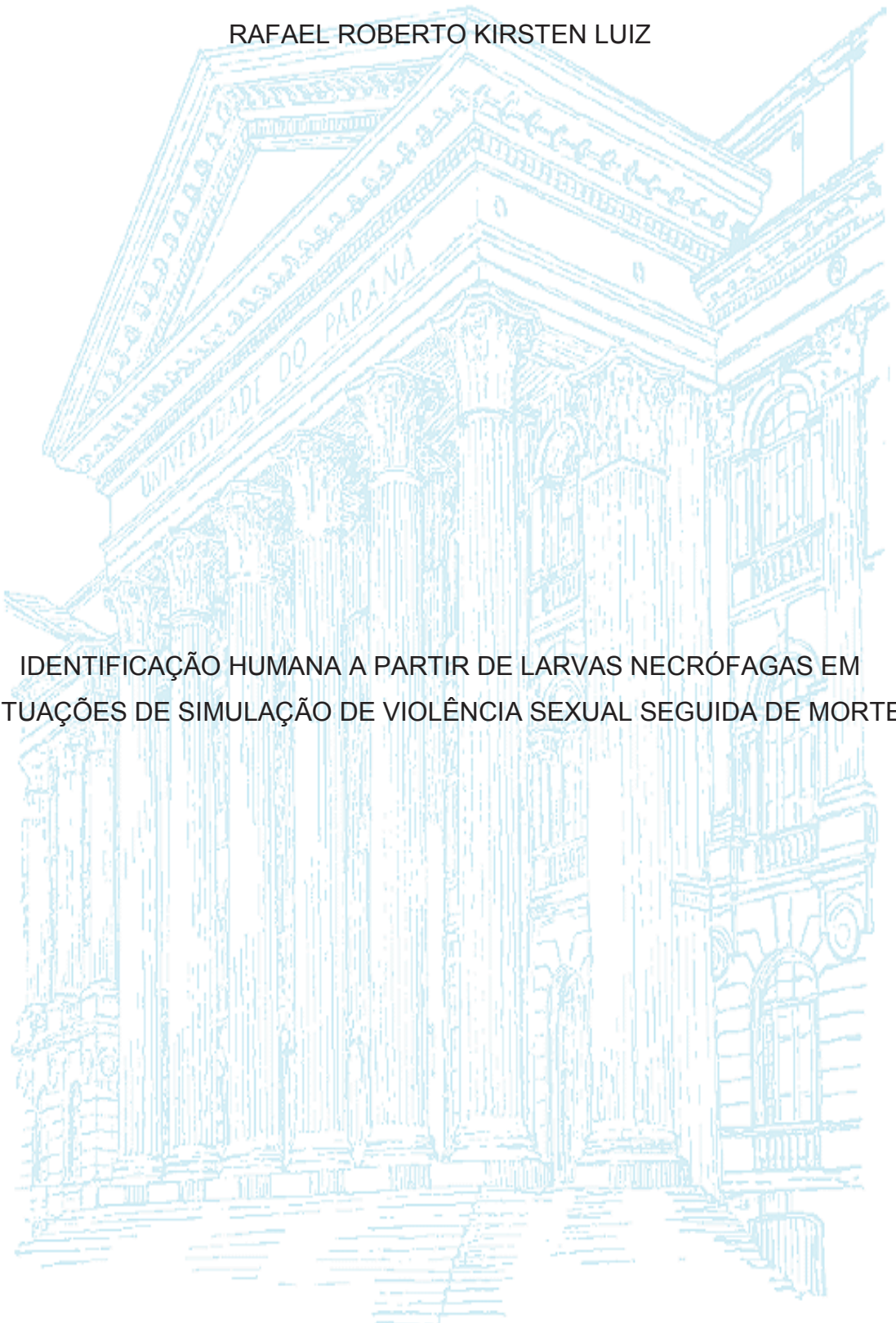


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

RAFAEL ROBERTO KIRSTEN LUIZ

IDENTIFICAÇÃO HUMANA A PARTIR DE LARVAS NECRÓFAGAS EM  
SITUAÇÕES DE SIMULAÇÃO DE VIOLÊNCIA SEXUAL SEGUIDA DE MORTE



CURITIBA

2019

RAFAEL ROBERTO KIRSTEN LUIZ

IDENTIFICAÇÃO HUMANA A PARTIR DE LARVAS NECRÓFAGAS EM  
SITUAÇÕES DE SIMULAÇÃO DE VIOLÊNCIA SEXUAL SEGUIDA DE MORTE

Dissertação apresentada como requisito parcial à  
obtenção de grau de Mestre em Genética, no Curso de  
Pós-Graduação em Genética, Setor de Ciências  
Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Danielle Malheiros Ferreira  
Coorientadora: Dra. Karine Pinto e Vairo  
Coorientador: Dr. Marcelo Malaghini

CURITIBA

2019

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.  
Biblioteca de Ciências Biológicas.  
(Rosilei Vilas Boas – CRB/9-939).

Luiz, Rafael Roberto Kirsten.

Identificação humana a partir de larvas necrófagas em situações de simulação de violência sexual seguida de morte. / Rafael Roberto Kirsten Luiz. – Curitiba, 2019.

74 f. : il.

Orientadora: Danielle Malheiros Ferreira.

Coorientadora: Karine Pinto e Vairo.

Coorientador: Marcelo Malaghini.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1. Entomologia forense. 2. Genética forense. 3. Crimes e criminosos - Identificação. 4. Crime sexual. 5. Larva. I. Título. II. Ferreira, Danielle Malheiros. III. Vairo, Karine Pinto e. IV. Malaghini, Marcelo. V. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

CDD (20. ed.) 614.1



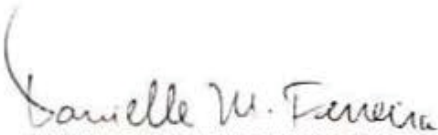
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO GENÉTICA -  
40001016006P1

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em GENÉTICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **RAFAEL ROBERTO KIRSTEN LUIZ** intitulada: **Identificação humana a partir de larvas necrófagas em situações de simulação de violência sexual seguida de morte.**, após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 29 de Março de 2019.

  
DANIELLE MALHEIROS FERREIRA

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

  
MARIANNA MATA TAULOIS DO ROSÁRIO

Avaliador Externo (IC PR)

  
ANA CLAUDIA BONATTO

Avaliador Interno (UFPR)

Às inúmeras vítimas de caso de violência sexual, especialmente as seguidas de morte, bem como suas famílias, vitimadas por descaso jurídico, escassez de provas e baixo investimento em medidas que garantam a segurança da mulher.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, e todos os Orixás e Guias, pela minha vida e pela luz que sempre iluminou meu caminhar.

Aos meus pais, Ana e Rubens, pela confiança, incentivo e amor incondicional durante todos esses anos.

Ao meu namorado, Guilherme, pelo suporte, compreensão e amor que tornou tudo mais leve.

Aos meus amigos, Mariana, Lyvia, Saritha e Bremono, pelo incondicional carinho e fortaleza.

Aos meus orientadores, Danielle, Marcelo e Karine, pelo apoio, dedicação e confiança.

À Polícia Científica do Paraná, por todos os insumos, sem os quais esse trabalho não seria possível.

Aos membros do LGMH, em especial à técnica Priscila, pela ajuda e ensinamentos.

Aos membros do LGMF, em especial à amiga Isadora, pela paciência, ajuda e dedicação.

Aos membros do Laboratório de Dinâmicas Ecológicas, principalmente à Julia e Sabrina, por toda ajuda.

A todos que de forma direta ou indireta contribuíram nessa jornada, meu eterno obrigado.

“O homem é definido como ser humano e a mulher é definida como fêmea. Quando ela comporta-se como um ser humano ela é acusada de imitar o macho.”

(BEAUVOIR, 1949)

## RESUMO

A utilização das ciências forenses oferece a possibilidade de solução de crimes que anteriormente não poderiam ser resolvidos. A entomogenética forense, que se destina a obter DNA humano a partir de insetos adultos ou imaturos com o propósito de relacionar um suspeito à cena de crime, oferece recursos de identificação humana que não estão disponíveis por outras abordagens tradicionais, como em casos de grau avançado de decomposição. Uma das aplicações da entomogenética forense se dá em casos de violência sexual seguida de morte. Nesses casos, a colonização de cadáveres por insetos pode se dar de maneira muito rápida e a perícia convencional que visa a coleta de material genético do agressor com *swabs* pode ser ineficaz, uma vez que o material genético do agressor pode estar degradado pelas condições de decomposição ou ter sido ingerido por larvas necrófagas que colonizam o corpo da vítima. Apesar de já se saber que é possível recuperar e analisar DNA humano a partir de larvas, ainda é preciso otimização e padronização dos procedimentos técnicos. Portanto, este trabalho destinou-se a simular a principal dificuldade técnica ocorrente nestes casos, que é a mistura de material genético feminino (vítima) em quantidades muito maiores do que de material genético masculino (agressor) e verificar qual o melhor método de extração de DNA para esta situação. Para tanto, larvas necrófagas (*Sarconesia chlorogaster*) foram alimentadas com materiais biológicos de origem humana (sangue de origem feminina e sêmen), em diferentes proporções, visando simulação de situações próximas às encontradas em casos reais. Para isso, larvas foram alimentadas com dieta artificial acrescida de mistura de material genético masculino e feminino em 3 diferentes proporções: 1:100, 1:200 e 1:400, respectivamente. Cada tratamento foi submetido a três métodos de extração de DNA diferentes: extração direta e extração diferencial, ambas utilizando fenol-clorofórmio para a purificação, e extração automatizada. Todas as amostras foram submetidas à análise de STRs autossômicos e à análise de STRs sexual-específico provenientes do cromossomo Y. Foram utilizados 15 exemplares de larvas por tratamento para extração de DNA e obtenção de perfis genéticos, e estes foram comparados ao perfil genético do doador de sêmen. Os estágios larvais utilizados para as análises foram 2º e 3º instares. Em amostras de larvas de 2º instar tratados com proporção de 1:100 e submetidos a extração automatizada foram recuperados 13 de 27 locos STR autossômicos, do qual foi calculada uma probabilidade de 1 em 2.425.148.933.279.370 perfis na população. Em amostras de larvas de 2º instar tratados com proporção de 1:200 e submetidos a extração diferencial foram recuperados 10 de 27 locos STR autossômicos na fração espermática, do qual estimou-se a razão de 1 em 4.997.317.973 perfis. Em amostras de larvas de 3º instar tratados com proporção de 1:100 e submetidos a extração diferencial foram recuperados todos os 27 locos STR autossômicos na fração espermática calculada a probabilidade de 1 em 2.741.599.494.726.060.000.000.000 perfis. Este tratamento também possibilitou a recuperação de 18 de 22 locos Y-STR, mostrando uma probabilidade de 1 em 52.313 haplótipos cadastrados em seu banco de dados utilizado. Não foram obtidos perfis viáveis para o tratamento de 1:400, assim como em metodologia de extração direta. Estes resultados demonstram que larvas de *Sarconesia chlorogaster*, especialmente aquelas submetidas a extração diferencial, podem conter DNA humano masculino passível de análise se estas tiverem ingerido sêmen do agressor, mesmo tendo ingerido também material biológico proveniente da vítima em quantidades muito superiores, como se verifica em casos reais. Sendo

assim, fica demonstrado que a análise do conteúdo de larvas necrófagas pode ser incorporada aos procedimentos periciais e fornecer, desta maneira, uma última possibilidade de identificação de agressores sexuais, quando os procedimentos padrão não são satisfatórios.

**Palavras-chave:** Entomogenética forense. Identificação humana. Genética forense. Violência sexual.

## ABSTRACT

Forensic sciences offers the possibility of solving crimes that previously could not be resolved. Entomogenetic forensic investigation, which determines how to obtain human DNA from adult or immature insects for the purpose of relating a suspect to the crime scene, offers human identification features that are not available by other traditional approaches, like in advanced cases decomposition. One of the applications of forensic entomogenetics is in cases of sexual violence followed by death. In these cases, colonization of bodies by insects can be very quick and fast, as conventional view, the collection of genetic material from the aggressor with swabs can be ineffective, since the genetic material of the aggressor may be degraded by the decomposition conditions or have been ingested by necrophagous larvae that colonize or the victim's body. Although we already know that it is possible to recover and analyze human DNA from larvae, it is still necessary to optimize and standardize technical procedures. Therefore, this work aims to simulate the main technical problem that occurred in these cases, which is the mixture of female genetic material (victim) in much larger victims of male genetic material (aggressor) and to verify which is the best method of DNA extraction for this situation. For that, the necrophagous larvae (*Sarconesia chlorogaster*) were fed with biological materials of human origin (blood of female origin and semen), in different proportions, using the variables of occurrence close to the samples in real cases. For this, the larvae were fed an artificial diet plus a mixture of male and female genetic material in 3 different proportions: 1:100, 1:200 and 1:400, respectively. Each treatment was submitted to three different DNA extraction methods: direct extraction and differential extraction, both using phenol-chloroform for purification, and automated extraction. All samples were submitted to the analysis of autosomal STRs and the analysis of sexual-specific STRs from the Y chromosome. 15 specimens of larvae were used per treatment for DNA extraction and obtaining genetic profiles, and these were compared to the donor's genetic profile of semen. The larval stages used for analyzes were 2nd and 3rd instars. In samples of 2nd instar larvae treated with a 1:100 ratio and submitted to automated extraction, 13 of 27 autosomal STR loci were recovered, of which a probability of 1 in 2,425,148,933,279,370 profiles in the population was calculated. In samples of 2nd instar larvae treated with a ratio of 1:200 and submitted to differential extraction, 10 of 27 autosomal STR loci were recovered in the sperm fraction, from which the ratio of 1 in 4,997,317,973 profiles was estimated. In samples of 3rd instar larvae treated with a ratio of 1:100 and subjected to differential extraction, all 27 autosomal STR loci were recovered in the sperm fraction, calculating the probability of 1 in 2,741,599,494,726,060,000,000,000 profiles. This treatment also made it possible to recover 18 out of 22 Y-STR loci, showing a probability of 1 in 52,313 haplotypes registered in their used database. No viable profiles were obtained for the treatment of 1:400, as well as in direct extraction methodology. These results demonstrate that *Sarconesia chlorogaster* larvae, especially those subjected to differential extraction, may contain male human DNA that can be analyzed if they have ingested the aggressor's semen, even though they have also ingested

biological material from the victim in much higher quantities, as seen in real cases. Thus, it is demonstrated that the analysis of the content of necrophagous larvae can be incorporated into the expert procedures and, in this way, provide a last possibility of identifying sexual aggressors, when the standard procedures are not satisfactory.

**Key-words:** Forensic Entomogenetics. Human identification. Forensic genetics. Sexual violence.

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b> – LOCALIZAÇÃO CROMOSSÔMICA DOS 20 LOCOS STR UTILIZADOS NO CODIS.....	<b>23</b>
<b>FIGURA 2</b> – EXEMPLAR ADULTO DE <i>Sarconesia chlorogaster</i> .....	<b>30</b>
<b>FIGURA 3</b> – OVOS DE <i>Sarconesia chlorogaster</i> EM SUBSTRATO DE POSTURA	<b>32</b>
<b>FIGURA 4</b> – MEIOS DE CULTIVO E SEUS RESPECTIVOS TRATAMENTOS .....	<b>33</b>
<b>FIGURA 5</b> – LARVAS DE 3º INSTAR DE <i>Sarconesia chlorogaster</i> .....	<b>34</b>
<b>FIGURA 6</b> – EXTRAÇÃO DIFERENCIAL PARA OBTENÇÃO DE DNA DA FRAÇÃO MASCULINA E FEMININA.....	<b>38</b>
<b>FIGURA 7</b> – EQUIPAMENTO AUTOMATE EXPRESS™ E EXEMPLO DE SEU FUNCIONAMENTO.....	<b>40</b>
<b>FIGURA 8</b> – ANÁLISE ESTATÍSTICA REALIZADA PELO SOFTWARE PATCAN REFERENTE A EXTRAÇÃO AUTOMATIZADA DE TRATAMENTO DE 1:100 DE LARVAS DE 2º INSTAR .....	<b>63</b>
<b>FIGURA 9</b> – ANÁLISE ESTATÍSTICA REALIZADA PELO SOFTWARE PATCAN REFERENTE A EXTRAÇÃO DIFERENCIAL DE TRATAMENTO DE 1:200 DE LARVAS DE 2º INSTAR.....	<b>64</b>
<b>FIGURA 10</b> – ANÁLISE ESTATÍSTICA REALIZADA PELO SOFTWARE PATCAN REFERENTE A EXTRAÇÃO DIFERENCIAL DE TRATAMENTO DE 1:100 DE LARVAS DE 3º INSTAR.....	<b>65</b>
<b>FIGURA 11</b> – ELETROFEROGRAMA DE STRS AUTOSSÔMICOS DO INDIVÍDUO DOADOR DE SANGUE DO SEXO FEMININO.....	<b>66</b>
<b>FIGURA 12</b> – ELETROFEROGRAMA DE STRS AUTOSSÔMICOS DO INDIVÍDUO DOADOR DE SANGUE DO SEXO FEMININO.....	<b>67</b>
<b>FIGURA 13</b> – ELETROFEROGRAMA DE MISTURA DE STR AUTOSSÔMICOS MASCULINO E FEMININO OBTIDOS POR EXTRAÇÃO AUTOMATIZADA SOB TRATAMENTO DE 1:100 DE LARVAS DE 2º INSTAR .....	<b>68</b>
<b>FIGURA 14</b> – ELETROFEROGRAMA DE MISTURA DE STR AUTOSSÔMICOS MASCULINO E FEMININO OBTIDOS POR EXTRAÇÃO DIFERENCIAL, FRAÇÃO MASCULINA, SOB TRATAMENTO DE 1:200 DE LARVAS DE 2º INSTAR .....	<b>69</b>
<b>FIGURA 15</b> – ELETROFEROGRAMA DE MISTURA DE STR AUTOSSÔMICOS MASCULINO E FEMININO OBTIDO POR EXTRAÇÃO DIFERENCIAL, FRAÇÃO MASCULINA, SOB TRATAMENTO DE 1:100 DE LARVAS DE 3º INSTAR .....	<b>70</b>

