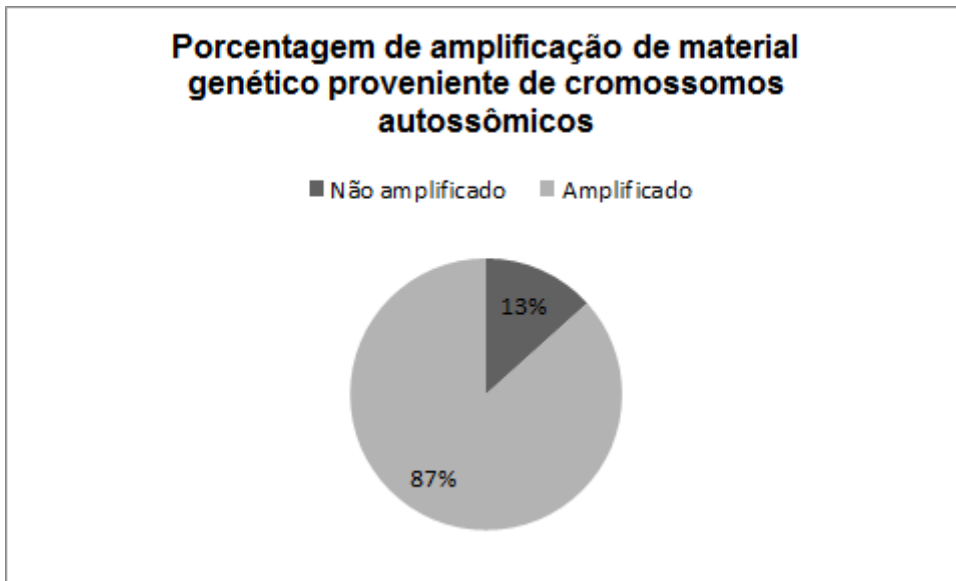
A partir da quantificação do material genético amplificado, proveniente no conteúdo gastrointestinal das larvas, pupas e adultos de *Sarconesia chlorogaster*, foi feita uma porcentagem de amplificação tanto de cromossomos autossômicos quanto sexual Y, conforme pode ser observado nas Figuras 2 e 3, uma vez que houve casos em que o material não pode ser amplificado.

**Tabela 4.** Relação de amostras e respectivas concentrações e quantidade de DNA proveniente de cromossomos autossômicos e do cromossomo sexual Y.