<b>FIGURA 16</b> – ELETROFEROGRAMA ILUSTRANDO PERFIL DE Y-STR DO INDIVÍDUO DOADOR DE SANGUE DO SEXO MASCULINO.....	<b>71</b>
<b>FIGURA 17</b> – ELETROFEROGRAMA DE PERFIL DE Y-STR DO INDIVÍDUO DOADOR DE SÊMEN OBTIDOS POR EXTRAÇÃO DIFERENCIAL, FRAÇÃO MASCULINA, SOB TRATAMENTO DE 1:100 DE LARVAS DE 3º INSTAR. ....	<b>72</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1</b> – NÚMERO DE PERFIS GENÉTICOS PROVENIENTES DE AMOSTRAS RELACIONADAS A CASOS CRIMINAIS. ....	<b>22</b>
<b>TABELA 2</b> – NÚMERO DE PERFIS GENÉTICOS PROVENIENTES DE AMOSTRAS RELACIONADAS A PESSOAS DESAPARECIDAS. ....	<b>22</b>
<b>TABELA 3</b> – COMPOSIÇÃO PARA PREPARO DE DIETA ARTIFICIAL USADA O PARA DESENVOLVIMENTO DE IMATUROS DE <i>Sarconesia chlorogaster</i> . ....	<b>33</b>
<b>TABELA 4</b> – COMPONENTES UTILIZADOS PARA QUANTIFICAÇÃO DE DNA EM QPCR. ....	<b>40</b>
<b>TABELA 5</b> – MISTURA DE REAÇÃO PARA AMPLIFICAÇÃO DE DNA AUTOSSÔMICO EM TERMOCICLADOR. ....	<b>41</b>
<b>TABELA 6</b> – CONDIÇÕES DE CICLAGEM UTILIZADAS NA PCR PARA SISTEMA POWERPLEX® FUSION 6C SYSTEM. ....	<b>41</b>
<b>TABELA 7</b> – COMPONENTES UTILIZADOS PARA AMPLIFICAÇÃO DE DNA DO CROMOSSOMO Y EM TERMOCICLADOR. ....	<b>42</b>
<b>TABELA 8</b> – CONDIÇÕES DE CICLAGEM UTILIZADAS NA PCR PARA SISTEMA POWERPLEX® Y23. ....	<b>42</b>
<b>TABELA 9</b> – COMPONENTES UTILIZADOS PARA ANÁLISE DE FRAGMENTOS EM ANALISADOR GENÉTICO PARA SISTEMA POWERPLEX® FUSION 6C. ....	<b>43</b>
<b>TABELA 10</b> – COMPONENTES UTILIZADOS PARA ANÁLISE DE FRAGMENTOS EM ANALISADOR GENÉTICO PARA SISTEMA POWERPLEX® Y23. ....	<b>43</b>
<b>TABELA 11</b> – QUANTIDADE DE DNA OBTIDO PARA OS DIFERENTES INSTARES LARVAIS E TRATAMENTOS PARA OS MARCADORES AUTOSSÔMICOS E DE CROMOSSOMO Y. ....	<b>45</b>
<b>TABELA 12</b> – MARCADORES ANALISADOS E ALELOS OBTIDOS EM PERFIL DE REFERÊNCIA MASCULINO, FEMININO E ALELOS OBTIDOS EM TRATAMENTO COM MISTURA DE CÉLULAS SANGUÍNEAS FEMININAS E SÊMEN. ....	<b>46</b>
<b>TABELA 13</b> – TRATAMENTOS E SUAS RESPECTIVAS RAZÕES DE VEROSSIMILHANÇA RELATIVAS À QUANTIDADE DE LOCOS AUTOSSÔMICOS RECUPERADOS. ....	<b>47</b>
<b>TABELA 14</b> – MARCADORES DO CROMOSSOMO Y ANALISADOS, ALELOS OBTIDOS EM PERFIL DE REFERÊNCIA MASCULINO E ALELOS OBTIDOS EM	

TRATAMENTO COM MISTURA DE CÉLULAS SANGUÍNEAS FEMININAS E SÊMEN.....	48
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- BNPG - Banco Nacional de Perfis Genéticos
- CODIS - *Combined DNA Index System*
- DNA - Deoxyribonucleic Acid
- DTT - Ditioneitol
- FBI - *Federal Bureau of Investigation*
- FF - Fração Feminina
- FM - Fração Masculina
- LGMF - Laboratório de Genética Molecular Forense
- LGMH - Laboratório de Genética Molecular Humana
- LR - *Likelihood Ratio*
- NDIS - *National DNA Index System*
- PCR - *Polymerase Chain Reaction*
- PSA - *Prostatic Specific Antigen*
- P30 - ver PSA
- RCLB - *Red Cells Lysis Buffer*
- RIBPG - Rede Integrada de Bancos de Perfis Genéticos
- SC - Santa Catarina
- SDS - *Sodium Dodecyl Sulfate*
- SESP - Secretaria Estadual de Segurança Pública
- SLP - *Single Locus Probes*
- SNP - *Single Nucleotide Polymorphism*
- STR - *Short Tandem Repeats*
- Tris - Hidroximetil
- Y-STR - *Y-Short Tandem Repeats*

## LISTA DE SÍMBOLOS

% - porcentagem

® - marca registrada

× - multiplicação

μl - microlitro

∞ - infinito

g – força gravitacional

HCl – ácido clorídrico

K – potássio

Kg – quilograma

M - molar

mg- miligrama

ml - mililitro

mM – milimolar

NaCl - cloreto de sódio

™ - trade mark

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>20</b>
2.1	HISTÓRICO DAS CIÊNCIAS FORENSES .....	20
2.1.1	Identificação humana na rotina pericial .....	24
2.1.2	A entomogenética forense como ciência .....	25
2.1.3	<i>Sarconesia chlorogaster</i> (Wiedemann) .....	28
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>31</b>
3.1	GERAL.....	31
3.2	ESPECÍFICOS.....	31
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>32</b>
4.1	OBTENÇÃO E CULTIVO DAS LARVAS .....	32
4.2	AMOSTRAS BIOLÓGICAS.....	34
4.2.1	Coleta de de amostras de referência sêmen e sangue periférico .....	35
4.3	PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS.....	36
4.4	EXTRAÇÃO DE DNA .....	36
4.4.1	Amostras de referência .....	36
4.4.2	Larvas .....	36
4.4.2.1	Extração direta por fenol-clorofórmio-alcool isoamílico .....	37
4.4.2.2	Extração diferencial por fenol-clorofórmio-alcool isoamílico .....	37
4.4.2.3	Extração automatizada .....	39
4.5	QUANTIFICAÇÃO DO DNA .....	40
4.6	PCR E ANÁLISE DE STR.....	41
4.6.1	Autossômicos.....	41
4.6.2	Linhagem paterna (Y-STR).....	42
4.7	ANÁLISE DE RAZÃO DE VEROSSIMILHANÇA .....	43
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>45</b>
5.1	AVALIAÇÃO DA QUANTIFICAÇÃO .....	45
5.2	ANÁLISE DE MARCADORES STR AUTOSSÔMICOS.....	46
5.3	ANÁLISE DE MARCADORES STR DO CROMOSSOMO Y .....	47
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>49</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>56</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>57</b>

<b>APÊNDICE A.....</b>	<b>63</b>
<b>APÊNDICE B.....</b>	<b>66</b>
<b>APÊNDICE C.....</b>	<b>73</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Conforme divulgado pelo Fórum Brasileiro de Segurança Pública, todos os anos são cometidos milhares de crimes de estupro, sendo as vítimas principalmente do sexo feminino. De 2009 até o ano de 2017, os crimes dessa natureza aumentaram, passando de 33.912 para 61.032 casos por ano no Brasil. Porém esse número pode ser ainda maior, uma vez que, conforme consta no documento divulgado, apenas 35% das vítimas relatam os abusos.

O estado do Paraná está em terceiro lugar em números de estupros no país, apresentando aumento de casos de delitos contra a dignidade sexual (assédio, estupro e estupro de vulnerável) entre os anos de 2011 e 2017, passando de 4.647 para 5.966 (SESP/PR). Em levantamento feito pela Secretaria de Segurança Pública do Estado de São Paulo, estimou-se que entre janeiro e julho de 2017 foram cometidos 6.164 estupros no estado, dos quais apenas 966 prisões foram realizadas. Segundo o 12º Anuário Brasileiro de Segurança Pública, houve, em 2017, 4.539 homicídios contra mulheres, o que representa um aumento de 6,1% quando comparado a 2016, dos quais 1.133 foram contabilizados como feminicídio.

Feminicídio, segundo Lagarde (2006) – diferentemente do femicídio que segundo a autora seria o homicídio feminino –, é o conjunto de fatores misóginos, de exploração e violência que levam a morte de mulheres pela questão do sexo feminino. Dentro desta classificação, pode-se ainda incluir o feminicídio sexual, o qual consiste na violação sexual do corpo feminino, geralmente abandonado em local pouco habitado e nu, além de sinais de violência, como mutilações e torturas (FRAGOSO, 2002). Levando em consideração esse contexto, Segato (2011) afirma que a violência sexual está intimamente relacionada com o menosprezo ao corpo da mulher e a figura feminina em si, passando a ser de dominação masculina. Uma vez que os casos de feminicídio sexual, ou seja, estupro seguido de morte, são ainda tratados juntamente com casos de homicídios causados por lesão corporal, não há com distingui-los estatisticamente.

Tendo em vista tais estatísticas, não apenas políticas de prevenção e conscientização são necessárias, mas também desenvolvimento de técnicas que auxiliem a identificação de agressores, principalmente em casos em que a vítima é também assassinada. Tais casos são especialmente difíceis de serem solucionados.

A elucidação de crimes a partir da utilização de técnicas moleculares de extração de DNA humano a partir de insetos, normalmente imaturos, é denominada entomogenética forense. A utilização de insetos como ferramentas nas ciências forenses dá-se a partir do conhecimento de que tais organismos são, geralmente, os primeiros a colonizar cadáveres (ANDERSON, 2001), de modo que sua utilização varia desde a determinação da causa da morte (SMITH, 1986) à identificação de vítima e muitas vezes do agressor, principalmente em casos de violência sexual. A identificação do material genético humano é possível através da extração do conteúdo intestinal de insetos que eventualmente possam ter se alimentados do cadáver (CAMPOBASSO *et al.*, 2001), e se torna evidência importante na identificação de vítima e agressor, bem como auxilia na reconstrução da cena de um crime (CAMPOBASSO *et al.*, 2005; WELLS & STEVENS, 2008). Tais abordagens já são reconhecidas na elucidação de sequestros e crimes sexuais (FREITAS *et al.*, 2013).

Além das poucas evidências coletadas em locais de crime, o tempo atua como um fator importante para a determinação de suspeitos e a identificação do criminoso. Em casos de estupro seguido de morte, que geralmente são acometidos contra mulheres, porém com grande aumento no número contra homossexuais do sexo masculino, o local de abandono do cadáver, ou até de sua ocultação, atua como um agravante na recuperação de evidências, pois fatores ambientais, bem como secreções produzidas pelo próprio corpo em decomposição, atuam como inibidores de diversos procedimentos utilizados na coleta e identificação de agressores. Um dos fatores ambientais que se deve levar em consideração é a colonização do cadáver por larvas e diversos organismos que se alimentam tanto do corpo em decomposição quanto do material genético que fora depositado, reduzindo, portanto, com o tempo, a chance de coleta de material viável para análise.

Em cenários que simulam crimes sexuais seguidos de morte, foi demonstrada a possibilidade de obtenção e análise de marcadores moleculares do cromossomo Y (Y-STR) obtidos do conteúdo gastrointestinal de larvas que se alimentaram de sêmen, o que abre a possibilidade de identificação do agressor (CHAMOUN, 2014). Também utilizando simulações laboratoriais para análise de DNA humano a partir de larvas necrófagas, Kirsten (2015) analisou marcadores moleculares de cromossomos autossômicos e evidenciou a possibilidade de identificação precisa do

agressor, o que difere da informação fornecida por STRs do cromossomo Y, os quais permitem a identificação de linhagem. Entretanto, o desenho experimental destes estudos não incluiu a testagem da mistura de perfis genéticos (vítima e agressor) encontrados em corpos que sofreram, previamente, violência sexual. Uma das grandes dificuldades em análises de identificação de agressores sexuais é a desproporção na mistura entre material genético obtido da vítima e do agressor, na qual o material da vítima na maioria das vezes será o componente majoritário. Tal situação leva à amplificação preferencial de DNA da vítima em detrimento do DNA do agressor e, conseqüentemente, à ausência de perfil genético do autor do delito.

Embora já reconhecida e utilizada, a entomogenética forense ainda necessita de estudos que investiguem a acurácia da utilização de insetos para auxiliar a resolução de tais crimes. Sendo assim, a coleta de larvas em locais de crimes desta natureza, bem como o estudo da possibilidade de utilização de tais organismos para a identificação de criminosos e/ou vítimas é de extrema importância. Dentro deste contexto, este trabalho tem por objetivo contribuir com mais uma possibilidade de identificação de agressores sexuais em casos de vítimas violentadas e mortas, cujos corpos tenham sido colonizados por larvas de dípteros necrófagos.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 HISTÓRICO DAS CIÊNCIAS FORENSES

O uso de ciência para a investigação de crimes surgiu de maneira paralela à civilização, porém a utilização de conhecimentos químicos para esse fim remete ao final do século XVII (FARIAS, 2007). Originada a partir da Medicina Legal, as ciências forenses abrangem de maneira interdisciplinar conhecimentos da Química, Biologia, Física, Matemática, e outras ciências (MAIA, 2012). Pode-se dizer que a criminalística foi fundada por Hans Gross, ao escrever “System Der Kriminalistik” (do alemão, Sistemas de Criminalística), 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: Sung Tz’u (1186-1249) teria sido um médico legista chinês do século XIII e também autor de “Xi Yuan Ji Lu” (Coletânea de Casos de Injustiças Corrigidas), manual que constaria regras para que os médicos legistas não cometessem erros durante uma necropsia, e também o primeiro a reunir informações sobre a utilização de insetos na elucidação de um crime, dando origem à entomologia forense (BENECKE, 2001).

A genética forense, entretanto, é uma ciência mais recente. Pode-se dizer que seus primeiros passos foram com a descoberta do primeiro polimorfismo genético humano, no sistema sanguíneo ABO em 1900 por Karl Landsteiner, que prontamente percebeu sua possível aplicabilidade em questões criminais. Metodologias utilizando os sistemas sanguíneos e bem como proteínas polimórficas foram utilizadas até meados de 1980 e mostravam baixa informatividade devido à baixa variabilidade (JOBBLING E GILL, 2004).

Os primeiros trabalhos utilizando o DNA como método de identificação pessoal datam de 1985, a partir de duas publicações de Jeffreys e colaboradores. Em sua primeira publicação – *Hypervariable ‘minisatellite’ regions in human DNA* – os autores apontam a presença de regiões altamente polimórficas capazes de servir ao que chamaram de DNA *fingerprint*, ou seja, um padrão individual e específico a cada ser humano, literalmente como impressões digitais (JEFFREYS *et al.*, 1985a). Pouco tempo depois, ainda no mesmo ano, a publicação do segundo artigo – *Individual-specific “fingerprints” of human DNA* – demonstrou que a utilização da análise dos pequenos fragmentos repetidos em sequência, denominados

minissatélites, poderia ser utilizada para a identificação humana e também em testes de paternidade (JEFFREYS *et al.*, 1985b). A técnica foi aplicada em um caso de estupro na Inglaterra com uma metodologia diferenciada que isolava as regiões minissatélites de agressor e de vítima através de lise diferencial de espermatozoides e células de origem vaginal, permitindo a identificação do suspeito (GILL *et al.*, 1985). A lise diferencial foi outro grande marco na genética forense, pois evita os problemas técnicos resultantes do excesso de material da vítima, é amplamente utilizada nos casos de estupro e permanece inalterada até os dias de hoje (JOBILING E GILL, 2004). O método de identificação utilizando-se de minissatélites ajudou na identificação de uma ossada exumada em 1985 que após comparação com familiares mostrou-se ser do médico austríaco Josef Mengele (JEFFREYS *et al.* 1992)

A genética tornou-se ferramenta importante para as ciências forenses, não só para identificação de agressores, mas também de vítimas de diversos crimes e de cadáveres em casos de desastres em massa em que métodos tradicionais baseados em reconhecimento não são possíveis (CLAYTON *et al.*, 1995). A partir da técnica de *fingerprint* do DNA, baseada em padrões multibandas hipervariáveis, outras técnicas foram testadas e utilizadas em casos criminais. Os SLPs – *Single Locus Probes* – tidos como simplificadores do método de Jeffreys (JOBILING E GILL, 2004) foram utilizados até a implementação do uso de repetições curtas em série (STR do inglês, *Short Tandem Repeats*), referindo-se a regiões polimórficas curtas (2-6 pares de base) e repetitivas do DNA (BUTLER, 2005). A utilização de marcadores moleculares do tipo STR foi possível após o desenvolvimento da técnica de reação em cadeia da DNA polimerase (PCR do inglês, *Polymerase Chain Reaction*), em 1988, e tem como objetivo a detecção de perfis genéticos e a ligação de vítimas ao suspeito ou até mesmo a identificação de corpos através da comparação com DNA de vítima e familiar, preferencialmente parental.

Sendo assim, o Departamento Federal de Investigação (FBI do inglês, *Federal Bureau of Investigation*) instituiu a utilização de 13 regiões altamente polimórficas distribuídas ao longo de 12 cromossomos que constituem o Sistema Combinado de Índices de DNA (CODIS do inglês, *Combined DNA Index System*), programa que armazena perfis de DNA e que permite buscas com o objetivo de identificar suspeitos de crimes. A partir de 2017, foram adicionados sete novos marcadores, totalizando 20 locos analisados a fim de ampliar o poder de

discriminação (Figura 1). No Brasil, o CODIS começou a ser usado no ano de 2010, a partir de uma parceria entre a Polícia Federal e o FBI, iniciada em 2008, regulamentado pela Lei nº 12.654 (BRASIL, 2012). Tal iniciativa surgiu entre o Ministério da Justiça e as Secretarias de Segurança Pública dos estados envolvidos, formando a Rede Integrada de Bancos de Perfis Genéticos (RIBPG) (BRASIL, 2009). Assim como o NDIS (*National DNA Index System*), a RIBPG tem como objetivo o intercâmbio de perfis genéticos de interesse da Justiça, os quais são obtidos em laboratórios de perícia oficial, sendo tais perfis genéticos coletados em locais de crime, sob a forma de vestígio, ou diretamente de condenados e identificados criminalmente a fim de auxiliar em processos criminais e identificação de pessoas desaparecidas. A legislação vigente permite a coleta de material biológico para obtenção de perfil genético de criminosos condenados por crimes contra a pessoa, praticado de maneira dolosa e de natureza grave, conforme Lei nº. 12.654 (BRASIL, 2012), ou ainda crimes previstos no artigo 1º da Lei nº. 8.072, de 25 de julho de 1990, que trata de crimes hediondos. Segundo o IX Relatório da Rede Integrada de Bancos de Perfis Genéticos (RIBPG), atualmente a rede conta com 19 laboratórios estaduais e 1 laboratório da Polícia Federal. O Banco Nacional de Perfis Genéticos (BNPG) conta atualmente com 18.080 perfis genéticos cadastrados, divididos em duas categorias principais: vestígios e indivíduos cadastrados criminalmente (Tabela 1) e dados relacionados a pessoas desaparecidas (Tabela 2).

**Tabela 1.** Número de perfis genéticos provenientes de amostras relacionadas a casos criminais.

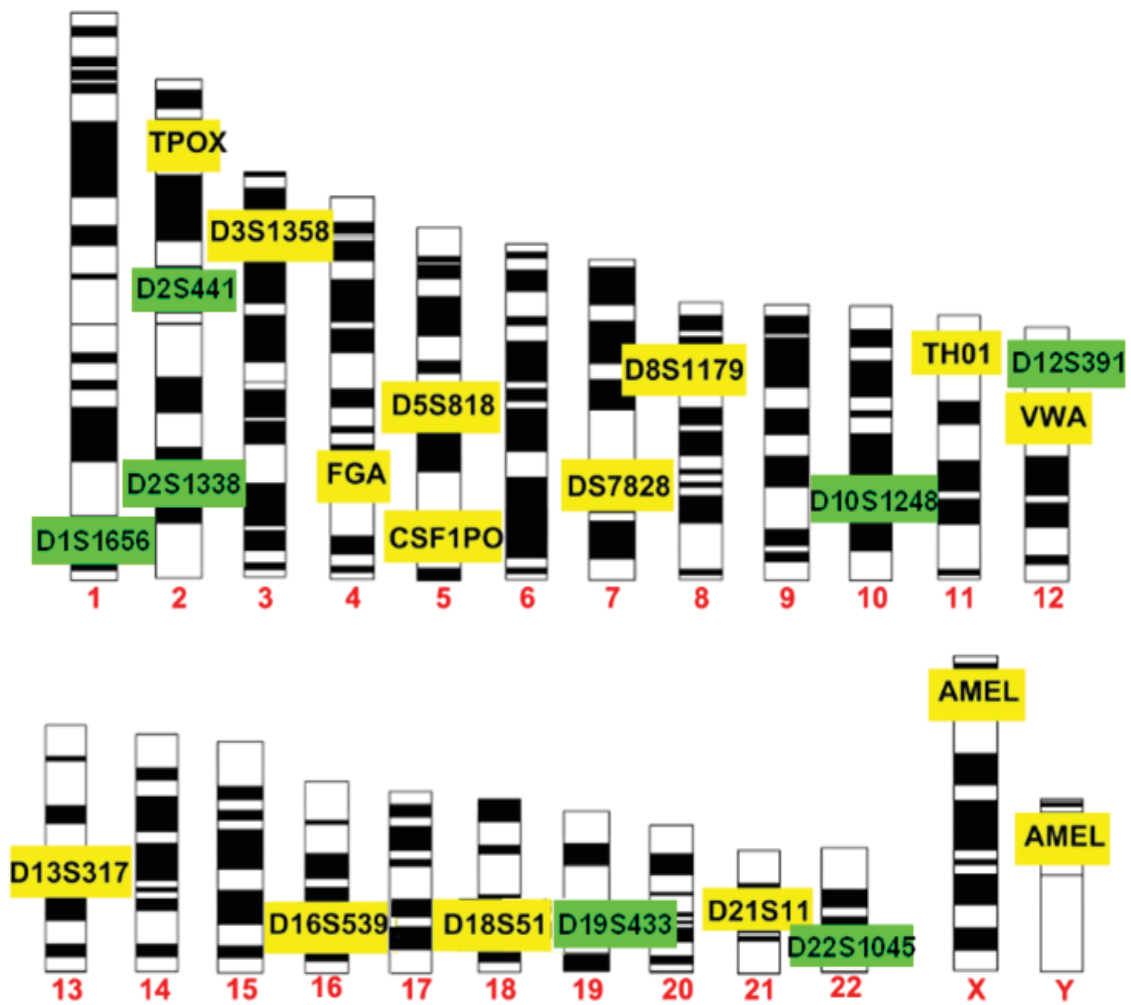
<b>Categoria de amostra</b>	<b>Nº de perfis genéticos</b>
Vestígio	7.972
Condenados (Lei 12.654/12)	6.536
Identificados criminalmente (Lei 12.654/12)	441
Decisão judicial	73
<b>Total</b>	<b>14.992</b>

Fonte: IX Relatório da RIBPG (acesso em <http://www.seguranca.gov.br/sua-seguranca/ribpg>).

**Tabela 2.** Número de perfis genéticos provenientes de amostras relacionadas a pessoas desaparecidas.

<b>Categoria de amostra</b>	<b>Nº de perfis genéticos</b>
Familiares de pessoas desaparecidas	1.500
Restos mortais não identificados	1.628
Referência direta de pessoas desaparecidas	14
Pessoas vivas de identidade desconhecida	21
<b>Total</b>	<b>3.163</b>

Fonte: IX Relatório da RIBPG (acesso em <http://www.seguranca.gov.br/sua-seguranca/ribpg>).



**Figura 1:** Localização cromossômica dos 20 locos utilizados no CODIS. Em verde os 7 locos adicionados em 2017.

Fonte: modificado de <http://strbase.nist.gov/fbicore.htm>

Segundo os dados apresentados no referido relatório, até o dia de sua publicação a RIBPG apresentava 545 coincidências confirmadas que auxiliaram 559 investigações. Destas, 90 coincidências deram-se entre vestígio encontrado em local de crime e um identificado criminalmente, das quais 2 no Paraná. A utilização do bando de dados auxiliou também a Polícia Federal em 139 investigações, relacionando 23 vestígios de cenas de crimes a condenados criminalmente. Esses dados são importantes para demonstrar a importância da utilização de bancos de dados de perfis genéticos para a resolução de crimes e identificação de pessoas desaparecidas. Atualmente o Paraná contribui com aproximadamente 6% dos perfis incluídos no BNPG.

### 2.1.1 Identificação humana na rotina pericial

Identificação humana é o processo que leva à determinação da identidade de uma pessoa, fazendo-a diferente de todas as outras. A utilização do DNA tornou-se uma ferramenta importante desde sua descoberta, auxiliando em casos em que metodologias clássicas não alcançam o resultado esperado. De acordo com a situação do corpo ao ser encontrado, são feitas, primeiramente, identificação visual (antropológica), exames de arcada dentária (odontologia legal) e identificação papiloscópica (PINHEIRO, 2004). Quando, por diferentes motivos, estas metodologias não são podem ser aplicadas, a análise de DNA passa a ser o método de escolha.

A antropologia forense utiliza características físicas de cada indivíduo a fim de auxiliar na identificação pessoal, usando traços fenotípicos, tais como formato de rosto, cor de pele, olhos e cabelos para a identificação. A metodologia antropológica é capaz, ainda de determinar sexo, através de análises de crânio, e idade por características ósseas. (GARRIDO, 2009). Entretanto, em casos de determinados estágios de decomposição, carbonização, afogamento, entre outros, o reconhecimento antropológico pode não ser possível.

Outra metodologia utilizada é a odontologia legal, aplicada principalmente em casos de corpos vítimas de carbonização, que utiliza de prontuário odontológico para a comparação entre o cadáver e a suposta vítima. Além de fornecer informações para identificação por esse método, a arcada dentária também pode fornecer material para análises moleculares (ARAUJO E PASQUALI, 2009). Entretanto, se torna inviável se a pessoa a ser identificada não apresenta arquivos prévios para comparação.

A papiloscopia é a técnica de identificação humana através de impressões digitais (datiloscopia), palmares (quiroscopia) e plantares (podoscopia), baseando-se na individualidade destas (GARRIDO, 2009). Aqui, dependendo também do estágio de decomposição, mutilação ou amputação de membros, a papiloscopia pode ser inviável para a identificação.

Para vítimas com indícios de violência sexual, a identificação individual se faz através das técnicas citadas, e apenas quando nenhuma delas mostra-se eficaz utilizam-se técnicas de DNA. Porém, para a constatação de violência sexual é realizada a coleta de material intra-vaginal, intra-anal e algumas vezes, intra-oral.

Esse procedimento consiste na raspagem do local com uma *swab* de algodão posteriormente encaminhada para análises a fim de verificar a presença de espermatozoides, ou indícios destes como o PSA (antígeno prostático específico, sigla em inglês). Em caso de constatação de violência sexual, o material coletado na vítima é encaminhado para análises de DNA, e será confrontado com suspeitos e inserido em banco de dados de perfis genéticos.

### 2.1.2 A entomogenética forense como ciência

A entomogenética forense pode ser considerada um dos ramos da entomologia forense. Embora primordialmente aplicada para a determinação de estimativa de intervalo de morte (SMITH, 1986), a entomologia forense possui diversas finalidades em muitos ramos das ciências forenses, como por exemplo, na toxicologia, verificando a presença de drogas no corpo através de larvas necrófagas, ou outras substâncias que levem à causa da morte, mesmo quando provas físicas não podem mais ser encontradas no cadáver (SANTOS, 2011; GOFF, 1991).

A história da entomologia como ferramenta para elucidação de crimes nos leva à China do século XIII, porém foi implementada na utilização de estimativa de tempo de decomposição cadavérica apenas em 1855, na França (BENECKE, 2001). No Brasil, essa técnica começou a ser utilizada em 1908, no Rio de Janeiro e Bahia, por Oscar Freire e Edgard Roquette Pinto, os quais registraram a diversidade da fauna de insetos necrófagos em regiões de Mata Atlântica (PUJOL-LUZ *et. al*, 2008). Outra utilização dos insetos como ferramenta em investigação criminal é a averiguação de possibilidade de movimentação do cadáver, fato não incomum em casos de homicídios (PICARD E WELLS, 2012).

A entomogenética forense se refere à aplicação da entomologia combinada com técnicas de biologia molecular no auxílio a resolução de crimes. Mais especificamente, procura-se obter DNA humano a partir de insetos adultos ou imaturos com o propósito de relacionar um suspeito à cena de crime, quando esta relação não é possível diretamente. O marco inicial nesta área se deu com os estudos de Wells e colaboradores (2001), em estudos de recuperação de DNA mitocondrial humano a partir de larvas de insetos, e Clery (2001), utilizando marcadores Y-STR, no qual foi demonstrada a possibilidade de utilização de

imaturos de insetos, principalmente dípteros, para a obtenção de perfil genético de agressores em caso de simulação de violência sexual.

As cavidades corporais (nasal, vaginal, entre outras) são naturalmente atrativas para os insetos, sendo as primeiras regiões a serem colonizadas após o óbito. Após a ocorrência de violência sexual, principalmente contra crianças e adolescentes, e posterior morte, são deixados traumas na região vaginal e/ou anal, os quais atraem ainda mais os insetos. Tais espécimes colonizam essas regiões a fim de deixar ovos, ou larvas em alguns casos, que se alimentam da matéria orgânica em decomposição e completam seu ciclo de vida, utilizando o cadáver como substrato (CLERY, 2001). De maneira pioneira, o autor demonstrou ser possível a obtenção de antígeno prostático específico (P30), a partir da dissecação de larvas que tenham se alimentado do cadáver. O P30 é encontrado até mesmo em casos de indivíduos vasectomizados, aspérmicos ou oligospérmicos e sua presença, dentro do devido contexto, é indício de agressão sexual. Além de demonstrar a possibilidade de recuperação de P30 a partir de simulações de casos de estupro seguido de morte, o autor também evidencia a importância da utilização de repetições curtas em tandem do cromossomo Y (*Y-STRs do inglês, Y short tandem repeats*), uma vez que são extremamente úteis em situações em que a amostra encontra-se muito degradada ou quando o número de espermatozoides é muito baixo. Simulando um caso de crescimento e alimentação de larvas em uma situação de colonização de cadáver de vítima de violência sexual, no qual as larvas recebiam além de dieta baseada em carne, quantidades determinadas de sêmen humano, foi demonstrada a possibilidade de recuperação de material genético humano proveniente de agressor, usando como espécimes de estudos larvas da espécie *Lucilia (Phaenicia) sericata* (Diptera: Calliphoridae). Outra constatação importante foi a de que os espermatozoides podem ser encontrados em cadáveres de maneira viável até 16 dias após a morte, enquanto que em vítimas de agressão sexual que continuam vivas esse tempo é reduzido para até três dias (CLERY, 2001).

Além da possibilidade de identificação de suspeitos em casos de violência sexual, estudos mostram a eficácia dessa metodologia em identificações humanas em que técnicas clássicas, como as já citadas, não oferecem resultados conclusivos. Li e colaboradores (2011), em um estudo de caso, utilizaram larvas de terceiro instar de *Aldrichina grahmi* (Diptera: Calliphoridae) coletadas em dois fragmentos de corpos encontrados separadamente, em considerável estado de decomposição,

para verificar se estes eram provenientes de um mesmo indivíduo. Através da correspondência de 16 locos STR oriundos dos dois fragmentos de corpo, foi possível inferir que ambos seriam coincidentes.

Também já foi demonstrada a possibilidade de identificação parental utilizando larvas de moscas das famílias Calliphoridae e Sarcophagidae em um caso de identificação de cadáver vítima de carbonização (CHAVEZ-BRIONES *et al.*, 2013). Apenas três larvas foram encontradas e utilizadas para a extração de material genético contido no conteúdo gastrointestinal, cada uma processada individualmente. A comparação entre o perfil obtido das larvas e o suposto pai apontou a probabilidade de paternidade de 99,658%. Análises anteriores de fragmentos de órgãos, também carbonizados, não ofereceram resultados conclusivos.

A aplicabilidade da entomogenética utilizando-se espécies comumente encontradas na entomofauna tropical também já foi inicialmente demonstrada ao ser administrado sêmen humano à dieta de larvas de *Chrysomya albiceps* e *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae) (CHAMOUN, 2014). No experimento realizado com *C. albiceps* foram recuperados 15 dos 16 locos testados do cromossomo Y (Y-STR). Entretanto, a recuperação dos 15 locos se deu ao final de 14 dias de coleta considerando-se todas as larvas analisadas neste período em conjunto. Ainda, em um experimento *in situ* com inoculação de sêmen humano nas regiões anal e vaginal em cadáver de fêmea de *Sus scrofa* (porco doméstico) foi possível a análise de 8 dos 16 locos testados (CHAMOUN, 2014). Em contrapartida, foi demonstrada a possibilidade e eficácia da utilização de STRs autossômicos a partir de larvas necrófagas, o que permite traçar perfil individual e elimina o viés ocasionado pela utilização de marcadores do cromossomo Y que são informativos de linhagem paterna (KIRSTEN, 2015). Com relação ao tempo de recuperação de DNA humano a partir de larvas, foi evidenciado que este é possível até 2 dias após a coleta (NJAU *et al.*, 2016).

Além da recuperação de DNA e análise de STRs a partir do intestino de larvas, já foi demonstrada também a recuperação de sequências que contém SNPs (do inglês, *Single Nucleotide Polymorphism*) a partir de larvas de *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) (KONDAKCI *et al.*, 2009), e de STR do cromossomo X (OLIVEIRA *et al.*, 2016). Em casos de material genético demasiadamente degradado, segmentos de DNA que contém SNPs podem ser uma alternativa viável

à rotina forense para a identificação humana, uma vez que para este propósito amplicons de tamanhos menores podem ser utilizados e estes são mais prováveis de serem conseguidos do ponto de vista técnico em material degradado.

Outra possibilidade dentro da entomogenética forense é a recuperação de DNA humano a partir de dípteros hematófagos com o propósito de relacionar um suspeito à cena de crime. Já foi demonstrada a possibilidade de recuperar DNA humano até 48 horas após a ingestão de sangue por culicídeos, os mosquitos mais abundantes em ambientes urbanos (CURIC *et al.*, 2014). Da mesma maneira recuperou-se perfil genético compatível entre um doador, previamente identificado, e amostras de sangue proveniente de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) após ingestão de sangue humano (RABELO *et al.*, 2015) e também DNA mitocondrial humano (VIEIRA *et al.*, 2017). Além dos usuais experimentos utilizando sangue e sêmen para a recuperação de material genético humano a partir de conteúdo intestinal de larvas de moscas, foi demonstrada também a possibilidade de tal obtenção a partir de saliva (DURDLE, MITCHELL E VAN OORSCHOT, 2013). Estudos como os citados demonstram e ressaltam a importância do estudo e da utilização de insetos para rotinas forenses.

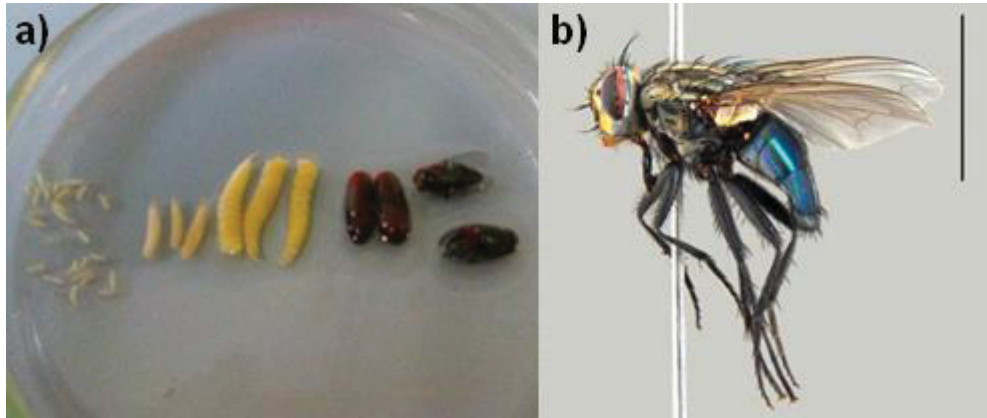
Dos trabalhos acima mencionados que utilizam DNA humano a partir de larvas necrófagas, todos que fizeram simulações de violência sexual acrescentaram apenas sêmen humano à dieta artificial que é à base de carne animal. Sendo assim, estes estudos representam parcialmente o que se encontra em casos reais que é a mistura de material da “vítima” e do “agressor”. Ou seja, nos referidos experimentos não esteve representado o problema do DNA da vítima que está em excesso e, acaba sendo preferencialmente amplificado em detrimento do DNA do agressor. Sendo assim, o diferencial do presente trabalho é incluir, além do sêmen, material biológico de origem feminina à dieta das larvas.

### 2.1.3 *Sarconesia chlorogaster* (Wiedemann)

Insetos pertencentes à ordem Diptera são há muito tempo associados a decomposição de matéria orgânica, uma vez que seus imaturos são geralmente necrófagos ou saprófagos. Dentre as famílias que compõem esse nível taxonômico, duas se destacam pela ampla ocorrência em diversos tipos de carcaças e cadáveres: Calliphoridae e Sarcophagidae (CAMPOBASSO *et al.*, 2001).

A decomposição é composta por cinco estágios sucessionais: (i) fase fresca (0-2 dias), caracterizada entre o momento da morte e os primeiros sinais de inchaço; (ii) fase de inchaço (2-12 dias), na qual a putrefação é sinal característico do início desse estágio; (iii) fase de putrefação (12-20 dias) onde o inchaço causado pelos gases de decomposição é diminuído pela liberação dos mesmos, causando rompimento da pele; (iv) fase pós putrefação (20-40 dias), em que o cadáver é reduzido a pele, cartilagens e ossos; e (v) fase de esqueletização (40-50 dias), na qual apenas ossos são encontrados (GOFF, 1993). Os dípteros são encontrados apenas nas três primeiras fases de decomposição.

A espécie escolhida para o presente estudo foi *Sarconesia chlorogaster* (Wiedemann) a qual tem ciclo de vida de aproximadamente 19 dias, quando mantida em condições laboratoriais (temperatura de  $27\pm 1^\circ\text{C}$ ,  $70\pm 10\%$  de umidade relativa, e fotofase de 12 horas) (BONATTO, 1996). É encontrada exclusivamente na América do Sul, sendo que, no Brasil, ocorre apenas na região sul (QUEIROZ *et al.* 1985). Seu desenvolvimento é dividido em três fases imaturas (1º, 2º e 3º instares), após a eclosão dos ovos, seguida de pupa e adulto e é frequentemente encontrado em cadáveres em estágios iniciais de decomposição (FERREIRA, 1978) (Figura 2). Espécies de dípteros pertencentes à Calliphoridae, juntamente com espécies de Muscidae, colonizam cadáveres aproximadamente duas a três horas após sua exposição, sendo, portanto, os primeiros insetos a colonizar e também os principais associados à decomposição, seguidos por indivíduos pertencentes à família Sarcophagidae e à ordem Coleoptera (CAMPOBASSO *et al.*, 2001). Conforme supracitado, insetos dípteros podem ser encontrados nos três primeiros estágios de decomposição, estando à família Calliphoridae presente nos três estágios (GOFF, 1993). Espécimes de *S. chlorogaster* são encontrados principalmente na fase fresca, aproximadamente até três dias a partir do momento da morte. Após a colonização de cadáveres, a alimentação das larvas acontece por meio de secreção de enzimas digestivas de atividade proteolítica que dissolvem tecidos. Larvas de algumas espécies de dípteros podem possuir enzimas com atividade de desoxirribonucleases (DNAse), capazes de degradar DNA humano (SHERMAN, 2014). Tais espécies podem ser utilizadas em terapias larvais, mas acabam por extinguir vestígios de DNA em casos de análises forenses.