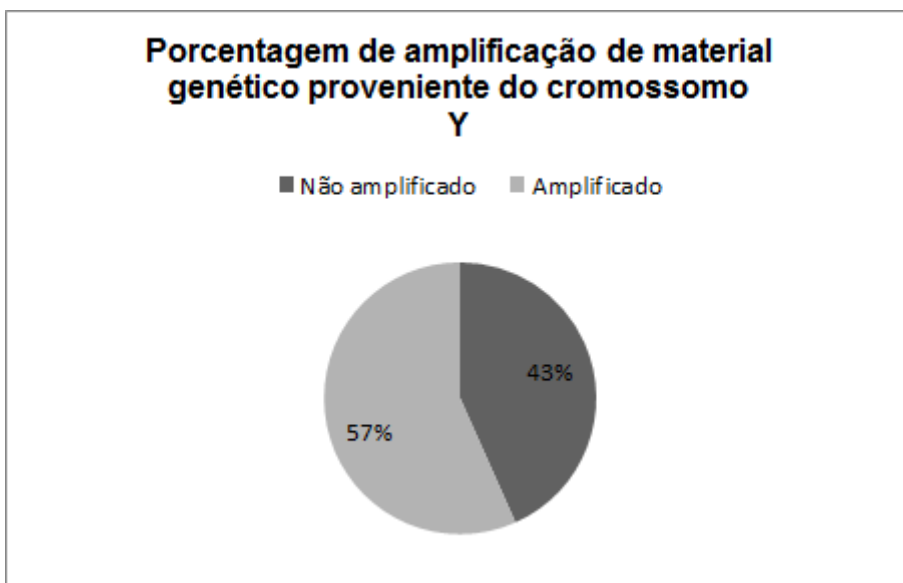
<b>Amostras</b>	<b>AUTOSSÔMICO</b> (ng/μl)	Quantidade (ng)	<b>Y</b> (ng/μl)	Quantidade (ng)
1º instar 500 FM	N/A	N/A	N/A	N/A
1º instar 500 FF	0,0034	0,1686	0,0031	0,1526
1º instar 1500 FM	0,0007	0,0336	N/A	N/A
1º instar 1500 FF	0,0018	0,0916	0,0008	0,0405
1º instar 3000 FM	0,0017	0,0864	0,0006	0,0295
1º instar 3000 FF	0,0023	0,1163	0,0012	0,0609
2º instar 500 FM	0,0061	0,3070	0,0074	0,3679
2º instar 500 FF	0,0008	0,0417	N/A	N/A
2º instar 1500 FM	0,0127	0,6346	0,0121	0,6031
2º instar 1500 FF	0,0024	0,1178	0,0020	0,1021
2º instar 3000 FM	0,0347	1,7339	0,0226	1,1305
2º instar 3000 FF	0,0098	0,4888	0,0091	0,4528
3º instar 500 FM	N/A	N/A	N/A	N/A
3º instar 500 FF	N/A	N/A	N/A	N/A
3º instar 1500 FM	0,0020	0,0987	0,0002	0,0110
3º instar 1500 FF	N/A	N/A	N/A	N/A
3º instar 3000 FM	0,0004	0,0223	N/A	N/A
3º instar 3000 FF	0,0003	0,0141	N/A	N/A
Pupa 500 FM	0,0023	0,1170	0,0009	0,0447
Pupa 500 FF	0,0022	0,1078	N/A	N/A
Pupa 1500 FM	0,0084	0,4219	0,0042	0,2083
Pupa 1500 FF	0,0014	0,0692	N/A	N/A
Pupa 3000 FM	0,0097	0,4837	0,0085	0,4228
Pupa 3000 FF	0,0012	0,0576	N/A	N/A
Adulto 500 FM	0,0011	0,0559	0,0004	0,0183
Adulto 500 FF	0,0002	0,0101	N/A	N/A
Adulto 1500 FM	0,0013	0,0657	0,0003	0,0140
Adulto 1500 FF	0,0008	0,0412	N/A	N/A
Adulto 3000 FM	0,0005	0,0226	0,0002	0,0096
Adulto 3000 FF	0,0030	0,1519	0,0012	0,0620

Legenda: FM: fração masculina; FF: fração feminina; AUTOSSÔMICO: DNA proveniente de cromossomos autossômicos; Y: DNA proveniente de cromossomo Y; N/A: material não amplificado.

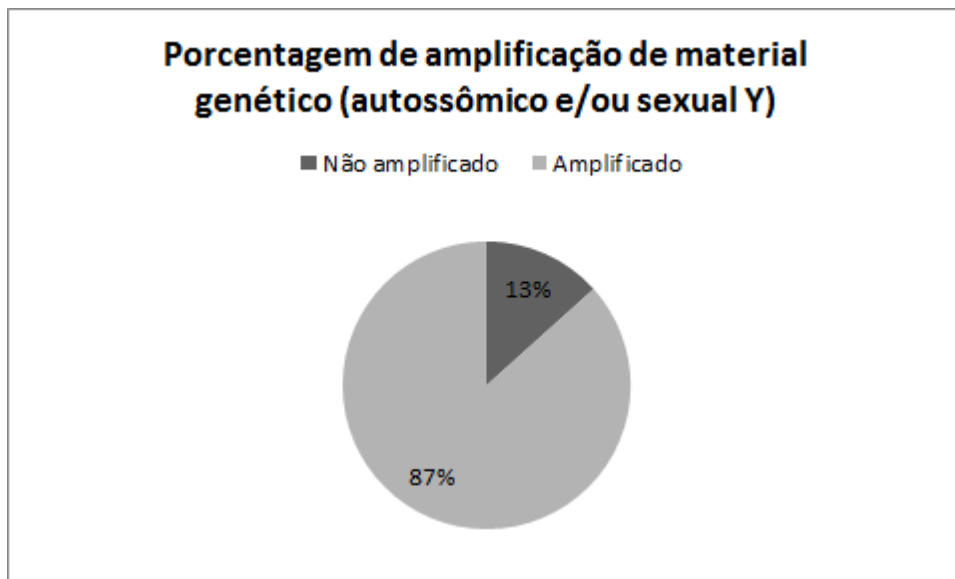
É possível verificar que se obteve DNA de cromossomos autossômicos em 87% (26) das amostras, porém não em 13% (4 não amplificaram, indicando ausência ou quantidade insuficiente de DNA). Já para o cromossomo Y, 57% (17) amplificaram, apresentando alguma quantidade de material genético, e 47% (13), não amplificaram. Ao todo, 87% das amostras tiveram seu material genético amplificado, seja ele autossômico e/ou sexual Y, enquanto 13% não amplificaram nenhum tipo de material, conforme observado na Figura 4.