**Figura 2:** a) Desenvolvimento de *Sarconesia chlorogaster*: primeiro, segundo e terceiro instar, pupa e adulto, respectivamente. b) Vista lateral de exemplar adulto de *S. chlorogaster*.

Fonte: a) arquivo pessoal; b) modificado de Lecheta e Luz (2015), barra de escala = 5 mm

### 3 OBJETIVOS

A quantidade de larvas encontradas em cavidades vaginais, anais e orais de cadáveres encontrados após violência sexual pode dificultar a identificação do agressor por metodologias convencionais, como a utilização de *swabs*, uma vez que a voracidade de tais insetos pode “eliminar” vestígios em corpos. Sendo assim, visando a simulação de mistura de material genético masculino e feminino que ocorre em casos de violência sexual e a utilização da entomologia forense como ferramenta para a obtenção de material genético os objetivos deste trabalho são:

#### 3.1 GERAL

Determinar qual o melhor método de extração para recuperar material genético a partir de larvas da espécie necrófaga *Sarconesia chlorogaster* (Diptera: Calliphoridae), alimentadas com uma mistura de células de origem masculina e feminina, para a obtenção de perfil genético que permita identificação humana relativa à fonte masculina.

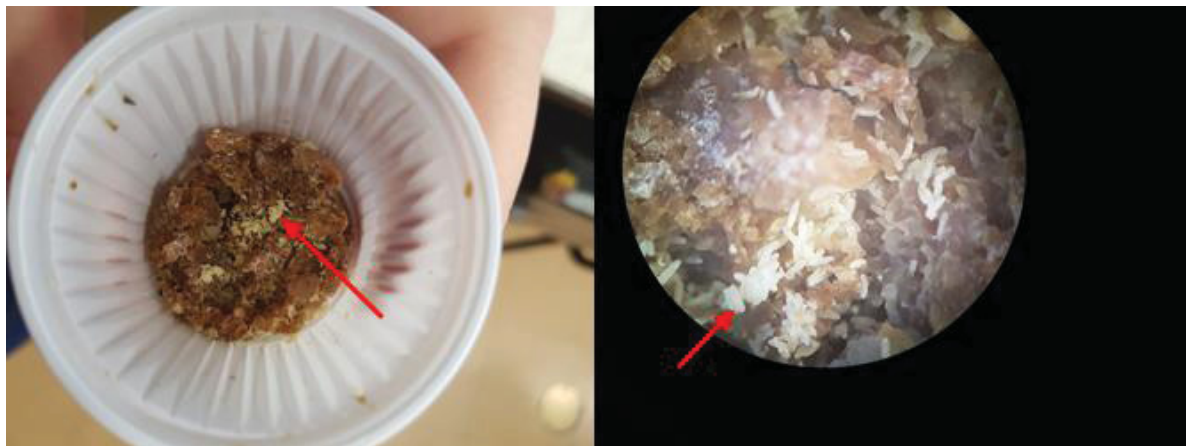
#### 3.2 ESPECÍFICOS

- Simular condições de misturas de material genético ocorrente em casos de crimes sexuais com vítima do sexo feminino e agressor do sexo masculino através de diferentes proporções de sêmen e sangue;
- Estabelecer cultivos da espécie necrófaga *Sarconesia chlorogaster* e alimentar larvas com as misturas mencionadas acima;
- Testar diferentes métodos de extração de DNA (extração orgânica direta, extração orgânica diferencial e automatizada) rotineiros em laboratórios de genética forense para avaliar qual deles apresenta o melhor desempenho na recuperação de DNA humano;
- Testar o poder estatístico relacionado aos marcadores obtidos, através de análise de verossimilhança para verificar se permite a identificação do agressor.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 OBTENÇÃO E CULTIVO DAS LARVAS

Os espécimes adultos foram coletados na região de Chapecó (SC), por alunos do Laboratório de Dinâmicas Ecológicas da Universidade Federal do Paraná utilizando-se armadilhas conforme descrito por Ferreira (1978). Os indivíduos coletados foram acondicionados em gaiolas, após identificação e sexagem, para constituir a geração parental, alimentados com mistura de água e leite em pó. Como substrato para postura de ovos foi utilizada carne bovina (fígado) e como meio de cultivo e desenvolvimento larval foi utilizado protocolo de Estrada e colaboradores (2009) (Tabela 3). Os ovos depositados na carne bovina (Figura 3) foram transferidos para meios de cultivo contendo misturas de DNA masculino e feminino, tendo estes como fonte espermatozóides e leucócitos, respectivamente. As proporções utilizadas foram 1:100, 1:200 e 1:400 (detalhamento na seção 4.2.1). (Figura 4). Cada tratamento apresentava 100g de meio de cultivo no qual foram adicionadas 100 larvas, conforme recomendação de Estrada e colaboradores (2009). A partir da data de introdução de larvas em seus respectivos meios de cultivo, foram retirados exemplares dos diferentes instares e fixação dos espécimes.



**Figura 3.** Ovos de *Sarconesia chlorogaster* em substrato de postura (carne bovina).  
Fonte: Arquivo pessoal.



**Figura 4.** Meios de cultivo e seus respectivos tratamentos  
Fonte: Arquivo pessoal

**Tabela 3.** Composição para preparo de 1 kg de dieta artificial usada o para desenvolvimento de imaturos de *Sarconesia chlorogaster*.

Componentes da dieta artificial	Quantidades
Bucho bovino	300 g
Leite em pó integral	100 g
Levedo de cerveja em pó	100 g
Caseína	5 g
Nipagin	2 g
Ágar-ágar	15 g
Água	700 ml

Fonte: Modificado de Estrada *et al.* (2009).

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), e 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 48h após a eclosão das larvas, foram retiradas uma média de 15 larvas de segundo instar por tratamento, as quais foram lavadas com hipoclorito de sódio (NaClO) a 10%, para garantir que o material posteriormente obtido e amplificado fosse do interior da larva. Em seguida estas foram lavadas com água destilada para remover os resíduos de NaClO, uma vez que este é um conhecido inibidor de PCR e, então fixadas em etanol 70%.

Quarenta e oito horas após a fixação das larvas de segundo instar foram fixadas as de terceiro instar, seguindo o mesmo procedimento de lavagem (Figura 5). Foram observadas também larvas de segundo instar nesse passo, que foram colocadas juntamente com as de terceiro instar, como errantes. 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)



**Figura 5.** Larvas de terceiro instar de *Sarconesia chlorogaster*  
Fonte: Arquivo pessoal.

## 4.2 AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Dois indivíduos, um do sexo masculino e um do sexo feminino foram incluídos neste estudo. Estes foram doadores de sêmen e sangue periférico, respectivamente, para a confecção das misturas de material genético.

Os participantes foram esclarecidos dos objetivos da pesquisa e assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas em Seres Humanos do Setor de Ciências da Saúde da UFPR (CAAE 02520918.9.0000.0102), sendo, portanto, doadores voluntários para o experimento.

### 4.2.1 Coleta de amostras de referência, sêmen e sangue periférico

O sangue de ambos os doadores foi coletado e armazenado em cartão FTA® Whatman™ (papel filtro com propriedade de lise de membranas celulares), segundo protocolo do FBI (1994) e Willard e colaboradores (1998) para servir de amostras referência. O doador voluntário do sexo masculino foi instruído a coletar o sêmen em

frasco estéril, o qual foi armazenado em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  até o início dos experimentos. A fonte de material genético feminino foi o isolado de leucócitos a partir de 40 ml de sangue periférico obtidos por venopunção em tubo contendo EDTA potássico e posteriormente transferido para tubo falcon de 50 ml, ao qual foi adicionado tampão de lise de células vermelhas (RCLB, do inglês *Red Cells Lysis Buffer*). Este foi centrifugado a  $500 \times g$  por 15 minutos e posteriormente removido sobrenadante, a fim de remover plasma e resíduos de hemoglobina. O procedimento de lise foi repetido por 3 vezes e por fim, o *pellet* foi eluído em 15 ml de PBS.

Para que diferentes quantidades de misturas de células pudessem ser testadas na adição destas à dieta das larvas, procedeu-se a contagem de leucócitos em câmara de Neubauer e de espermatozoides em câmara de Mackler. A concentração dos leucócitos foi de aproximadamente 95.000 células/ $\mu\text{l}$ , em um total de 15 ml, totalizando 1.425.000.000 células, e dos espermatozoides 41.000 células/ $\mu\text{l}$ . Como mencionado anteriormente foram utilizadas as proporções de 1:100, 1:200 e 1:400 de espermatozoides com relação aos leucócitos, sendo a proporção de 1:200 considerada limitante na detecção por PCR (CRUZ *et al.*, 2011). Dessa maneira, espera-se representar as situações de excesso de material feminino ocorrentes em casos de crimes sexuais. A fim de assegurar a integridade do meio de cultivo de larvas, permitindo o desenvolvimento das mesmas, estipulou-se um número fixo de leucócitos, 475.000.000, e variou-se a quantidade de espermatozoides de acordo com as proporções a serem testadas: aproximadamente 4.750.000 (1:100); 2.378.000 (1:200); e 1.189.000 (1:400). De acordo com a *World Health Organization* (2010), a concentração espermática em uma pessoa saudável é igual ou superior a 15 milhões de espermatozoides por ml de sêmen, ou igual ou superior a 39 milhões de espermatozoides por ejaculação.

#### 4.3 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

As larvas foram inseridas em microtubos de 2  $\mu\text{l}$  específicos para o equipamento Precellys®24, o qual visa lisar e homogeneizar amostras biológicas, através de um movimento denominado precessão, a elevadas velocidades, juntamente com microesferas metálicas e 500  $\mu\text{l}$  de tampão de lise (10 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 100 mM NaCl, 2% SDS, pH 8,0). O equipamento foi

configurado para realizar 2 ciclos de 30 segundos cada a 5900 rpm, havendo um intervalo de 15 segundos entre os ciclos.

#### 4.4 EXTRAÇÃO DE DNA

##### 4.4.1 Amostras referência

Para obtenção dos perfis genéticos de referência, a extração do DNA dos doadores, tanto masculino quanto feminino, foi realizada com resina *Chelex*® (resina iônica que se liga ao DNA e evita sua solubilização) uma vez que o sangue de ambos doadores foi coletado e armazenado em cartão FTA® Whatman™. Nesse procedimento, para cada indivíduo, foi utilizado dois discos de cartão FTA®, medindo 1,2 mm de diâmetro, solubilizados com água ultra pura (1 ml), agitados em vórtex e incubados por 30 minutos à temperatura ambiente. Após nova homogeneização, o material foi centrifugado a 16.500 x g por 1 minuto. Após a retirada do sobrenadante, foi adicionado 200 µl de resina *Chelex*® 5%, novamente homogeneizado e incubado por 30 minutos em termobloco a 56°C, e em seguida novamente homogeneizado e incubado em 100°C por 8 minutos, para então ser agitado em vórtex e centrifugado em 16.500 x g por 3 minutos.

##### 4.4.2 Larvas

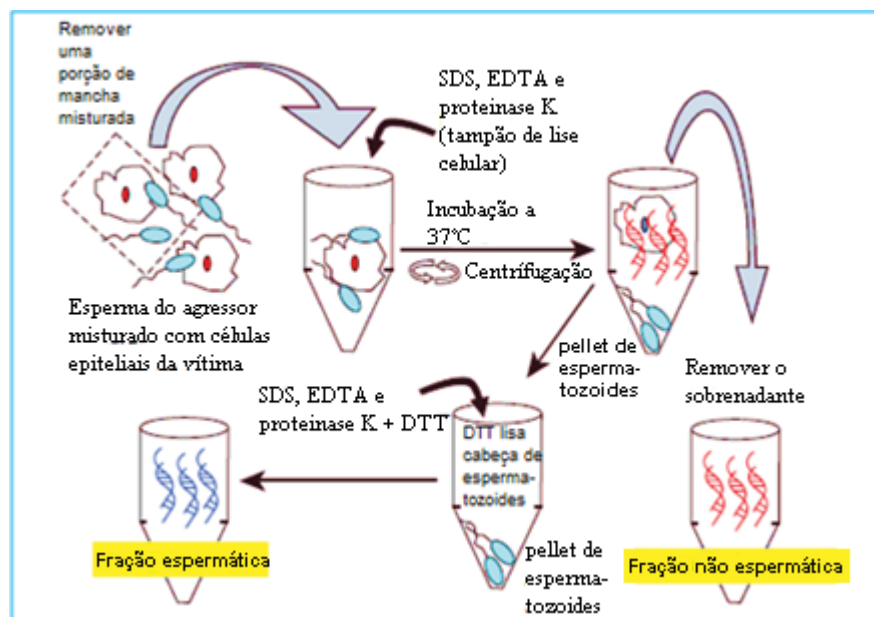
Foi utilizada uma média de 15 indivíduos por tratamento, exceto em tratamentos de 1:400, no qual a quantidade de larvas recuperadas da dieta artificial totalizou 5 indivíduos. Após a maceração dos exemplares realizou-se a extração por três metodologias diferentes: (1) extração orgânica direta por fenol-clorofórmio-álcool isoamílico; (2) extração orgânica diferencial por fenol-clorofórmio-álcool isoamílico; (3) extração automatizada por filtração magnética realizada através do equipamento *AutoMate Express*™ *Forensic DNA Extraction System*.

#### 4.4.2.1 Extração direta por fenol-clorofórmio-álcool isoamílico

Foi adicionado a cada microtubo 280 µl de tampão de lise (10 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 2% SDS, pH 8,0) e 7,5 µl de proteinase K (20 mg/ml) e 12 µl de Ditioneitol (DTT). As amostras foram agitadas e incubadas em banho-maria a 56°C por um período de 24h. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 13.000 x g por um minuto. Em seguida procedeu-se a extração orgânica com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (24:25:1), adicionando-se 300 µl dessa solução a cada amostra, seguida de agitação e centrifugação por 3 minutos a 13.000 x g. Após essa etapa, transferiu-se a fase aquosa para um novo microtubo, e repetiu-se a etapa anterior. À fase aquosa adicionou-se 1000 µl de etanol absoluto, e incubou-se a -20°C por 24h. Posteriormente, retirou-se o sobrenadante por inversão e o DNA foi então eluído em 40 µl de água destilada.

#### 4.4.2.2 Extração diferencial por fenol-clorofórmio-álcool isoamílico

A extração diferencial visa a separação de frações que contenham DNA masculino proveniente das células espermáticas e outra com DNA feminino proveniente da fração não espermática (Figura 6).



**Figura 6.** Extração diferencial para obtenção de DNA da fração masculina e feminina.

Fonte: Modificado de Butler (2005)

Foi adicionado 15 µl de proteinase K (20 mg/ml) a cada amostra, mantendo-as em incubação a 56°C por 24h. Após esse período as amostras foram centrifugadas a 16.500 x g por 5 minutos, sendo, em seguida, separado o sobrenadante, chamado a partir de então de fração feminina (FF), por conter, em casos de violência sexual, predominantemente células epiteliais da vítima e, nesse caso, leucócitos do doador feminino. A porção sedimentada foi denominada fração masculina (FM), por conter majoritariamente material genético proveniente dos espermatozoides, e 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 homogeneização e centrifugação (16.500 x g por 5 minutos), na qual em cada lavagem foi retirado o tampão completamente. Em seguida, adicionou-se 150 µl de tampão de lise, 150 µl de água ultra pura, 15 µl de proteinase K (10 mg/µl), 50 µl de sarkosyl e 10 µl de DTT (ditiotreitól) (1M). Após agitação, a amostra foi levada a banho-maria por 2h a 37°C. O DTT é adicionado apenas na segunda fase da extração por ser capaz de quebrar a membrana do acrossomo, região em que se encontra o material genético do espermatozoide.

Após essa etapa, realizou-se a extração orgânica, adicionando-se 500 µl da solução de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) a cada amostra, seguido de agitação e centrifugação (3 minutos a 13.000 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 à centrifugação. Tal metodologia de extração foi aplicada três vezes, até a obtenção de apenas duas fases na amostra (orgânica e aquosa), tornando a solução, teoricamente, livre de impurezas, como inibidores. Seguindo a etapa de extração, foi feita a precipitação das amostras com 1000 µl de etanol absoluto, a fim de purificá-las, e estas foram mantidas a -20°C por 24 horas. Após esse tempo, as amostras foram centrifugadas a 13.000 x g por 5 minutos, e o sobrenadante foi retirado por inversão. O DNA foi então ressuspensionado em 40 µl de água destilada. A metodologia de extração orgânica por fenol-clorofórmio-álcool isoamílico está incluída no protocolo de extração de DNA seguido pelo FBI.

#### 4.4.2.3 Extração automatizada

Para essa etapa, foi utilizado o equipamento *AutoMate Express™ Forensic DNA Extraction System* e o kit comercial *PrepFiler Express (Applied Biosystems)*, que visa a extração de DNA proveniente de fluídos corporais. Esse método de extração foi escolhido, pois a extração automatizada tende a aumentar a quantidade e qualidade de DNA isolado, especialmente de amostras forenses, o que aumenta a capacidade de obterem-se melhores informações em análises de STR (Figura 7).

Neste método, o tampão de lise é adicionado à coluna juntamente com a amostra para incubação. Seguindo, a coluna é centrifugada a alta velocidade, permitindo que a amostra lisada passe através da membrana, mantendo o substrato na coluna. Tal metodologia elimina as etapas de lise manual e transferência de substrato, o que economiza tempo e minimiza a contaminação cruzada. Após a inserção de cartuchos apropriados, o equipamento utiliza um sistema de *beads* magnéticos que se ligam ao DNA, fazendo além da etapa de extração, a purificação das amostras, retirando inibidores e potenciais degradantes. A amostra eluída remanescente pode ser diretamente encaminhada para a quantificação, conforme orientação do protocolo do equipamento.



**Figura 7.** a) Equipamento AutoMate Express™; b) sistema de *beads* magnéticos em amostras analisadas.

Fonte: Arquivo pessoal.

## 4.5 QUANTIFICAÇÃO DO DNA

O extrato foi quantificado através do *Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR Systems*, utilizando-se o kit *PowerQuant® System* e o programa *HID Real-Time PCR Analysis Software v1.1*, realizado no Laboratório de Genética Molecular Forense, situado no Instituto de Criminalística do Paraná, seguindo protocolo recomendado pelo fabricante (Tabela 4). O sistema utiliza o método de qPCR que determina a quantidade total de DNA autossômico e de cromossomo Y, simultaneamente.

**Tabela 4.** Relação de componentes utilizados para quantificação de DNA em qPCR e seus respectivos volumes por reação.

Componente	Volume por reação
Água, grau de amplificação	7 µl
PowerQuant® 2X Master Mix	10 µl
PowerQuant® 20X Primer/Probe/IPC Mix	1 µl
Extrato de DNA	2 µl
Volume total por reação	20 µl

## 4.6 PCR E ANÁLISE DE STR

### 4.6.1 Autossômico

O material quantificado foi submetido a amplificação utilizando-se o *kit* comercial *PowerPlex® Fusion 6C System (Promega™)*. Os alelos dos locos 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 utilizado no âmbito forense e permite a coamplificação por meio da detecção de seis diferentes fluoróforos, resultando na análise de 27 locos: D1S1656, D2S441, D2S1338, TPOX, D3S1358, FGA, D5S818, CSF1PO, D7S820, D8S1179, D10S1248, TH01, D12S391, vWA, D13S317, D16S539, D18S51, D19S433, D21S11, D22S1045, AMEL, Penta D, Penta E, SE33, DYS391, DYS570, DYS576. Destes, os primeiros 20 marcadores STR estão inclusos no CODIS.

Foi utilizado protocolo sugerido pelo fabricante para preparo de mistura de amplificação em termociclador (Tabela 5) e considerados alelos valores maiores que 100 RFU (unidade de relativa de fluorescência) (Tabela 6).

**Tabela 5.** Mistura de reação para amplificação de DNA autossômico em termociclador e seus respectivos volumes por reação.

Componentes da reação	Volume por reação
PowerPlex® Fusion 6C 5X Master Mix	5 µl
PowerPlex® Fusion 6C 5X Primer Pair Mix	5 µl
Volume de Mix por reação	10 µl
DNA extraído	15 µl
Volume total por reação	25 µl

**Tabela 6.** Condições de ciclagem utilizadas na PCR para sistema *PowerPlex® Fusion 6C System*.

Número de ciclos	Temperatura	Tempo
-	96°C	1 minuto
29	96°C	5 segundos
	60°C	1 minuto
-	60°C	10 minutos
-	4°C	∞

#### 4.6.2 Linhagem paterna (Y-STR)

O material quantificado foi também submetido amplificação utilizando-se o *kit* comercial *PowerPlex® Y23 System (Promega™)*, o qual permite a detecção de quatro diferentes fluoróforos, resultando na análise de 23 locos especificamente masculinos: DYS19, DYS385a/b, DYS389I/II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393, DYS437, DYS438 (penta), DYS439, DYS448, DYS456, DYS458, DYS481, DYS533, DYS549, DYS570, DYS576, DYS635, DYS643 (penta) e Y-GATA-H4. Foi utilizado protocolo sugerido pelo fabricante para preparo de mistura de amplificação (Tabela 7) e amplificação em termociclador (Tabela 8), considerando alelos, valores maiores que 100 RFU.

**Tabela 7.** Relação de componentes utilizados para amplificação de DNA do cromossomo Y em termociclador e seus respectivos volumes por reação.

Componentes da reação	Volume por reação
PowerPlex®Y23 Master Mix	5 µl
PowerPlex®Y23 Global Primer Set	2,5 µl

Volume de Mix por reação	7,5 µl
DNA extraído	17,5 µl
Volume total por reação	25 µl

**Tabela 8.** Condições de ciclagem utilizadas na PCR para sistema *PowerPlex® Y23*.

Número de ciclos	Temperatura	Tempo
-	96°C	2 minutos
30	94°C	10 segundos
	61°C	1 minuto
	72°C	30 segundos
-	60°C	20 minutos
-	4°C	∞

Os produtos amplificados foram submetidos à análise de fragmentos em analisador genético *Applied Biosystems® 3500* juntamente com a escala alélica (*allelic ladder*) e o tamanho padrão (*size standard*) para cada um dos sistemas (*PowerPlex® Fusion 6C*: LIS 500 e *PowerPlex® Y23*: LIS 500) e formamida Hi-Di e submetido à análise pelo *software GeneMapper® ID v.3.2* para comparação entre o perfis genéticos encontrados nas larvas e os perfis referência dos doadores. Foi utilizado protocolo sugerido pelo fabricante para preparo de mistura de análise de fragmentos, respeitando os sistemas utilizados, *PowerPlex® Fusion 6C* (Tabela 9) e *PowerPlex® Y23* (Tabela 10).

**Tabela 9.** Relação de componentes utilizados para análise de fragmentos em analisador genético para sistema *PowerPlex® Fusion 6C*.

Componentes da reação	Volume por reação
Formamida HiDi	9,6 µl
Size Standard LIS 500	0,4 µl
Allelic Ladder/DNA amplificado	1 µl
Volume total por reação	11 µl

**Tabela 10.** Relação de componentes utilizados para análise de fragmentos em analisador genético para sistema *PowerPlex® Y23*.

Componentes da reação	Volume por reação
Formamida HiDi	9,5 µl
Size Standard LIS 500	0,5 µl
Allelic Ladder/DNA amplificado	1 µl
Volume total por reação	11 µl

#### 4.7 ANÁLISE DE RAZÃO DE VEROSSIMILHANÇA

Além da análise de perfis comparativos, confrontando visualmente amostra referência com a evidência de um crime, há a necessidade de validação estatística da prova apresentada. Para tal, é possível avaliar a probabilidade de vínculo entre ambos os padrões (referência e evidência) através do cálculo da razão de verossimilhança (LR – do inglês *Likelihood Ratio*), sendo este aceito como mais eficiente (PINTO *et al.*, 2011).

A LR baseia-se no cálculo da razão entre a hipótese de que amostra referência e amostra evidência provêm de um mesmo indivíduo e a hipótese de que as amostras sejam provenientes de indivíduos diferentes, as quais são mutuamente excludentes. Sendo assim, quanto maior a razão de verossimilhança, maior a evidência de que amostra referência e evidência são oriundas de um mesmo doador (DUARTE *et al.* 2001).

A base para o cálculo da razão de verossimilhança é a frequência dos alelos de cada STR presente na população e analisado nas amostras, inferidas a partir de grupos populacionais (DUARTE, *et al.* 2001).

O cálculo de LR pode ser descrito como:

$$LR = \frac{1}{P}$$

onde  $P$  é a o produto das frequências do perfil genético individual analisado, calculado a partir da constância alélica de  $N$  locos:

$$P = P_1 P_2 P_N$$

Uma vez que cada loco  $P_N$  pode apresentar alelos  $i$  e  $j$ , as constantes alélicas  $q$  são calculadas tais que:

$$P_N = q_i^2 \text{ para } i = j$$

$$P_N = 2q_i q_j \text{ para } i \neq j$$

Para fins estatísticos, e maior valor de prova, convencionou-se nos laboratórios de genética forense a utilização de pelo menos 8 marcadores STR incluídos no CODIS.

Usando o *software* PATCAN v. 1.2, que utiliza como banco de dados as frequências alélicas da população brasileira (AGUIAR *et al.*, 2012), foram realizadas análises estatísticas acerca dos locos recuperados nas amostras advindas de larvas em comparação com os locos do doador de sêmen.

A análise estatística dos marcadores Y-STR foi realizada a partir do banco de dados “*Y Chromosome Haplotype Reference Database (YHRD)*” (acesso em <http://yhrd.org>) (WILLUWEIST E ROEWER, 2015) o qual calcula a probabilidade de encontrar em seu banco de dados um perfil igual ao inserido. O YHRD consiste em um banco de dados de frequências haplotípicas de marcadores STR e SNP do cromossomo Y, constantemente atualizado por colaboradores, que podem ser utilizadas para análise quantitativa e correspondências em casos forenses e análises de parentesco.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 AVALIAÇÃO DA QUANTIFICAÇÃO

As concentrações e quantidades de DNA obtidas de cada tratamento são mostradas na Tabela 11. Na maior parte dos tratamentos foi possível recuperar DNA humano proveniente do conteúdo gastrointestinal das larvas. É possível notar que apenas uma amostra não apresentou DNA autossômico quantificável, enquanto seis não apresentam quantidades suficientes de DNA proveniente do cromossomo Y. Os resultados da quantificação demonstram a possibilidade de amplificação de grande parte das amostras submetidas. Entretanto, uma grande quantidade de DNA não significa que será possível conseguir perfil correspondente ao “agressor”, uma vez que a grande quantidade pode ser de DNA da “vítima”, considerando as simulações aqui realizadas. Por isso se faz necessária a amplificação e análise dos perfis genéticos.

**Tabela 11.** Quantidade de DNA obtido para os diferentes instares larvais e tratamentos para os marcadores autossômicos e de cromossomo Y.

Amostras			AUTOSSÔMICO		CROMOSSOMO Y	
Instar	Diluição	Extração	(ng/μl)	(ng)	(ng/μl)	(ng)
2°	1:100	AUTO	0,0065	0,26	0,0039	0,156
		DIR	0,0214	0,856	0,0034	0,136
		FF	0,0117	0,468	0,0024	0,096
		FM	0,0061	0,244	0,0010	0,04
2°	1:200	AUTO	0,0018	0,072	0,0005	0,02
		DIR	0,0016	0,064	0,0013	0,052
		FF	0,0024	0,096	0,0006	0,024
		FM	0,0049	0,196	0,0023	0,092
2°	1:400	AUTO	0,0031	0,124	0,0009	0,036
		DIR	0,0012	0,048	N/A	N/A
		FF	0,0038	0,152	0,0005	0,02
		FM	0,0042	0,168	0,0010	0,04
3°	1:100	AUTO	0,0077	0,308	0,0091	0,364
		DIR	0,0003	0,012	N/A	N/A
		FF	0,0016	0,064	N/A	N/A
		FM	0,0182	0,728	0,0148	0,592
3°	1:200	AUTO	0,0005	0,02	0,0005	0,02
		DIR	0,0006	0,024	N/A	N/A
		FF	0,0004	0,016	N/A	N/A
		FM	0,0033	0,132	0,0019	0,076
3°	1:400	AUTO	0,0012	0,048	0,0007	0,028
		DIR	0,0018	0,072	0,0004	0,016
		FF	0,0019	0,076	0,0004	0,016
		FM	N/A	N/A	N/A	N/A

Legenda: **ng**: nanogramas; **AUTO**: extração automatizada; **DIR**: extração direta; **FF**: fração feminina ou não espermática proveniente de extração diferencial; **FM**: fração masculina ou espermática proveniente de extração diferencial; **N/A**: não amplificado.

## 5.2 ANÁLISE DE MARCADORES STR AUTOSSÔMICOS

Os perfis genéticos das amostras referência e o perfil obtido a partir das larvas são mostrados na Tabela 12. Não foram obtidos perfis genéticos viáveis a partir de análise de tratamentos de 1:400. Tampouco se observou perfis referentes à utilização de metodologia de extração direta por fenol-clorofórmio-álcool isoamílico. Portanto, são mostrados os perfis referentes às proporções 1:100 e 1:200 para os métodos de extração automatizada e diferencial nos 2º e 3º instares larvais..

**Tabela 12.** Relação de marcadores analisados e alelos obtidos em perfil de referência masculino, feminino e alelos obtidos em tratamento com mistura de células sanguíneas femininas e sêmen.

<b>Marcador STR</b>	<b>Ref. Masc</b>	<b>Ref. Fem</b>	<b>2ª instar 1:100 auto</b>	<b>2º instar 1:200 FM</b>	<b>3º instar 1:100 FM</b>
<b>AMEL</b>	X/Y	X/X	N/R	X/Y	X/Y
<b>D3S1358</b>	15/17	15/16	<b>15/16/17</b>	<b>15/16/17</b>	<b>15/17</b>
<b>D1S1656</b>	17.3/19.3	11/16	<b>16/17.3/19.3</b>	11/16	<b>17.3/19.3</b>
<b>D2S441</b>	11/14	11.3/11.3	<b>11/11.3</b>	<b>11/14</b>	<b>11/14</b>
<b>D10S1248</b>	14/14	15/16	<b>14/15</b>	<b>14/14</b>	<b>14/14</b>
<b>D13S317</b>	12/12	9/11	<b>11/12</b>	<b>11/12</b>	<b>11/12</b>
<b>PENTA E</b>	5/16	7/12	N/R	N/R	<b>5/16</b>
<b>D16S539</b>	9/12	12/12	<b>9/12</b>	<b>9/12</b>	<b>9/12</b>
<b>D18S51</b>	14/17	16/20	<b>14/17/20</b>	<b>14/17</b>	<b>14/17</b>
<b>D2S1338</b>	23/25	17/17	<b>23/25</b>	<b>23/23</b>	<b>23/25</b>
<b>CSF1PO</b>	10/12	11/12	<b>12/12</b>	<b>10/12</b>	<b>10/12</b>
<b>PENTA D</b>	11/14	9/13	<b>11/11</b>	<b>11/11</b>	<b>11/14</b>
<b>TH01</b>	7/9.3	9.3/9.3	<b>7/9.3</b>	<b>7/7</b>	<b>7/9.3</b>
<b>VWA</b>	16/18	16/18	<b>16/18</b>	<b>16/18</b>	<b>16/18</b>
<b>D21S11</b>	30/30	29/30	<b>29/30</b>	<b>30/30</b>	<b>29/30</b>
<b>D7S820</b>	10/10	10/10	<b>10/10</b>	N/R	<b>10/10</b>
<b>D5S818</b>	12/13	11-12	<b>11/13</b>	<b>11/13</b>	<b>11/12/13</b>
<b>TPOX</b>	11/11	10/11	<b>10/11</b>	N/R	<b>11/11</b>
<b>D8S1179</b>	13/14	11/11	N/R	<b>11/14</b>	<b>13/14</b>
<b>D12S391</b>	20/24	23/24	<b>20/23</b>	<b>20/23</b>	<b>20/24</b>
<b>D19S433</b>	13/15.2	15/15	<b>15/15.2</b>	<b>13/13</b>	<b>13/15.2</b>
<b>SE33</b>	18/19	14/18	<b>14/18/19</b>	<b>19/19</b>	<b>18/19</b>
<b>D22S1045</b>	15/16	14/16	<b>15/16</b>	<b>15/16</b>	<b>15/16</b>
<b>DYS391</b>	10	N/R	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
<b>FGA</b>	20/25	20/22	N/R	N/R	<b>20/25</b>
<b>DYS576</b>	14	N/R	<b>14</b>	<b>14</b>	<b>14</b>
<b>DYS570</b>	18	N/R	<b>18</b>	<b>18</b>	<b>18</b>

Legenda: **Ref. Masc.:** padrão referência masculino; **Ref. Fem.:** padrão referência masculino. **auto:** método de extração automatizada; **FM:** fração masculina, ou espermática, resultante de extração

diferencial. **N/R**: nenhum resultado obtido. Alelos masculinos, correspondentes ao padrão referência masculino, estão marcados em negrito.

Para o cálculo de razão de verossimilhança foram confrontados os perfis de mistura proveniente do conteúdo gastrointestinal das larvas com o perfil referência do doador masculino. O cálculo de LR leva em consideração apenas locos que não perderam nenhum alelo. Torna-se importante obter-se o perfil da vítima e de suspeito de maneira isolada, uma vez que para se calcular a razão de verossimilhança, em caso em que há mistura do material genético de vítima e suspeito, os alelos considerados da vítima são excluídos da análise.

Os resultados das análises de razão de verossimilhança obtido em cada tratamento estão demonstrados na Tabela 13 e podem ser observados individualmente no Apêndice (Figuras 8 a 10)

**Tabela 13.** Tratamentos e suas respectivas razões de verossimilhança relativas à quantidade de locos autossômicos recuperados.

Tratamento	Locos recuperados	Locos perdidos	Razão de verossimilhança
2º instar 1:100 AUTO	13	9	2.425.148.933.279.370
2º instar 1:200 FM	10	12	4.997.317.973
3º instar 1:100 FM	22	0	2.741.599.494.726.060.000.000.000.000

Legenda: **AUTO**: método de extração automatizada. **FM**: fração masculina, ou espermática, resultante de extração diferencial.

Não foram obtidos perfis genéticos viáveis a partir de análise de tratamentos de 1:400. Tampouco se observou perfis referentes à utilização de metodologia de extração direta por fenol-clorofórmio-álcool isoamílico.

Os eletroferogramas resultantes da análise de tamanho de fragmentos estão mostrados no Apêndice (Figuras 11 a 15).

### 5.3 ANÁLISE DE MARCADORES STR DO CROMOSSOMO Y

Ao analisar os o perfil genético do doador de sêmen, amplificando marcadores do cromossomo Y, e os comparando com o eletroferograma obtido das larvas, pode-se verificar a coincidência de 18 dos 23 alelos analisados (Tabela 14).

**Tabela 14.** Relação de marcadores do cromossomo Y analisados, alelos obtidos em perfil de referência masculino e alelos obtidos em tratamento com mistura de células sanguíneas femininas e sêmen.

Marcadores Y-STR	Perfil masculino referência	3º instar 1:100 FM Y
DYS19	15	15
DYS385 a	13	N/R
DYS385 b	14	N/R
DYS389 I	12	12
DYS389 II	30	30
DYS390	23	23
DYS391	10	10
DYS392	11	N/R
DYS393	15	15
DYS437	16	N/R
DYS438 (penta)	10	10
DYS439	10	10
DYS448	20	20
DYS456	17	17
DYS458	17	17
DYS481	22	22
DYS533	9	9
DYS549	12	12
DYS570	18	18
DYS576	14	14
DYS635	21	21
DYS643 (penta)	10	N/R
Y-GATA-H4	12	12

Legenda: **FM:** fração masculina, ou não espermiática, obtida através de extração diferencial; **N/R:** nenhum resultado obtido.

A análise estatística no banco resultou em uma YHRD chance de correspondência é de 1 em 52.313 haplótipos cadastrados em seu banco de dados.

Não foram obtidos perfis genéticos viáveis a partir de análise de tratamentos de 1:200 e 1:400. Tampouco se observou perfis referentes à utilização de metodologia de extração automatizada ou direta por fenol-clorofórmio-álcool isoamílico.

Os eletroferogramas resultantes da análise de tamanho de fragmentos estão mostrados no Apêndice (Figuras 16 e 17).

## 6 DISCUSSÃO

A submissão de larvas que ingerem tecido humano à análise de STRs pode ser utilizada para a recuperação de material genético e confronto entre material ingerido e cadáver que elas colonizaram, atuando como vestígios em casos de criminais e conectando suspeitos às cenas de crimes, bem como para identificação pessoal (ZEHNER *et al.*, 2004; LI *et al.*, 2011; CHAVEZ-BRIONES *et al.*, 2013). Trabalhos que envolvam, ainda que *in vitro*, a mistura de material genético, tais como encontradas em situações reais de violência sexual seguida de morte, ainda são em pequeno número. Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram a possibilidade de recuperação de material genético, completo ou parcial, de suspeito desse tipo de crime, tanto ao analisar perfil de mistura, a partir de STRs autossômicos, quanto a partir de análise de marcadores STRs do cromossomo Y. Mesmo em casos de recuperação parcial dos perfis, ainda foi possível, através de análise estatística, inferir a grande probabilidade de ambos perfis (referência e recuperado) pertencerem ao mesmo doador. Esse tipo de trabalho mostra-se de extrema importância uma vez que, o material proveniente de *swabs*, ou em casos em que a identificação pessoal baseada em métodos moleculares a partir de tecidos carbonizados (CHAVEZ-BRIONES, 2013) muitas vezes resulta em insucessos na obtenção de DNA devido à degradação por ação do tempo de decomposição e condições ambientais, impossibilitando a análise de perfil genético (SILVA E PASSOS, 2006).

Larvas de diversas espécies, principalmente das famílias Calliphoridae, na qual se enquadra a *Sarconesia chlorogaster*, espécie utilizada nesse trabalho, e Sarcophagidae são utilizadas para estudos envolvendo entomologia e entomogenética forense (CAMPOBASSO *et al.*, 2001). No caso da primeira ciência, o estudo da sucessão faunística e da entomofauna local pode auxiliar na investigação de crimes. O conhecimento da biologia e fisiologia de insetos, principalmente aqueles associados a cadáveres pode fornecer vestígios que de outra maneira são seriam coletados em locais de crime. *S. chlorogaster* é uma espécie de atuação restrita, sendo encontrada apenas na região sul do Brasil (QUEIROZ *et al.*, 1985). Sendo assim, o conhecimento de espécies equivalentes, que possam fornecer resultados semelhantes ao deste estudo, mostra-se de grande importância, uma vez que algumas espécies de insetos utilizam enzimas que

degradam DNA ao se alimentar, impossibilitando a análise de DNA (SHERMAN, 2014).