**Figura 2.** Porcentagem de amplificação de material genético proveniente de cromossomos autossômicos.



**Figura 3.** Porcentagem de amplificação de material genético proveniente do cromossomo Y.



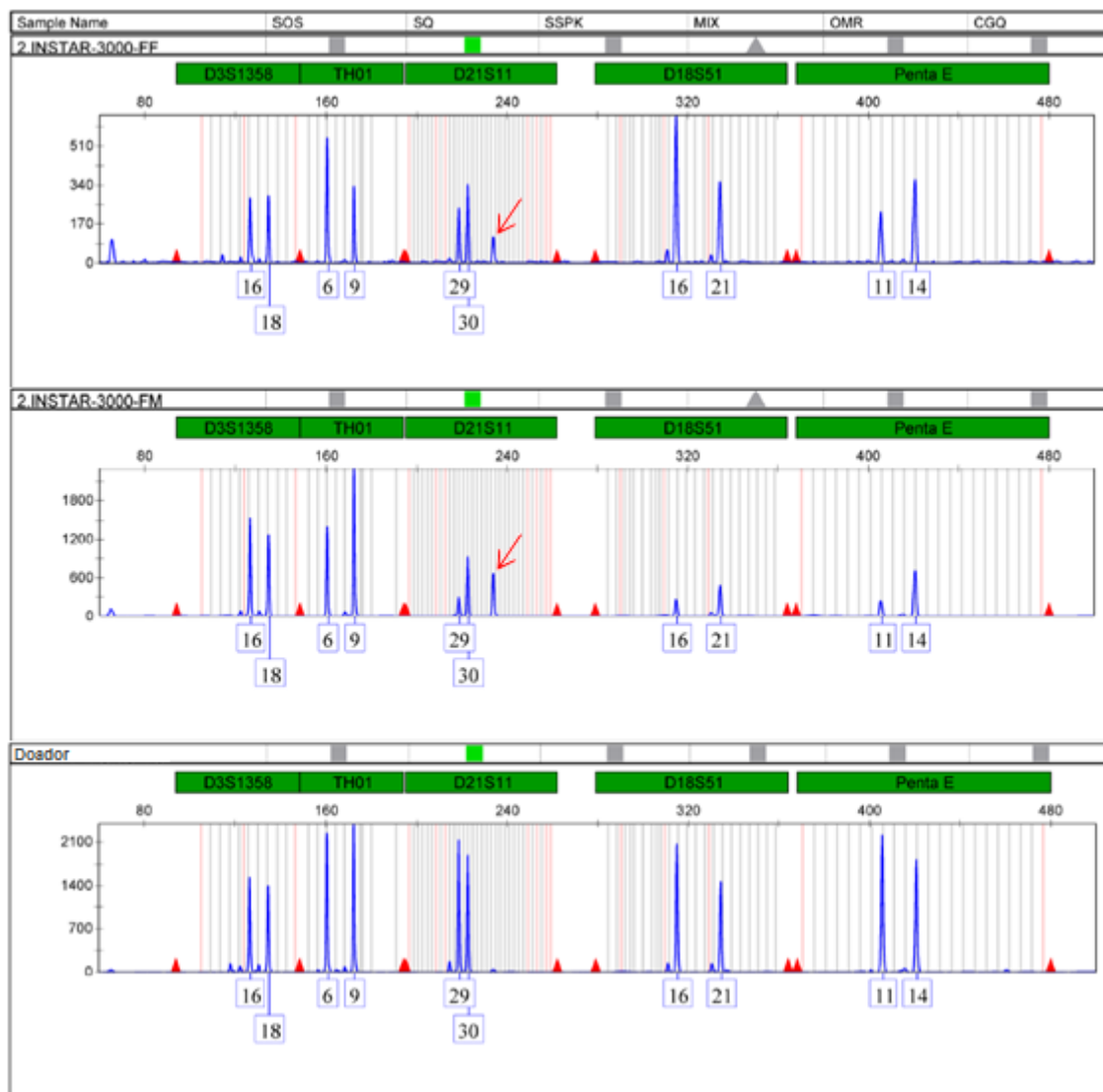
**Figura 4.** Porcentagem total de amplificação de material genético, sendo ele autossômico e/ou sexual, referente ao cromossomo Y.

## 5.2 Análise dos STR

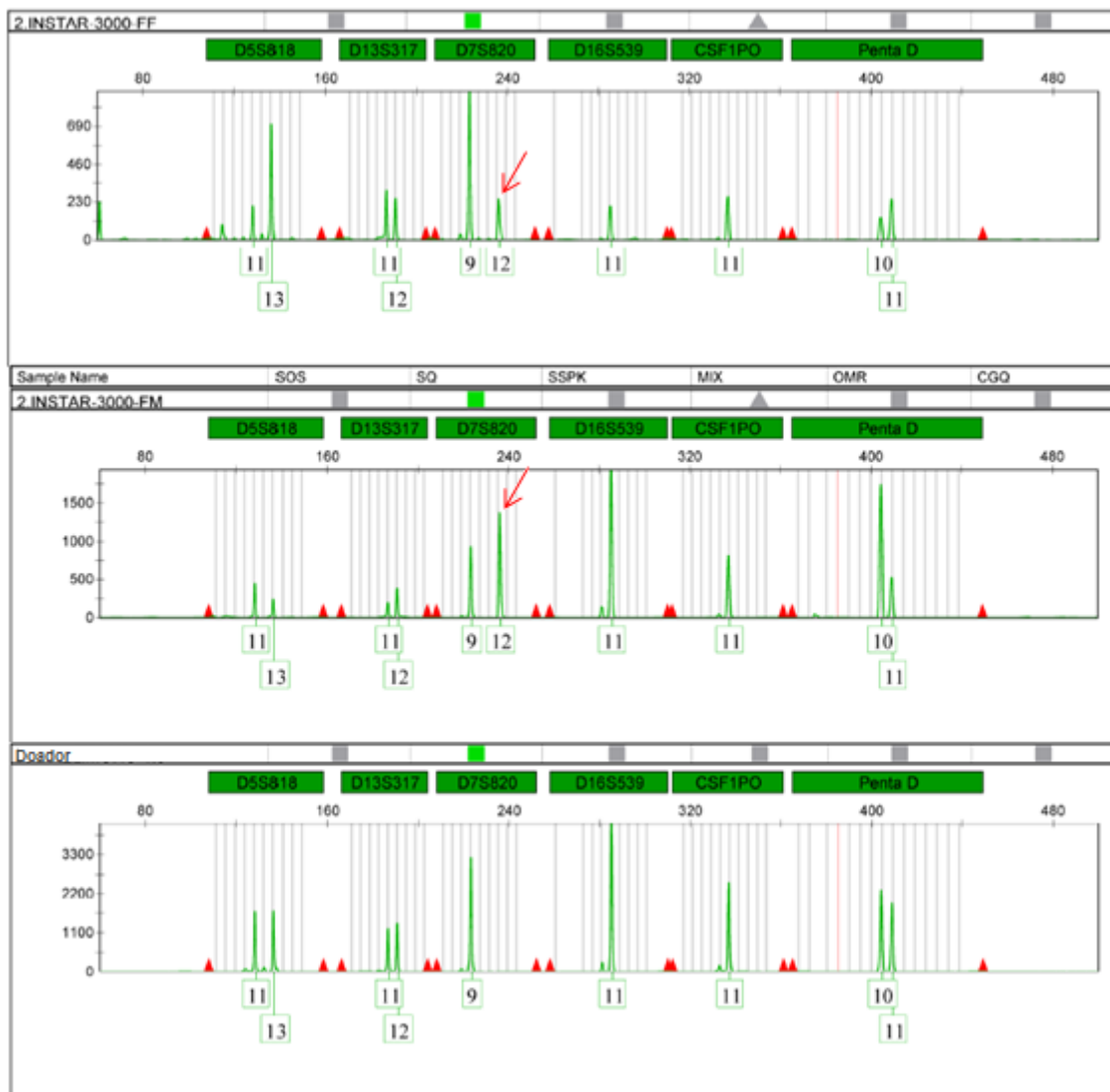
Foi possível a obtenção de perfil genético apenas a partir de larvas de 2º instar submetidas ao tratamento de 3000 µl de sêmen inserido na dieta. Tanto em fração feminina quanto em fração masculina obteve-se perfil viável para comparação com o material do doador (Figuras 5, 6 e 7).

Observou-se que nessa fase de desenvolvimento das larvas todos os 16 *locus* amplificados nas amostras tiveram o perfil genético idêntico ao do doador. Nos *locus* D21S11e D7S820 das amostras de conteúdo gastrointestinal tanto de fração masculina quanto feminina houve possível artefato, uma vez que um alelo amplificado não é pertencente ao doador (Figura 5 e 6). Houve aparecimento de um possível *stutter* (repetição de uma região curta e repetitiva do DNA, alinhando-se a alelos) no *locus* vWA, na fração feminina (Figura 7).

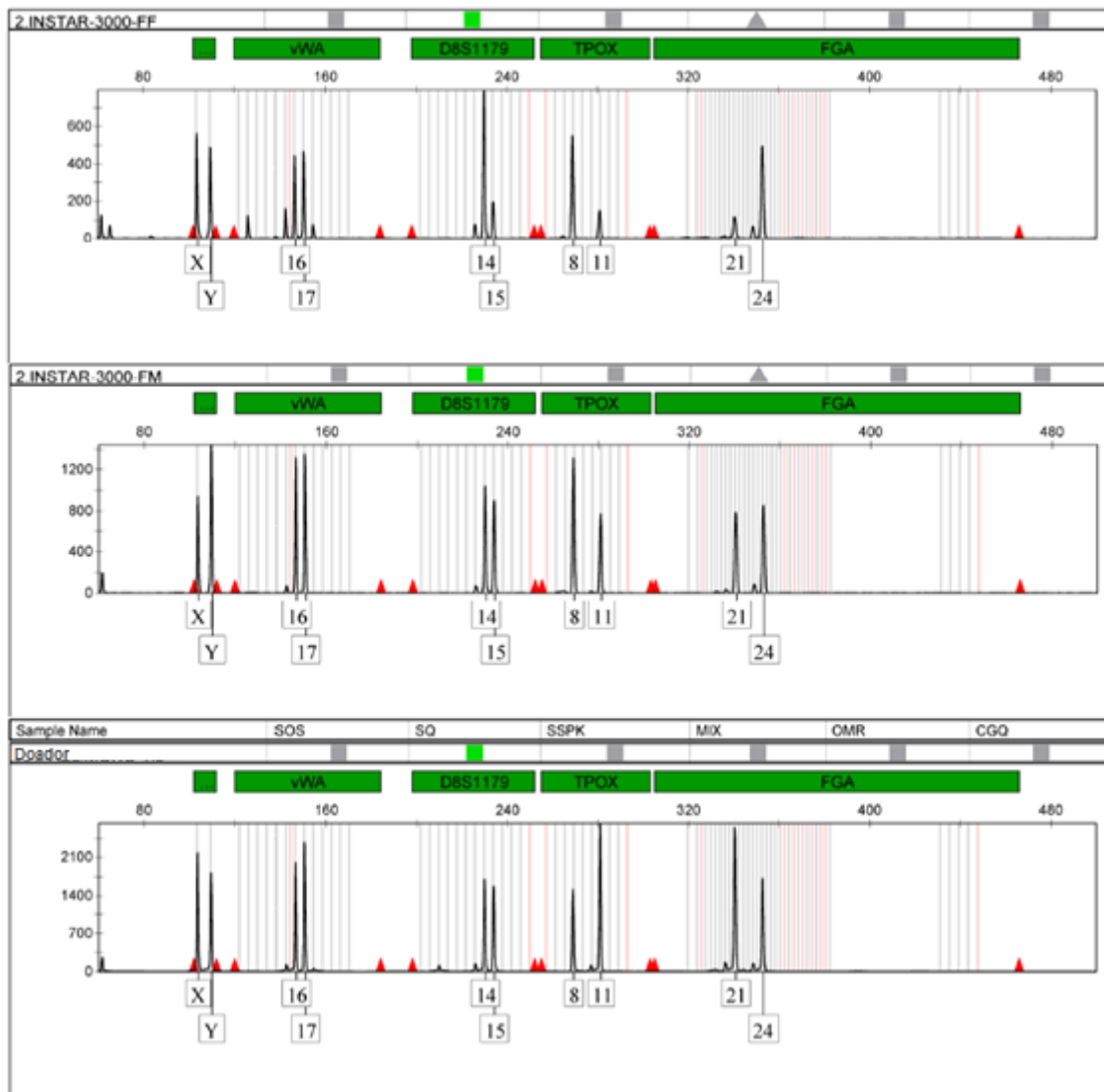
É importante ressaltar que os 13 *locus* referentes ao CODIS foram amplificados.