Usualmente, quando aplicadas à identificação de restos mortais ou casos de crimes sexuais, as larvas coletadas em cadáveres são dissecadas para a diminuição de eventual contaminante que interfira em análises eletroforéticas, conforme apontado por Chamoun (2014), etapa esta que é bastante dispendiosa em termos técnicos. Porém, os resultados aqui obtidos com a maceração e utilização por completo das larvas, demonstram a eficácia do procedimento. A não necessidade da etapa de dissecação agregará agilidade ao processo e elimina a necessidade de conhecimento técnico acerca da dissecação de larvas.

Com relação à quantificação de DNA, apenas 1 das 24 amostras não apresentaram quantidade de DNA suficiente para amplificação dos conjuntos comerciais testados autossômico, enquanto 6 amostras não apresentaram quantidades suficientes de DNA para amplificação do cromossomo Y.

Visando a identificação pessoal, recomenda-se a tentativa de amplificação de DNA autossômico quando se especula integralidade dos espermatozoides contidos na amostra (PRINZ *et al.*, 2007). Sendo assim, o presente estudo evidencia tal possibilidade, demonstrando a capacidade de larvas atuarem como fonte de vestígio e, portanto prova material em casos de crimes sexuais seguidos de morte. Entretanto, a utilização de marcadores Y-STR em casos dessa natureza é amplamente difundida na rotina pericial por sua capacidade de detecção de DNA masculino em situações em que há mistura deste com grandes quantidades de material genético feminino. Os resultados de análises de eletroferogramas obtidos neste experimento demonstram que, conforme citado, o limite de detecção de Y-STRs é eficaz em casos de misturas de perfis genéticos masculinos e femininos, sendo possível a identificação da linhagem paterna, apesar da perda de locos. Todavia, análise de perfis de mistura, comuns em ampliações de STR autossômicos em casos de violência sexual são possíveis através de um perfil genético de referência, feminino, possibilitando o cálculo razão de verossimilhança e, portanto, exclusão ou inclusão de suspeitos, uma vez que, além da confirmação de suspeitos, a genética forense tem como fundamento inocentar pessoas.

Muitos trabalhos atualmente têm demonstrado a possibilidade de recuperação de DNA e posterior obtenção de perfil genético viável para análise, utilizando principalmente dois grupos de dípteros comumente encontrados. Trabalhos como de

Clery (2001), Kondakci e colaboradores (2009), Chamoun (2014), Kirsten (2015) e Njau e colaboradores (2016) utilizaram larvas necrófagas de moscas da família Calliphoridae e obtiveram sucesso na análise de marcadores genéticos. Curic e colaboradores (2014), Rabêlo e colaboradores (2015) e Vieira e colaboradores (2017) utilizaram espécies hematófagas da família Culicidae e encontraram resultados semelhantes. Embora de grande impacto para o aprimoramento e atualização de técnicas capazes de recuperar amostras de DNA a partir de fontes não convencionais na rotina pericial, em casos de violência sexual há a presença de grande quantidade de material da vítima e ainda acrescida de certa quantidade de outro material genético, do agressor. Portanto, a demonstração da possibilidade de obtenção de perfil masculino viável, mesmo em casos em que a quantidade do DNA da vítima é maior, abre uma nova possibilidade de vestígio a ser analisado e, assim, inclui mais uma possibilidade de identificação do agressor em casos de violência sexual.

Os cuidados tomados para com as larvas, desde sua fixação, manuseio e até mesmo o não envolvimento do doador de sêmen em nenhuma outra etapa do experimento, garante que o material recuperado era proveniente da alimentação dos espécimes. Conforme apontado em trabalhos anteriores, foi possível demonstrar a eficácia da utilização de dois estágios de desenvolvimento larval, amplamente utilizados, sendo eles segundo instar (KIRSTEN, 2015) e terceiro instar (CLARY, 2001; KONDAKCI *et al.*, 2009; CHAMOUN, 2014; NJAL *et al.*, 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2016).

Segundo protocolos, a técnica de extração de DNA por automatização assegura melhores quantidades e qualidade de DNA isolado quando comparados a técnicas de extração convencionais por fenol-clorofórmio-álcool isoamílico. Entretanto, neste trabalho, os resultados obtidos em quantificação demonstraram outra tendência. Em todos os tratamentos e instares analisados a extração por fenol-clorofórmio-álcool isoamílico apresentou quantidades maiores de DNA autossômico. Ao compararmos as quantidades de DNA obtidas, em larvas de segundo instar, sob tratamento de 1:100, o método de extração de DNA automatizado possibilitou a obtenção de 0,26 ng de DNA, enquanto o método de extração direta possibilitou um total de 0,86 ng de DNA. Mesmo assim, para esse tratamento foi possível a amplificação e análise de fragmentos a partir do extraído por automatização, conseguindo-se 13 de 27 locos STR autossômicos, dos quais foi calculada a

probabilidade de correspondência genética de 1 em 2.425.148.933.279.370 perfis na população. Este resultado pode estar relacionado com a quantidade de inibidores e degradantes de DNA, uma vez que o método automatizado também garante melhor remoção dessas substâncias. Em larvas de segundo instar sob tratamento de 1:200, a extração automatizada possibilitou a obtenção de 0,072 ng de DNA, enquanto a fração masculina (FM) da extração diferencial possibilitou 0,196 ng, do qual foi possível a análise de fragmentos em analisador genético, gerando perfil viável com 10 de 27 locos, estimando-se a razão de verossimilhança de 1 em 4.997.317.973 perfis. Embora o tratamento de 1:400 não tenha apresentado perfis genéticos passíveis de análise, em larvas de segundo instar a extração automatizada apresentou valores melhores de DNA quando comparados a extração orgânica (0,124 ng e 0,168 ng, respectivamente). Em larvas de 3º instar sob este mesmo tratamento, a extração automatizada apresentou uma quantidade de 0,048 ng. Embora a fração masculina não tenha sido amplificada, tanto a extração direta quanto a fração feminina de extração diferencial apresentaram maiores quantidade de DNA, sendo elas 0,072 e 0,076 ng, respectivamente. Em larvas de terceiro instar, sob tratamento de 1:100, a extração automatizada apresentou uma quantidade de 0,308 ng de DNA, enquanto a fração masculina extraída por método diferencial apresentou um total de 0,728 ng, sendo possível obter-se perfil genético completo dos 27 locos autossômicos analisados, e calcular a probabilidade de correspondência entre os perfis de 1 em 2.741.599.494.726.060.000.000.000.000. Esse mesmo estágio de desenvolvimento, em tratamento de 1:200 também possibilitou a obtenção de maiores quantidade de DNA (0,132 ng), quando comparados ao método automatizado (0,02 ng). Não foi obtido perfil viável a partir de larvas de terceiro instar sob tratamento de 1:200. Esses resultados são esperados, uma vez que o limite de detecção por PCR em perfis de mistura de material genético masculino e feminino é de 1:200 (CRUZ *et al.*, 2011).

Em relação ao DNA proveniente de cromossomo Y, o método automatizado conseguiu valores superiores aos outros métodos sob tratamentos de 1:100 em larvas de segundo instar (0,156 ng) e 1:400 em larvas terceiro instar (0,028 ng). Pode-se perceber também que em larvas de terceiro instar, sob tratamento de 1:100, o qual foi possível a obtenção de perfil de Y-STR parcial a partir da fração masculina da extração diferencial, a quantidade de DNA recuperado nesta (0,592 ng) é superior em relação a automatizada (0,364 ng). Esse tratamento possibilitou a

recuperação de 18 de 22 locos Y-STR, mostrando uma probabilidade de 1 em 52.313 haplótipos cadastrados em seu banco de dados utilizado.

Um dos critérios de inserção de dados no banco de perfis genéticos, recomendado pelo FBI a fim de garantir poder estatístico às análises, é a obrigatoriedade de pelo menos 8 locos presentes no CODIS. Visto que todas as amostras analisadas cumprem esse requisito, sendo que o menor número de locos recuperados foi 10 (segundo instar, em tratamento de 1:200) a quantidade de locos obtida em todos os ensaios realizados apresenta quantidade de locos suficiente para valoração estatística da evidência de DNA.

As técnicas de extração por fenol-clorofórmio-álcool isoamílico avaliadas também apresentaram resultados interessantes. Com exceção do tratamento de 1:100 em larvas de 2º instar, na qual a extração direta rendeu maiores quantidades de DNA (0,856 ng), todos os outros tratamentos foram mais eficazes através da extração diferencial, principalmente através da fração masculina, algo importante quando o objetivo é a recuperação de perfil masculino. A partir disso, tornam-se esperados os resultados obtidos quando observado que não foi possível obtenção de perfil genético viável por extração direta.

Outra observação importante é acerca da não obtenção de perfil genético em tratamento de 1:400 sob nenhuma das técnicas de extração. Isso pode ser decorrente de grandes quantidades de DNA feminino que acabam amplificando preferencialmente em relação ao masculino. Outra possibilidade é a baixa quantidade de larvas recuperadas, que pode ter resultado em baixas quantidades de DNA amplificável. Conforme observado, a partir dos resultados, as análises de frações masculinas obtidas por extração diferencial conferiram maior poder de inferência sobre os dados apresentados. Isso é um importante indicativo de que em casos de violência sexual, em que há mistura de material genético de agressor e vítima, quando estes são de sexos distintos, a separação de DNA masculino e feminino pode auxiliar na identificação do suspeito. Partindo da mesma premissa, a separação é importante uma vez que, também, o material genético proveniente de vítima está em maior quantidade em relação ao do agressor. Sendo assim, em caso de extração em que não há a previa separação desses materiais genéticos, há maior chance de amplificação preferencial de DNA da vítima, não havendo, ou havendo pouca, amplificação de DNA do agressor.

Embora, em primeira análise, os resultados tenham sido satisfatórios, a não realização de repetições, conforme orientado pelo método científico, torna-se um limitante nesse trabalho. Apesar de planejamentos acerca do desenvolvimento da pesquisa, o trabalho com organismos vivos dificulta traçar um cronograma que será seguido metodologicamente. Ainda que bem estabelecida a dieta artificial seguida de Estrada e colaboradores (2009) utilizada nesse estudo, a inserção de fluidos para a simulação de agressão sexual pode dificultar o desenvolvimento das larvas, acarretando em poucos espécimes ou até mesmo a não eclosão de nenhuma larva, sendo necessária a repetição dessas etapas iniciais, e impossibilitando, cronologicamente a repetição dos experimentos.

A coleta de insetos imaturos em locais de crime ainda não é aplicada na rotina das ciências forenses e trabalhos que utilizam insetos nesse âmbito são majoritariamente para análise de sucessão faunística e cálculo de intervalo de tempo de morte (KONDAKCI *et al*, 2009). Dessa forma, vê-se a necessidade, evidenciada nesse e em outros trabalhos, de efetivação de coletas de imaturos em locais de crime, bem como da conscientização de profissionais da área da importância desse tipo de estudo, não apenas para a estimativa de tempo de morte, mas também para identificação criminal a partir de análises de DNA, uma vez que dados obtidos a partir dessas análises podem ajudar a compor os bancos de dados de perfis genéticos.

Casos de feminicídio, principalmente sexual, estão cada vez mais comuns em nossa sociedade e a principal resposta que se pode dar à violência sofrida pelas mulheres é a identificação de criminosos sexuais. Uma vez que métodos convencionais em algumas situações não conseguem de maneira satisfatória identificar completamente os culpados por esse crime, vê-se a necessidade de incorporação de metodologias novas que possam reduzir as taxas de insucesso, principalmente em análises genéticas, que são majoritariamente aplicadas nesse âmbito. A utilização de diferentes proporções entre células femininas e espermatozoides teve por objetivo a aproximação de resultados obtidos *in vitro* e situações reais. As proporção utilizada nesse experimento (1 célula masculina para 100, 200 e 400 células femininas) podem estar próximas do encontrado em casos de violência sexual, uma vez que, geralmente, a violência causada nas regiões vaginais e anais expõe as células, tornando-as preferenciais e em muito maior quantidade quando comparadas a quantidade de espermatozoides.

Neste trabalho, demonstrou-se a possibilidade de obtenção de perfil genético humano a partir de larvas alimentadas com leucócitos e sêmen proveniente de doadores distintos. Dessa maneira, fica demonstrada a possibilidade de se obter perfil genético de agressores a partir de larvas que se desenvolvem em cadáveres. Este trabalho evidencia a necessidade de padronização e inserção desta prática na rotina forense.

## 7 CONCLUSÕES

- Foi possível o cultivo desses insetos em dieta artificial acrescida de material biológico humano (sêmen e células sanguíneas);
- A extração orgânica diferencial, por fenol-clorofórmio-álcool isoamílico, mostrou-se o melhor método para a obtenção de DNA humano a partir de larvas necrófagas, em comparação com as extrações direta e automatizada;
- A quantidade de locos autossômicos amplificados e as estimativas de razões de verossimilhança calculadas são suficientemente altas e demonstram a possibilidade de aplicação na rotina pericial, uma vez que conseguem estimar correspondência entre os alelos encontrados no conteúdo gastrointestinal das larvas quando comparadas ao perfil referência do doador masculino.
- A quantidade de locos sexo-específicos relacionados ao cromossomo Y e a comparação com o banco de dados mostraram-se suficientemente altas, conseguindo estimar correspondência entre os alelos encontrados no conteúdo gastrointestinal das larvas quando comparadas ao perfil referência do doador, e demonstram a possibilidade de aplicação na rotina pericial.

## REFERÊNCIAS

AGUIAR, V. R. *et al.* **Updated Brazilian STR allele frequency data using over 100,000 individuals: an analysis of CSF1PO, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, D21S11, FGA, Penta D, Penta E, TH01, TPOX and vWA loci.** Forensic science international. Genetics, v. 6, n. 4, p. 504-509, 2012.

ANDERSON, G. S. **Insect succession on carrion and its relationship to determining time of death.** In: (BYRD, J. H.; CASTNER. J. L.) Forensic entomology: the utility of arthropods in legal investigations, 143, 76, 2001.

APPLIED BIOSYSTEMS. **PrepFiler Express™ and PrepFiler Express™ BTA Forensic DNA Extraction Kits Quick Reference.**

ARAÚJO, M. E.; PASQUALI, L. **Histórico dos processos de identificação. 2009.** Disponível em: <[http://www.institutodeidentificacao.pr.gov.br/arquivos/File/forum/historico\\_processos.pdf](http://www.institutodeidentificacao.pr.gov.br/arquivos/File/forum/historico_processos.pdf)>. Acesso em: 11/03/2019.

BENECKE, M. **A brief history of forensic entomology.** Forensic. Science International 120: 2-14. 2001.

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 13, 685-106. 1996.

BRASIL. **Projeto - Rede Integrada de Banco de Perfis Genéticos.** A implantação do CODIS (Combined DNA Index System) no Brasil. 2009.

BRASIL. **Lei nº 12.654, de 28 de maio de 2012.** Altera as Leis nº 12.037, de 1º de outubro de 2009, e 7.210, de 11 de julho de 1984 - Lei de Execução Penal, para prever a coleta de perfil genético como forma de identificação criminal, e dá outras providências.

BUTLER, J. M. **Forensic DNA typing: biology, technology, and genetics of STR markers:** Academic Press. 2005.

CAMPOBASSO, C. P., DI VELLA, G., & INTRONA, F. **Factors affecting decomposition and diptera colonization.** Forensic science international, 120, 18-27, 2001.

CAMPOBASSO, C. P., LINVILLE, J. G., WELLS, J. D., & INTRONA, F. **Forensic genetic analysis of insect gut contents.** The American journal of forensic medicine and pathology, 26, 161-165, 2005.

CHAMOUN, C. A. **Recuperação e identificação de DNA humano Y-STR, a partir de imaturos de duas espécies de Calliphoridae (Insecta: Diptera) de importância forense.** Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, 2014.

CHÁVEZ-BRIONES, M. L. *et al.* **Identification of human remains by DNA analysis of the gastrointestinal contents of fly larvae.** Journal of Forensic Sciences, v. 58, n. 1. p. 248-250. 2013.

CLAYTON, T. M.; WHITAKER, J. P.; MAGUIRE, C. N. **Identification of bodies from the scene of a mass disaster using DNA amplification of short tandem repeat (STR) loci.** Forensic Science International, v. 76, n. 1, p. 7-15. 1995.

CLERY, J. M. **Stability of prostate specific antigen (PSA), and subsequent Y-STR typing, of *Lucilia (Phaenicia) sericata* (Meigen) (Diptera: Calliphoridae) maggots reared from a simulated postmortem sexual assault.** Forensic Science International, 120, 72-76. 2001.

CRUZ, A. S. *et al.* **Sensitivity of PCR to amplify sex-specific bovine DNA in diluted samples.** Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 63, n. 4, p. 1012-1015. 2011.

CURIC, G. *et al.* **Identification of person and quantification of human DNA recovered from mosquitoes (Culicidae).** Forensic Science International: Genetics, v. 8, n. 1, p. 109-112, 2014.

d' ALMEIDA, J.M. E MELLO, R.P., **Eficiência de variadas dietas na criação de *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1974) e *Chrysomya putoria* (Wiedemann, 1818) (Diptera: Calliphoridae), sob condições de laboratório, no Rio de Janeiro, RJ.** Entomol Vect, 2: 95-106. 1995.

DUARTE, F. A. M. PEREZ, A., PENA, S., Barros, M., & Rossi, E. **A avaliação do DNA como prova forense.** Ribeirão Preto: FUNPEC. 283p. 2001.

DURDLE, A.; MITCHELL, R. J.; VAN OORSCHOT, R. A. H. **The human DNA content in artifacts deposited by the blowfly *Lucilia cuprina* fed human blood, semen and saliva.** Forensic science international, v. 233, n. 1-3, p. 212-219, 2013.

ESTRADA, D. A.; GRELLA, M. D.; THYSSEN, P. J.; LINHARES, A. X. **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.

FBI – FEDERAL BUREAU OF INVESTIGATION, **Combined DNA Index System (CODIS).** Disponível em: < <https://www.fbi.gov/about-us/lab/biometric-analysis/codis/>> Acesso em: 08/08/2017.

FBI – FEDERAL BUREAU OF INVESTIGATION. **PCR-based typing protocols FBI Laboratory**. Albuquerque: FBI. 1994.

FERREIRA, M. J. M. **Sinantropia de Dipteros Muscoideos de Curitiba, Paraná**. I: Calliphoridae. *Revista Brasileira de Biologia* 39: 773-781. 1978

FÓRUM BRASILEIRO DE SEGURANÇA PÚBLICA. **Crimes contra a dignidade sexual**. Disponível em: <<http://www.forumseguranca.org.br/estatisticas/tableau-dignidade/>> Acesso em: 10/08/2017.

FÓRUM BRASILEIRO DE SEGURANÇA PÚBLICA. **Anuário Brasileiro de Segurança Pública 2018**. Disponível em: <<http://www.forumseguranca.org.br/publicacoes/anuario-brasileiro-de-seguranca-publica-2018/>> Acesso em: 10/09/2018

FRAGOSO, J. M. Feminicídio sexual serial en Ciudad Juárez: 1993-2001. **Debate feminista**, v. 25, p. 279-305. 2002.

FREITAS, T. P. M.; OLIVEIRA-COSTA, J.; CHAMOUN, C. A.; COURI, M. S. **Novas práticas em entomologia forense - Procedimento operacional no processamento da amostra entomológica para análises genéticas**. In: OLIVEIRA-COSTA, J. **Insetos “Peritos”, a entomologia forense no Brasil**. Editora Millennium, Campinas, SP. Cap. XVII, p.351-360, 2013.

GARRIDO, R. G.; GIOVANELLI, A. **Criminalística – origem, evolução e descaminhos**. *Cadernos de Ciências Sociais Aplicadas, Vitória da Conquista*, v. 5/6, p. 43-60, 2009.