**Figura 5.** Comparação de material amplificado das regiões D3S1358, TH01, D21S11, D18S51 e Penta E entre as amostras de conteúdo intestinal de larvas de 2<sup>o</sup> instar sob tratamento de 3000  $\mu$ l FF (fração feminina) e FM (fração masculina) e o doador. Há um possível artefato indicado pela seta, entretanto seu alelo não foi identificado.



**Figura 6.** Comparação de material amplificado das regiões D5S818, D13S317, D7S820, D16S539, CSF1PO e Penta D entre as amostras de conteúdo intestinal de larvas de 2<sup>o</sup> instar sob tratamento de 3000  $\mu$ l FF (fração feminina) e FM (fração masculina) e o doador. Pode-se observar um *stutter* na região D7S820, na qual um pico de alelo 12, indicado pela seta aparece nas amostras de conteúdo intestinal tanto em FF quanto em FM, e não aparecendo no doador.



**Figura 7.** Comparação de material amplificado das regiões Amelogenina, vWA, D8S1179, TPOX e FGA entre as amostras de conteúdo intestinal de larvas de 2º instar sob tratamento de 3000 µl FF (fração feminina) e FM (fração masculina) e o doador.

## 6 DISCUSSÃO

Este trabalho destinou-se a obter DNA humano a partir de dípteros necrófagos alimentados com sêmen humano. Para tanto foram testadas várias quantidades de sêmen em diferentes estágios do desenvolvimento das moscas. Em larvas de 2º instar alimentadas com 3000 µl de sêmen foi possível obter perfil genético passível de análise.

Este resultado indica que larvas de *Sarconesia chlorogaster* obtidas de corpos em decomposição podem conter DNA humano se estas tiverem ingerido sêmen do agressor e podem ser utilizadas para obtenção de perfil genético proveniente de suspeitos de crimes sexuais. Tal abordagem pode ser acrescida ao método convencional de obtenção de DNA de agressores, os quais utilizam *swabs* para a coleta de material biológico a partir da cavidade vaginal, roupas e superfície corporal da vítima. O material proveniente dos *swabs* muitas vezes resulta em insucesso na obtenção de DNA e consequente impossibilidade de análise de perfil do agressor, uma vez que este DNA pode estar degradado em função do tempo de decomposição e condições ambientais (SILVA E PASSOS, 2006).

Uma explicação possível para a não obtenção de DNA em quantidades suficientes para obtenção de perfil em larvas de 1º instar sob tratamento de 500 µl de sêmen está na alimentação insuficiente dos indivíduos, que por consequência não absorveram material genético suficiente para a amplificação. Já no instar mais avançado (3º instar), as larvas expõem o conteúdo gastrointestinal para empupar, motivo pelo qual se pode não encontrar material a ser analisado. Entretanto, foi possível amplificar o material presente em pupas, o que nos leva a sugerir estudos fisiológicos de possível reabsorção de conteúdo gastrointestinal.

Todos os exemplares foram lavados com hipoclorito de sódio para garantir que o DNA obtido fosse apenas o ingerido pelas larvas. Embora lavados subsequentemente com água destilada para a retirada dos resíduos, esse produto pode também ter causado a inibição da amplificação, bem como poderia haver alguma outra substância inibidora da reação que não foi detectada.