GARRIDO, R. G.; PESSOA, C. **Genética e prevenção ao crime**. *Revista LEVS* 10. 26-39. 2012.

GILL, P.; JEFFREYS, A. J.; WERRETT, D. J. **Forensic application of DNA ‘fingerprints’**. *Nature*, v. 318, n. 6046, p. 577-579, 1985.

GOFF, M. L. **Comparison of insects species associated with decomposing remains recovered inside of dwellings and outdoors on the island of Oahu**. *Journal of Forensic Science*. 36: 748- 753. 1991.

GUZICK, D. S., OVERSTREET, J. W., FACTOR-LITVAK, P., BRAZIL, C. K., NAKAJIMA, S. T., COUTIFARIS, C., CARSON, S. A., CISNEIROS, P., STEINKAMPF, M. P., HILL, J. A., XU, D., PHIL, P. VOGEL, D. L. **Sperm Morphology, Motility, and Concentration in Fertile and Infertile Men**. *N Engl J Med*, 345 (19): 1388-1393. 2001.

JEFFREYS, A. J.; WILSON, V.; THEIN, S. L. **Hypervariable “minisatellite” regions in human DNA**. *Nature*, v. 314, n. 6006, p. 67–73, 7 mar. 1985a.

JEFFREYS, A. J.; WILSON, V.; THEIN, S. L. **Individual-specific “fingerprints” of human DNA**. *Nature*, v. 316, n.6023, p. 76-79, 4 jul. 1985b.

JEFFREYS, A. J. *et al.* **Identification of the skeletal remains of Josef Mengele by DNA analysis.** Forensic Science International, v. 56, n. 1, p. 65-76, 1992.

JOBLING, M. A., & GILL, P. **Encoded evidence: DNA in forensic analysis.** Nature Reviews Genetics, 5(10), 739-751. 2004.

KIRSTEN, R. R. L. **DNA humano obtido de conteúdo intestinal de larvas de *Sarconesia chlorogaster* (Diptera: Calliphoridae) e seu auxílio em casos de crimes sexuais.** Monografia. Universidade Federal do Paraná, PR, 2015.

KONDAKCI, G. O. *et al.* **STR and SNP analysis of human DNA from *Lucilia sericata* larvae's gut contents.** Forensic Science International: Genetics Supplement Series, v. 2, n. 1, p. 178-179. 2009.

LAGARDE, M. **Del femicidio al feminicidio.** Desde el jardín de Freud, Bogotá, n. 6, p. 216-225. 2006

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.

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.

MINISTÉRIO DA JUSTIÇA E SEGURANÇA PÚBLICA. **Rede Integrada de Bancos de Perfis Genéticos (RIBPG).** Disponível em: <[www.justica.gov.br/sua-seguranca/ribpg](http://www.justica.gov.br/sua-seguranca/ribpg)> Acesso em: 04/10/2017.

MINISTÉRIO DA JUSTIÇA E SEGURANÇA PÚBLICA. **IX Relatório da Rede Integrada de Bancos de Perfis Genéticos (Novembro/2018).** Disponível em: <<http://www.justica.gov.br/sua-seguranca/seguranca-publica/ribpg/relatorio/vii-relatorio-da-rede-integrada-de-bancos-de-perfis-geneticos.pdf/view>> Acesso em: 21/03/2019)

NJAU, D. G. *et al.* **STR analysis of human DNA from maggots fed on decomposing bodies: assessment of the time period for successful analysis.** Egyptian Journal of Forensic Sciences, v. 6, n. 3, p. 261-269. 2016.

OLIVEIRA, T. C. *et al.* **Human autosomal DNA and X chromosome STR profiles obtained from *Chrysomya albiceps* (Diptera: Calliphoridae) larvae used as a biological trace.** Genetics and Molecular Reserch v. 15, n. 4. 2016

PICARD, C. J., WELLS, J. D. **A Test for Carrion Fly Full Siblings: A Tool for Detecting Postmortem Relocation of a Corpse.** Journal of Forensic Science, 57 (2): 535-538. 2012.

PINHEIRO, M. F.. **Genética e biologia forense, e criminalística**. In: FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DO PORTO. Noções gerais sobre outras ciências forenses medicina legal. Porto. 2004.

PINTO, N.; GUSMÃO, L.; AMORIM, A. **X-chromosome markers in kinship testing: a generalisation of the IBD approach identifying situations where their contribution is crucial**. Forensic Science International: Genetics, v. 5, n. 1, p. 27-32. 2011.

PRINZ, M., *et al.* **DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics (ISFG): Recommendations regarding the role of forensic genetics for disaster victim identification (DVI)**. Forensic Science International: Genetics, v. 1, p. 3-12. 2007.

PUJOL-LUZ, J. R, ARANTES, L. C; CONSTANTINO R. Cem anos da Entomologia Forense no Brasil (1908-2008). **Revista Brasileira de Entomologia 52**: 485- 492. 2008.

QUEIROZ, S. M. P.; ALMEIDA, J. R.; CARVALHO, C. J. B. & DUDAS, L. **Bionomia de *Sarconesia chlorogaster* (Wiedemann, 1830) em Curitiba, Paraná, Brasil**. An. Soe. Entomol. Bras. 14 (1): 105-110. 1985.

RABÊLO, K. C. N., **Identificação de DNA humano encontrado em trato digestório de culicídeos hematófagos para fins forenses**. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Pernambuco, PE. 2015.

SESP/PR – SECRETARIA DE SEGURANÇA PÚBLICA DO ESTADO DO PARANÁ. **Relatórios estatísticos**. Disponível em: <  
<http://www.seguranca.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=38>>  
Acesso em: 09/09/2018.

SSP/SP – SECRETARIA DE SEGURANÇA PÚBLICA DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Estatísticas**. Disponível em: <  
<http://www.ssp.sp.gov.br/Estatistica/Default.aspx#/sideEstatistica>> Acesso em:  
10/09/2018.

SANTOS, C. R. M. **Principais características biológicas de interesse forense da família Calliphoridae**. Monografia de Pós-Graduação em Biociências Forenses. Pontifícia Universidade Católica de Goiás – PUC-GO, 2011.

SEGATO, R. L. **Femigenocidio y feminicidio: una propuesta de tipificación**. Revista Herramienta, v.49. 2012.

SHERMAN, R. A. **Mechanisms of maggot-induced wound healing: what do we know, and where do we go from here?** Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, v. 2014. 2014.

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.

SMITH, K. G. V. **A manual of Forensic Entomology**. Oxford: University Printing House, 1986.

VAIRO, K. P.; CORRÊA, R. C.; LECHETA, M. C.; CANEPARO, M. F.; MISE, K. M.; PRETI, D.; CARVALHO, C. J. B.; ALMEIDA, L. M.; MOURA, M. O. **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, 60. 2015.

VIEIRA, B. R. C.; CARVALHO, E. F.; SILVA, D. A. **Analysis of human DNA present in the digestive tract of *Aedes aegypti* mosquitoes for possible forensic application**. Forensic Science International: Genetics Supplement Series, v. 6, p. e324-e326. 2017.

WELLS, J. D., & STEVENS, J. R. **Application of DNA-based methods in forensic entomology**. Annual Review of Entomology, 53, 103-120, 2008.

WELLS, J. D. *et al.* **Human and insect mitochondrial DNA analysis from maggots**. Journal of Forensic Science, v. 46, n. 3, p. 685-687. 2001.

WILLARD, J. M.; LEE, D. A.; HOLLAND, M. M. **Recovery of DNA for PCR amplification from blood and forensic samples using a chelating resin**. In: Forensic DNA Profiling Protocols. Humana Press. p. 9-18. 1998.

World Health Organization. **WHO Laboratory manual for the examination and processing of human semen**, v.5. 2010.

ZEHNER, R. *et al.* **Genetic identification of forensically important flesh flies (Diptera: Sarcophagidae)**. International journal of legal medicine, v. 118, n. 4, p. 245-247. 2004.

## APÊNDICE A

Laudos:	Projeto Rafael					
	Locus Individuais		Cumulativos		ALELOS	
Sistema	LR	Prob	LR	Prob	Padrão	Evidência
DQA1						
TH01	8.445895	0.894134	8.4459E+00	8.9413E-01	7 / 9.3	7 / 9.3
TPOX	10.512208	0.913136	8.8785E+01	9.8886E-01	11 / 11	11 / 11
CSF1PO						
VWA	10.572607	0.913589	9.3869E+02	9.9894E-01	16 / 18	16 / 18
FES						
F13A01						
F13B						
LPL						
D3S1358	7.626790	0.884082	7.1592E+03	9.9986E-01	15 / 17	15 / 17
FGA						
D5S818						
D13S317	11.740842	0.921512	8.4055E+04	9.9999E-01	12 / 12	12 / 12
D7S820	13.013066	0.928638	1.0938E+06	1.0000E+00	10 / 10	10 / 10
D8S1179						
D16S539	11.949037	0.922774	1.3070E+07	1.0000E+00	9 / 12	9 / 12
D18S51	23.644936	0.959424	3.0904E+08	1.0000E+00	14 / 17	14 / 17
D21S11	13.580508	0.931415	4.1969E+09	1.0000E+00	30 / 30	30 / 30
D10S1248	9.614282	0.905787	4.0350E+10	1.0000E+00	14 / 14	14 / 14
D22S1045	4.262870	0.809990	1.7201E+11	1.0000E+00	15 / 16	15 / 16
D1S1656	#####	0.995532	3.8327E+13	1.0000E+00	17.3 / 19.3	17.3 / 19.3
D2S441						
D12S391						
PentaD						
PentaE						
D2S1338	63.274618	0.984442	2.4251E+15	1.0000E+00	23 / 25	23 / 25
D19S433						
Other3						
<b>Índice de Verossimilhança:</b>			2,425,148,933,279,370			

**Figura 8.** Análise estatística realizada pelo software PATCAN v. 1.2. referente ao confronto entre perfil referência masculino (padrão) e perfil genético recuperado a partir de larvas de 2º instar extraído de maneira automatizada sob tratamento de 1:100.

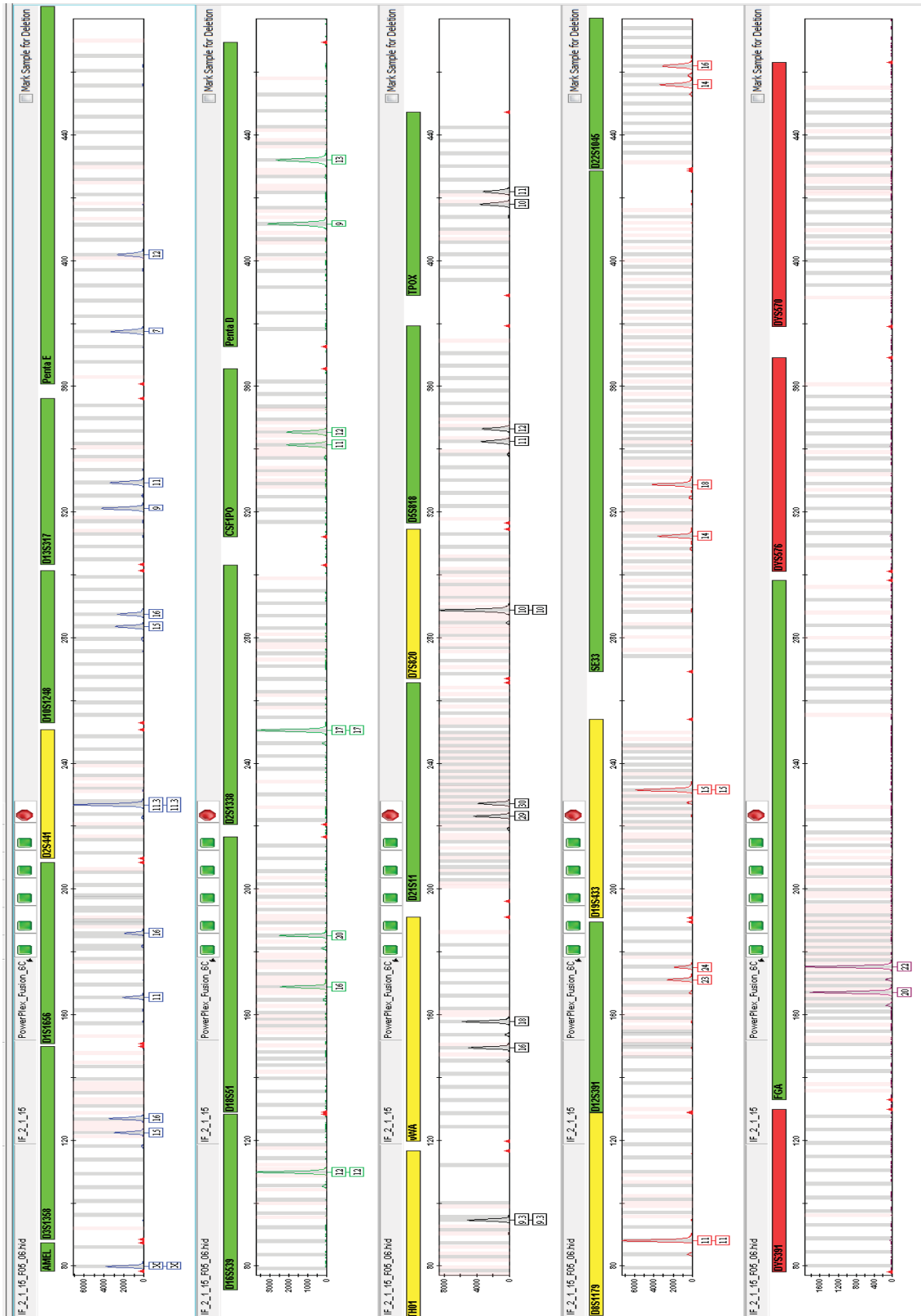
Locus Individuais		Cumulativos		ALELOS		
Sistema	LR	Prob	LR	Prob	Padrão	Evidência
DQA1						
TH01						
TPOX						
CSF1PO	5.725693	0.851316	5.7257E+00	8.5132E-01	10 / 12	10 / 12
VWA	10.572607	0.913589	6.0535E+01	9.8375E-01	16 / 18	16 / 18
FES						
F13A01						
F13B						
LPL						
D3S1358	7.626790	0.884082	4.6169E+02	9.9784E-01	15 / 17	15 / 17
FGA						
D5S818						
D13S317	11.740842	0.921512	5.4206E+03	9.9982E-01	12 / 12	12 / 12
D7S820						
D8S1179						
D16S539	11.949037	0.922774	6.4772E+04	9.9998E-01	9 / 12	9 / 12
D18S51	23.644936	0.959424	1.5315E+06	1.0000E+00	14 / 17	14 / 17
D21S11	13.580508	0.931415	2.0799E+07	1.0000E+00	30 / 30	30 / 30
D10S1248	9.614282	0.905787	1.9997E+08	1.0000E+00	14 / 14	14 / 14
D22S1045	4.262870	0.809990	8.5243E+08	1.0000E+00	15 / 16	15 / 16
D1S1656						
D2S441	5.862460	0.854280	4.9973E+09	1.0000E+00	11 / 14	11 / 14
D12S391						
PentaD						
PentaE						
D2S1338						
D19S433						
Other3						
<b>Índice de Verossimilhança:</b>			4,997,317,973			

**Figura 9.** Análise estatística realizada pelo software PATCAN v. 1.2. referente ao confronto entre perfil referência masculino (padrão) e perfil genético recuperado a partir de larvas de 2º instar extraído de maneira diferencial, obtido da fração masculina (FM) sob tratamento de 1:200.

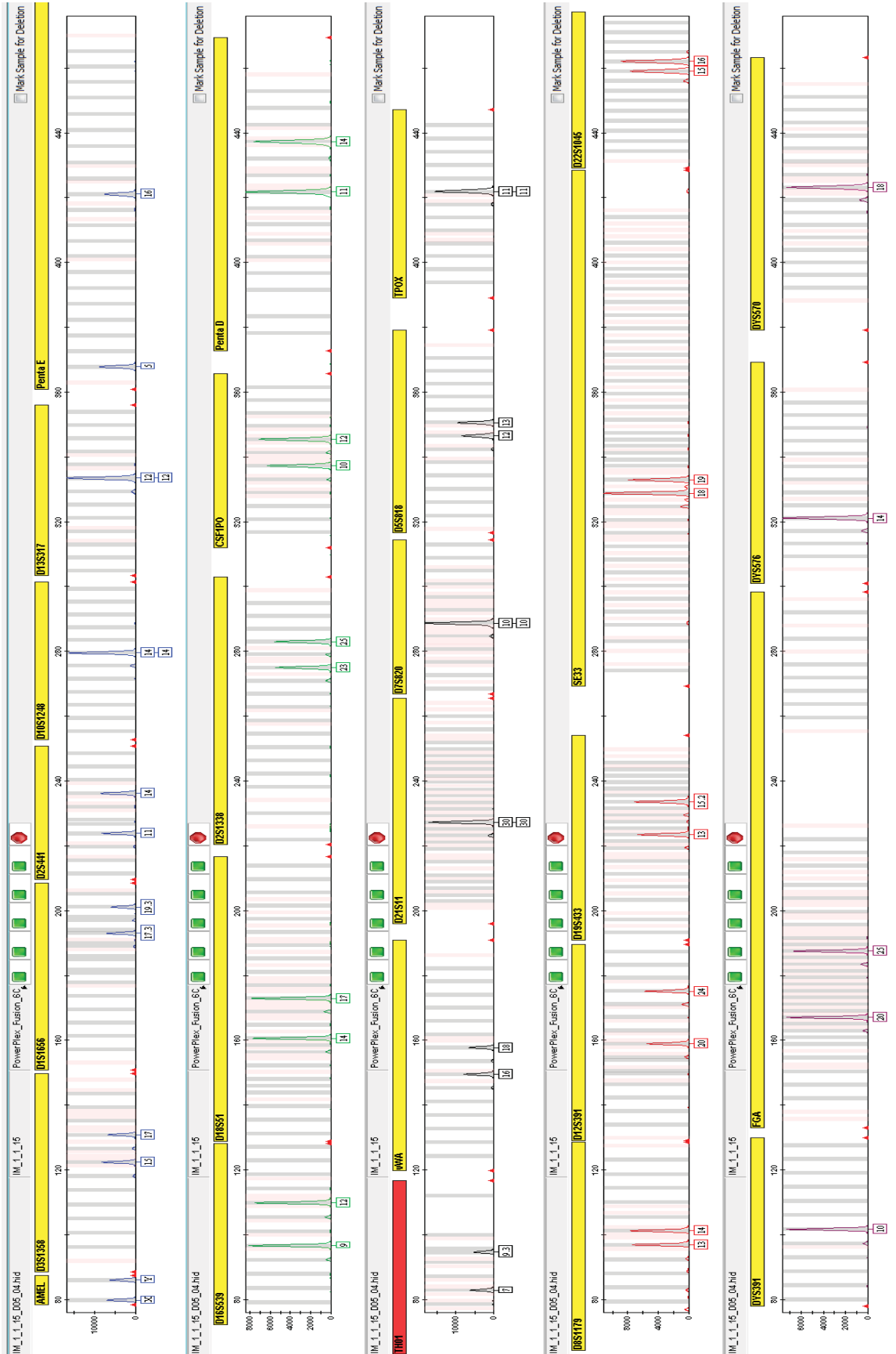
<b>Laudo:</b>		<b>Projeto Rafael</b>					
	<b>Locus Individuais</b>		<b>Cumulativos</b>		<b>ALELOS</b>		
<b>Sistema</b>	<b>LR</b>	<b>Prob</b>	<b>LR</b>	<b>Prob</b>	<b>Padrão</b>	<b>Evidência</b>	
DQA1							
TH01	8.445895	0.894134	8.4459E+00	8.9413E-01	7 / 9.3	7 / 9.3	
TPOX	10.512208	0.913136	8.8785E+01	9.8886E-01	11 / 11	11 / 11	
CSF1PO	5.725693	0.851316	5.0836E+02	9.9804E-01	10 / 12	10 / 12	
VWA	10.572607	0.913589	5.3746E+03	9.9981E-01	16 / 18	16 / 18	
FES							
F13A01							
F13B							
LPL							
D3S1358	7.626790	0.884082	4.0991E+04	9.9998E-01	15 / 17	15 / 17	
FGA	35.838947	0.972855	1.4691E+06	1.0000E+00	20 / 25	20 / 25	
D5S818	7.760957	0.885857	1.1402E+07	1.0000E+00	12 / 13	12 / 13	
D13S317	11.740842	0.921512	1.3386E+08	1.0000E+00	12 / 12	12 / 12	
D7S820	13.013066	0.928638	1.7420E+09	1.0000E+00	10 / 10	10 / 10	
D8S1179	6.981332	0.874708	1.2161E+10	1.0000E+00	13 / 14	13 / 14	
D16S539	11.949037	0.922774	1.4532E+11	1.0000E+00	9 / 12	9 / 12	
D18S51	23.644936	0.959424	3.4360E+12	1.0000E+00	14 / 17	14 / 17	
D21S11	13.580508	0.931415	4.6662E+13	1.0000E+00	30 / 30	30 / 30	
D10S1248	9.614282	0.905787	4.4862E+14	1.0000E+00	14 / 14	14 / 14	
D22S1045	4.262870	0.809990	1.9124E+15	1.0000E+00	15 / 16	15 / 16	
D1S1656	222.823302	0.995532	4.2613E+17	1.0000E+00	17.3 / 19.3	17.3 / 19.3	
D2S441	5.862460	0.854280	2.4982E+18	1.0000E+00	11 / 14	11 / 14	
D12S391	111.676384	0.991125	2.7899E+20	1.0000E+00	20 / 24	20 / 24	
PentaD	36.553510	0.973371	1.0198E+22	1.0000E+00	11 / 14	11 / 14	
PentaE	137.581987	0.992784	1.4031E+24	1.0000E+00	5 / 16	5 / 16	
D2S1338	63.274618	0.984442	8.8778E+25	1.0000E+00	23 / 25	23 / 25	
D19S433	30.881390	0.968634	2.7416E+27	1.0000E+00	13 / 15.2	13 / 15.2	
Other3							
<b>Índice de Verossimilhança:</b>			2,741,599,494,726,060,000,000,000,000				

**Figura 10.** Análise estatística realizada pelo software PATCAN v. 1.2. referente ao confronto entre perfil referência masculino (padrão) e perfil genético recuperado a partir de larvas de 3º instar extraído de maneira diferencial, obtido da fração masculina (FM) sob tratamento de 1:100.