Pode-se inferir, portanto, que o melhor estágio larval para obtenção de material genético corresponde ao 2º instar com uma quantidade de 3000 µl de sêmen. Essa quantidade não é improvável de ser encontrada em vítimas, uma vez que a quantidade média de ejaculação é de 3 ml (LIMA *et al.*, 2001). É importante ressaltar que não houve perda de nenhum *locus*, sendo possível afirmar que, apesar do aparecimento de artefatos, o perfil encontrado no trato gastrointestinal das larvas é compatível com o perfil genético do doador.

Deve-se levar em consideração que para 100 g de dieta com 3000 µl de sêmen inseridos, havia cerca de 100 larvas se alimentando, das quais apenas 15 foram utilizadas para a obtenção do perfil genético para cada instar.

Entretanto, não é certo o número de larvas encontradas em cadáveres, e talvez seja menor ainda o número das que são levadas ao laboratório para análise de taxonomia, ou até mesmo para a aproximação de tempo de exposição do cadáver. Com isso, experimentos futuros devem basear-se em menor número de exemplares, a fim de avaliar o potencial do método com um número reduzido de indivíduos, e até mesmo estimar qual o número mínimo de indivíduos necessários para a detecção de material genético humano, bem como sua possível amplificação e análise viável para comparação.

Outro fator a ser levado em consideração é a quantidade de material biológico utilizado. Uma vez que há possibilidade de homens oligospermicos, ou até mesmo azoospermicos cometerem crimes sexuais, a tentativa de detecção utilizando-se quantidades menores de sêmen também se faz necessária, assim como estimar qual a quantidade mínima necessária de sêmen. Podendo-se também ser testada qual a quantidade mínima de sêmen por larva, otimizando o método e tornando-o mais eficaz.

Há também a possibilidade de utilização de marcadores do cromossomos Y, uma vez que esses são mais específicos para indivíduos do sexo masculino. Em contra partida, o banco de dados de laboratórios criminais ainda é preferencialmente listado a partir de 13 regiões presentes em cromossomos autossômicos, o que torna mais eficiente a detecção a partir desse tipo de material genético.

É importante mencionar também que o ciclo de vida de *Sarconesia chlorogaster*, em condições laboratoriais, é de aproximadamente 19 dias

(BONATTO, 1996), sendo que a introdução de sêmen na dieta artificial não causou diferença no tempo de desenvolvimento dos indivíduos.

A coleta de insetos imaturos em locais de crime ainda não é rotina na ciência forense (THYSSEN, 2008). Neste trabalho, demonstrou-se a possibilidade de obtenção de perfil genético humano a partir de larvas alimentadas com sêmen. Dessa maneira, fica demonstrada a possibilidade de se obter perfil genético de agressores a partir de larvas que se desenvolvem em cadáveres. Nosso trabalho evidencia a necessidade de padronização e inserção desta prática na rotina forense.

Em suma, a implementação de coletas e a conscientização de peritos da importância dessa prática é muito importante, não apenas para a estimativa de tempo de morte, mas também para a possível identificação de criminosos através da análise de DNA.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Foi possível recuperar DNA humano em larvas de moscas necrófagas alimentadas com sêmen humano para fins de identificação individual;
- Larvas de 2<sup>o</sup> instar alimentadas com 3000ul de sêmen permitem a obtenção de DNA em quantidade suficiente para análise;
- A quantidade mínima de DNA para análise foi de 0,4888 ng;
- A introdução de sêmen na dieta artificial não alterou o ciclo de vida das moscas.

## **8 INSTITUIÇÕES ENVOLVIDAS**

Laboratório de Genética Molecular Humana – Universidade Federal do Paraná

- Prof. Dra. Danielle Malheiros Ferreira

Laboratório de Genética Molecular Forense – Instituto de Criminalística

- Dr. Leonardo Arduino Marano
- Dra. Marianna Maia Taulois do Rosário

Laboratório de Dinâmicas Ecológicas – Universidade Federal do Paraná

- Dra. Karine Pinto e Vairo
- Prof. Dr. Maurício Osvaldo Moura

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMABIS, J. M.; MARTHO, G. R. **Identificando pessoas pelo DNA: uma simulação**. São Paulo: Editora Moderna, 1995.
- BONATTO, S. R. **Ciclo de vida de *Sarconesia chlorogaster* (Wiedemann) (Diptera, Calliphoridae, Toxotarsinae), criada sob condições de laboratório em dieta artificial**. Revista Brasileira de Zoologia, v. 13, n. 3, p. 685-706, 1996.
- BUTLER, J. M. **Forensic DNA typing: biology, technology, and genetics of STR markers**: Academic Press. 2005. ISBN 0121479528.
- CAINÉ, L. S. R. M. **Entomologia Forense: Identificação Genética de Espécies em Portugal**. 2010. 98 f. Dissertação (Doutorado) - Curso de Ciências da Saúde, Ramo de Ciências Biomédicas, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Coimbra, 2010.
- DIZINNO, J. A.; LORD, W. D.; COLLINS-MORTON, M. B.; WILSON, Mark R. e GOFF, M. L. **Mitochondrial DNA sequencing of beetle larvae (Nitidulidae: Omosita) recovered from human bone**. J Forensic Sci. Vol. 47, No 6, Nov. 2002.
- ESTRADA, D. A. *et al.* **Taxa de Desenvolvimento de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) em Dieta Artificial Acrescida de Tecido Animal para Uso Forense**. Neotropical Entomology, v. 38, n. 2, p. 203-207, 2009
- FARIAS, R. F. **Introdução à Química Forense**. Campinas: Editora Átomo. 2007
- FACHONE, P.; VELHO, L. **Ciência forense: Interseção justiça, ciência e tecnologia**. Revista Tecnologia e Sociedade: PPGTE - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia da UTFPR, Curitiba, PR, n. 4, p.139-161, 2007.
- FBI – FEDERAL BUREAU OF INVESTIGATION, **Combined DNA Index System (CODIS)**. Disponível em: < <https://www.fbi.gov/about-us/lab/biometric-analysis/codis/>> Acesso em: 02/10/2015.
- FBI – FEDERAL BUREAU OF INVESTIGATION. **PCR-based typing protocols FBI Laboratory**. Albuquerque: FBI, 1999.
- LEITE, F. *et al.* **DNA Forense: Exames de DNA Humano**. In: **Criminalística – procedimentos e metodologias**, Tocchetto, D. – coord., Porto Alegre : Cleusa dos Santos Novak, 1.ed. Capítulo XIII, p. 242 – 243, 2005.
- LIMA, A. O. *et. al.* **Métodos de Laboratório Aplicados à Clínica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

MAIA, F. S. **Criminalística Geral**. Fortaleza. 22 p. 2012.

OLIVEIRA-COSTA, J. **Entomologia Forense - Quando os insetos são vestígios:**

**Tratado de Perícias Criminalísticas**. 3. ed. Campinas, SP: Millennium. 502p. 2011.

RAFAEL, J. A.; MELO, G. A. R.; CARVALHO, C. J. B.; CASARI, S. A. e CONSTANTINO, R. **Insetos do Brasil: Diversidade e Taxonomia**. Ribeirão Preto. Holos Editora, 810 p. 2012.

SILVA, L. A .F; PASSOS, N. S. **DNA Forense – Coleta de Amostras Biológicas em Locais de Crimes para Estudo do DNA**. Maceió: UFAL, 84p. 2006.

THYSSEN, P. J. **As aplicações do DNA na entomologia forense e no contexto legal**. In: RAIB, 21, São Paulo, SP. Reunião Anual do Instituto Biológico. São Paulo: Instituto Biológico, 2008. v. 2, p. 49 - 50. 2008

TOMBERLIN, J. K.; BENBOW, M. E.; TARONE, A. M.; MOHR, R. M. **Basic research in evolution and ecology enhances forensics**. Trends in Ecology and Evolution. Vol. 26, No. 2. Fevereiro, 2011.

VAIRO, K. P. **SARCOPHAGIDAE (DIPTERA) DE POTENCIAL INTERESSE FORENSE DE CURITIBA, PARANÁ: chave pictórica para as espécies e morfologia dos estágios imaturos de *Sarcodexia lambens* (Wiedemann)**. 58 f. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

VAIRO, K. P. *et al.* **Forensic Use of A Subtropical Blowfly: The First Case Indicating Minimum Postmortem Interval (mPMI) in Southern Brazil and First Record of *Sarconesia chlorogaster* from a Human Corpse**. Journal of forensic sciences, v. 60, n. s1, p. S257-S260, 2015.