## APÊNDICE B

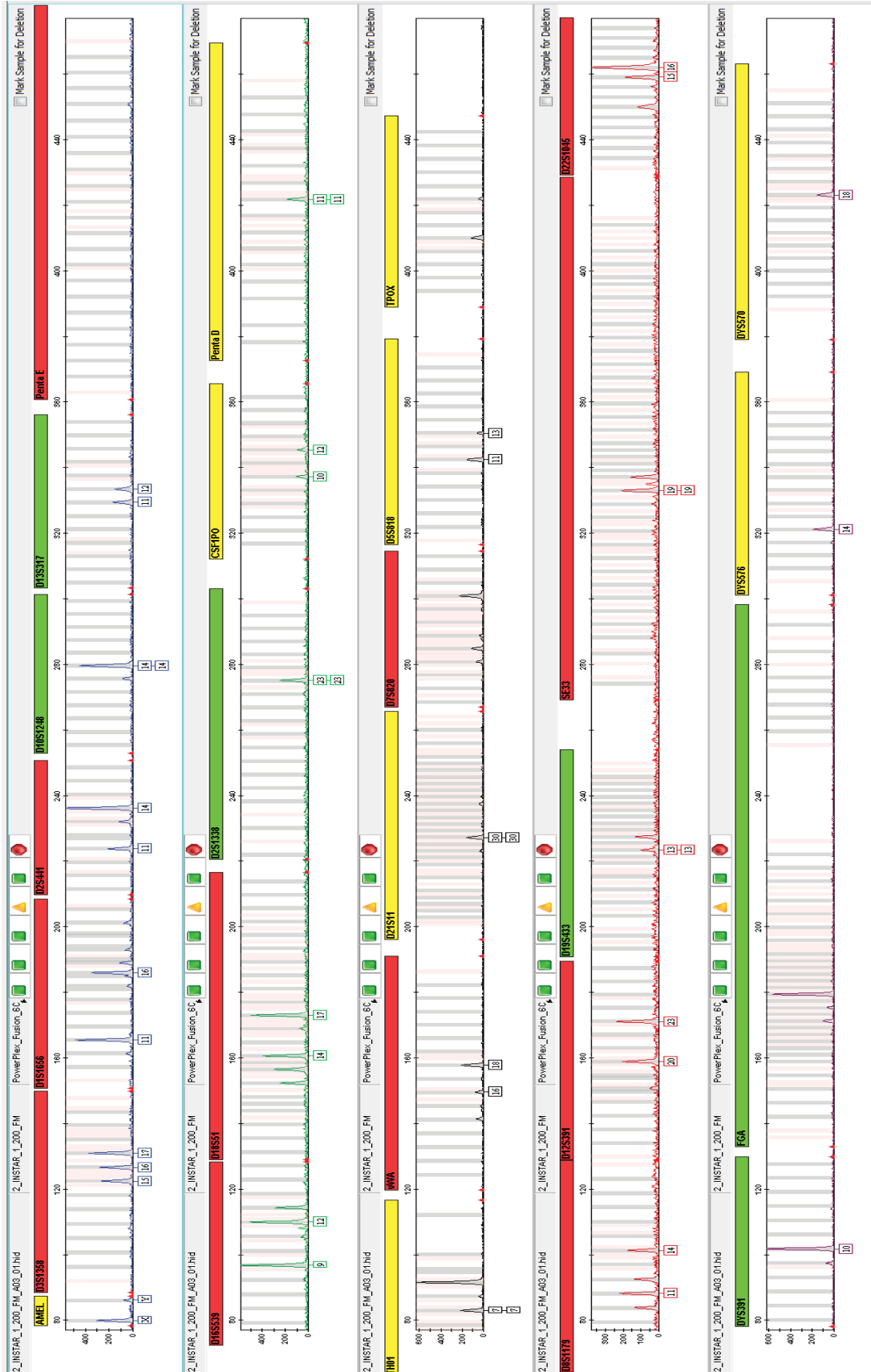


**Figura 11.** Eletroferograma ilustrando perfil de STRs autossômicos do indivíduo doador de sangue do sexo feminino.

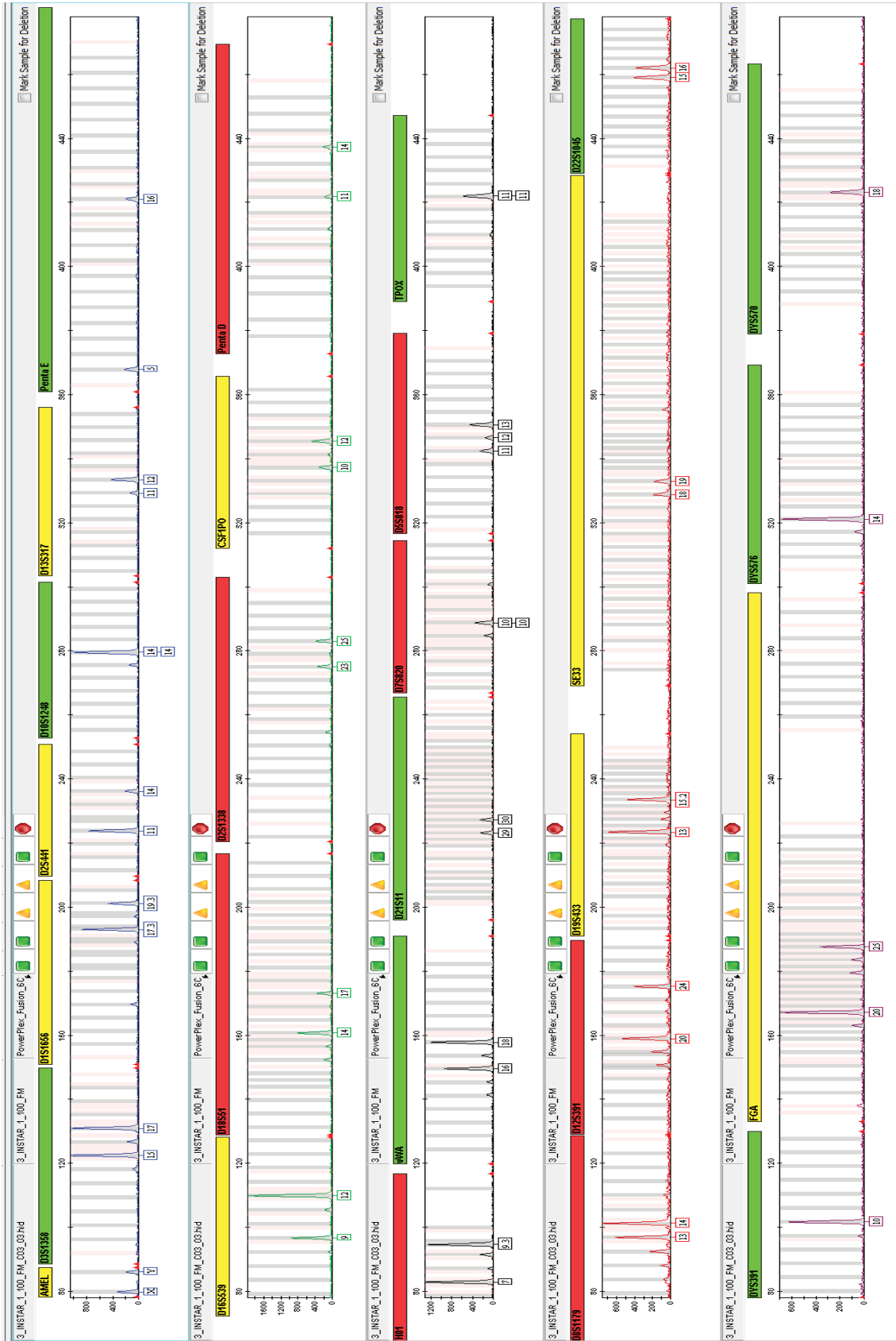


**Figura 12.** Eletroferograma ilustrando perfil de STRs autossômicos do indivíduo doador de sangue do sexo masculino.

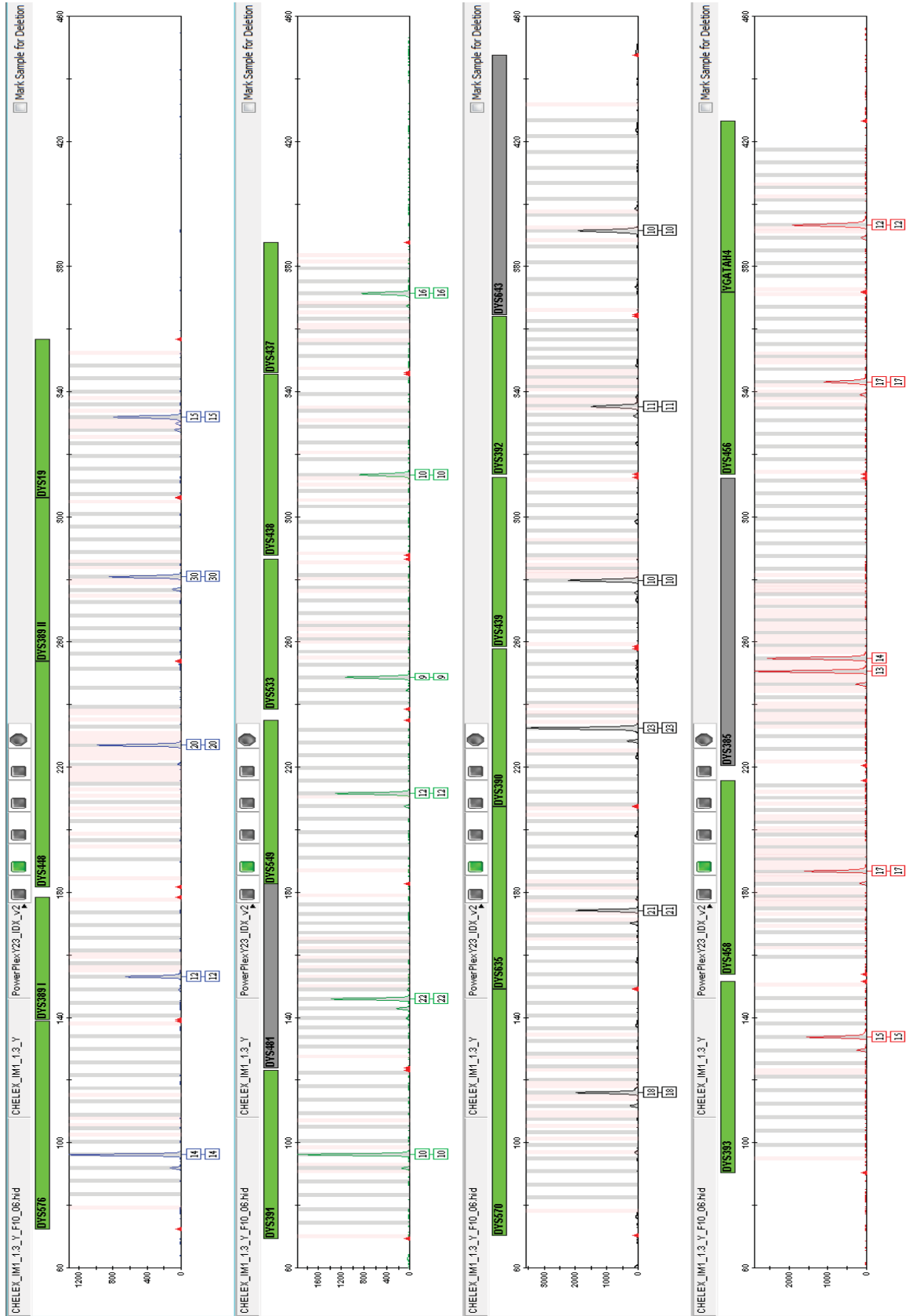




**Figura 14.** Eletroferograma ilustrando mistura perfis de STR autossômicos masculino proveniente de sêmen e feminino obtido a partir de leucócitos obtidos por extração diferencial, fração masculina, sob tratamento de 1:200 de larvas de 2º instar.



**Figura 15.** Eletroferograma ilustrando mistura perfis de STR autossômicos masculino proveniente de sêmen e feminino obtido a partir de leucócitos obtidos por extração diferencial, fração masculina, sob tratamento de 1:100 de larvas de 3º instar.



**Figura 16.** Eletroferograma ilustrando perfil de Y-STR do individuo doador de sangue do sexo masculino.



## APÊNDICE C

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nós, Rafael Roberto Kirsten Luiz, Profa. Dra. Danielle Malheiros Ferreira e Prof. Dr. Marcelo Malaghini – da Universidade Federal do Paraná, estamos convidando você a participar de um estudo intitulado “Identificação humana a partir de larvas necrófagas em casos de crimes sexuais”, o qual visa a simulação de casos de crimes sexuais seguidos de morte para a possível identificação do suposto agressor, pois casos em que vítimas de estupro são encontradas mortas, são muito difíceis de serem resolvidos. Sendo assim, estudos que evidenciem esse revés e demonstrem, ainda, a possibilidade de tal recuperação deve ser explorada, já que estudos preliminares indicam que o material genético é mais eficientemente preservado quando ingerido por larvas.

a) O objetivo desta pesquisa é recuperar material genético humano para fins de identificação humana a partir de larvas *Sarconesia chlorogaster* (Diptera: Calliphoridae) (Diptera: Sarcophagidae), espécie necrófaga, em simulação de casos de crimes sexuais em que há mistura de material genético masculino (agressor) e feminino (vítima).

b) Caso você participe da pesquisa, será necessária a doação de material biológico (sangue ou sêmen).

c) Para tanto você deverá comparecer no Laboratório de Genética Molecular Humana (LGMH), Centro Politécnico - Av. Cel. Francisco H. dos Santos, 210, Jardim das Américas, Curitiba – PR, CEP 81531- 970, para a coleta do material biológico, o que levará aproximadamente 1 (uma) hora.

d) É possível que você experimente algum desconforto, principalmente relacionado a coleta de sangue.

e) Não há riscos inerentes ao estudo.

f) Os benefícios esperados com essa pesquisa são o possível aprimoramento de técnicas que possibilitem a correta identificação de criminosos sexuais, embora nem sempre você seja diretamente beneficiado por sua participação neste estudo.

g) Os pesquisadores, Rafael Roberto Kirsten Luiz, Profa. Dra. Danielle Malheiros Ferreira e Prof. Dr. Marcelo Malaghini, responsáveis por este estudo poderão ser localizados Laboratório de Genética Molecular Humana (LGMH), Centro Politécnico, Setor de Ciências Biológicas, Departamento de Genética, 2º andar - Av. Cel. Francisco H. dos Santos, 210, Jardim das Américas, Curitiba – PR, CEP 81531- 970, das 8h – 12h e das 13h30 às 17h30 para esclarecer eventuais dúvidas que você possa ter e fornecer-lhe as informações que queira, antes, durante ou depois de encerrado o estudo.

h) A sua participação neste estudo é voluntária e se você não quiser mais fazer parte da pesquisa poderá desistir a qualquer momento e solicitar que lhe devolvam este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido assinado.

i) As informações relacionadas ao estudo poderão ser conhecidas por pessoas autorizadas: Rafael Roberto Kirsten Luiz, Profa. Dra. Danielle Malheiros Ferreira e Prof. Dr. Marcelo Malaghini. No entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito sob forma codificada, para que a **sua identidade seja preservada e mantida sua confidencialidade.**

j) O material obtido – amostras biológicas – será utilizado unicamente para essa pesquisa e será descartado ao término do estudo, dentro de 6 meses.

k) As despesas necessárias para a realização da pesquisa referentes ao transporte de deslocamento não são de sua responsabilidade e você não receberá qualquer valor em dinheiro pela sua participação.

l) Quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome, e sim um código

m) Se você tiver dúvidas sobre seus direitos como participante de pesquisa, você pode contatar também o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP/SD) do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, pelo telefone 3360-7259. O Comitê de Ética em Pesquisa é um órgão colegiado multi e transdisciplinar, independente, que existe nas instituições que realizam pesquisa envolvendo seres humanos no Brasil e foi criado com o objetivo de proteger os participantes de pesquisa, em sua integridade e dignidade, e assegurar que as pesquisas sejam desenvolvidas dentro de padrões éticos (Resolução nº 466/12 Conselho Nacional de Saúde).

n) Autorizo (  ), não autorizo (  ), o uso de minha amostra biológica para fins da pesquisa, sendo seu uso restrito a extração de DNA e genotipagem, sendo que esta será descartada ao final do experimento.

Eu, \_\_\_\_\_ li esse Termo de Consentimento e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual concordei em participar. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem qualquer prejuízo para mim. **Eu concordo voluntariamente em participar deste estudo.**

Curitiba, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

---

Assinatura do Participante de Pesquisa ou Responsável Legal

---

Assinatura do Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCLE