**Utilização de insetos para recuperação de DNA – dificuldades e resultados – estudo de caso**

1. CONTEXTUALIZAÇÃO

O estudo dos insetos pode auxiliar a resposta de quesitos: a) Quem é o morto? b) Onde a morte ocorreu? c) Quem é o suspeito? d) Quando a morte ocorreu? (Oliveira-Costa, 2011). A aplicação mais utilizada é a estimativa de Intervalo pós-morte (IPM) que visa estabelecer o tempo entre a morte e a data em que o corpo foi encontrado. Indubitavelmente, a estimativa de IPM é uma das maiores aplicações da entomologia na criminalística. Porém, nos últimos anos vários estudos demonstraram a aplicação de técnicas moleculares, baseadas na genética e no conhecimento do DNA, na área da Entomologia Forense (Zehner *et al*., 2004; Wells & Stevens 2008). Esses estudos possibilitaram o aumento do conhecimento sobre a recuperação e identificação de DNA humano ingerido por larvas de moscas de importância forense, contribuindo para investigações de crimes sexuais, especialmente quando o crime culmina com a morte da vítima cujo cadáver é encontrado em estado de decomposição, dificultando a recuperação dos vestígios diretamente do corpo (Clery, 2001; . Chamoun *et al.,* 2011).

1. PROBLEMÁTICA

Até o momento, a aplicação da entomogenética para recuperação de material genético masculino em crimes sexuais só tinha sido realizada em ensaios de laboratório (Clery, 2001; Chamoun *et al.,* 2011), sendo imprescindível que a técnica fosse testada em casos reais a fim de testar sua eficiência e dificuldades metodológicas, visto que essa é uma alternativa viável para recuperação de DNA do suspeito em cadáveres putrefeitos.

1. DESENVOLVIMENTO

Foram estudados dois casos investigados pela Delegacia de Descoberta de Paradeiros (DDPA) e os exames periciais do local de cadáver encontrado foram realizados pela equipe da Delegacia de Homicídios (DH). Ambos casos envolviam desaparecimento e morte de duas crianças do sexo feminino com suspeição de crime sexual seguido de morte. Portanto, tinham o objetivo de estimar o IPM e buscar material genético masculino, possivelmente oriundo do sêmen, no intestino desses insetos, visto que o sêmen se degrada em cadáveres putrefeitos, inviabilizando o exame de DNA.

Estudo de casos

Caso 1 - Os peritos de local examinaram o corpo, coletando larvas de insetos. Foram encaminhados ao laboratório de Entomologia Médico Legal (LEML) 04 (quatro) frascos tipo “Falcon” contendo larvas, a saber: amostras “a” e “b” – larvas de moscas encontradas na região anal e vaginal; amostras “c” e “d” – larvas de moscas encontradas na face e região lombar. Os indivíduos das amostras “a” e “b” foram encaminhados em álcool e visando recuperação de DNA. Os indivíduos das amostras “c” e “d” foram encaminhados vivos e visaram a estimativa de IPM.

O cadáver também foi examinado nas dependências do IMLAP a fim de coletar outros exemplares de insetos localizados, especialmente, nas áreas do corpo de eleição para ejaculação (vaginal e ânus). Foram coletadas amostras de diversos tipos e tamanhos conforme preconiza a literatura (Oliveira-Costa, 2011) totalizando 50 larvas em segundo e terceiro ínstar.

Caso 2 - Os peritos de local examinaram o corpo, mas não coletaram larvas. O cadáver foi examinado nas dependências do IMLAP durante os procedimentos necroscópicos. Foram coletadas 150 larvas, em segundo e terceiro ínstar localizadas no interior da vagina e ânus para recuperação de material genético. Algumas larvas foram coletadas dispersando do corpo visando estimar o IPM.

Todos os exemplares, sob exame no microestereoscópio, revelaram tratar-se do Filo Arthropoda, Classe Insecta, Ordem Diptera (moscas), Família Calliphoridae (varejeira), sendo a espécie *Chrysomya albiceps* no caso nº 1 e a espécie *Chrysomya megacephala* no caso nº 2, todas em estágio de larva instar 3 e ínstar 2.==

Material e métodos

1. Tratamento das larvas para exame de DNA - Dentre as larvas, a maior parte foi eutanasiada e preservada em álcool para dissecção e exame genético e um pequeno percentual foi levado à criação para cálculo do IPM. Antes da dissecção, as larvas foram lavadas em álcool, deixadas por cinco minutos em água destilada e tornaram a ser colocadas em álcool. Na tentativa de encontrar material genético, as larvas foram dissecadas e o conteúdo da parte anterior do intestino foi retirado e colocado em microtubos contendo tampão de extração a fim de serem encaminhados ao IPPGF. Não há ação de enzimas digestivas no intestino anterior, preservando seu conteúdo e, consequentemente, o material genético ingerido.
2. Estimativa de IPM - A estimativa de IPM foi feita através do cálculo do conceito de grau-dia acumulado; mas os cálculos foram feitos com ressalvas devido ao não comparecimento dos autores ao local em que o cadáver foi encontrado. Foram utilizados dados da média de temperatura dos meses em que os cadáveres foram encontrados e dados de criação da literatura (Queiroz, 1996; Milward de Azevedo *et al.,* 1996). Foi informado que não existiam pupas no local, assim os cálculos de IPM devem ter sido realizados com base nos exemplares mais velhos. A temperatura de massa de larvas foi mensurada no dia da coleta e para os dias anteriores foi utilizado o valor sugerido pela literatura, como aquele que menos superestima os cálculos (um valor entre 33 e 35ºC) (Byrd & Castner, 2009).
3. Análises moleculares - O conteúdo intestinal das larvas foi submetido ao método orgânico de extração de DNA utilizando fenol-clorofórmio-álcool isoamílico e purificado com colunas Microcon®. O DNA obtido foi submetido à amplificação pelo método de PCR utilizando um sistema de identificação baseado em STRs autossômicos e identificação de gênero. Os produtos amplificados foram analisados no ABI PRISM™ 3500 Genetic Analyzer, com auxílio dos softwares ABI Prism 3500 Data Collection e ABI PRISM 3500 GeneMapper® ID-X.

4. CONCLUSÃO

Em ambos os casos as estimativas de IPM foram calculadas em 4 dias. Quanto à recuperação de DNA, foi evidenciada a presença de material genético masculino (alelo Y) no conteúdo intestinal das larvas, mas só foi possível obter um perfil genético parcial. A dificuldade na amplificação do DNA das larvas se deu, provavelmente, pela presença de inibidores de PCR presentes no material fecal (Radstrom *et al.,* 2004). Estratégias de purificação se mostraram ineficientes devido à presença majoritária de DNA das larvas, extraído em conjunto com o DNA do material ingerido pelas mesmas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BYRD, J.H. & CASTNER, J.L. (eds.). Forensic *Entomology: The Utility of Arthropods in Legal Investigations*. 2ª ed., Boca Raton, Florida: CRC Press LLC, 2009
2. CHAMOUN, C. A.; COURI, M. S.; OLIVEIRA-COSTA, J.; LOURO, I. D.; GARRIDO, R. G. Recuperação e identificação de DNA humano (Y-STR) do trato gastrintestinal de imaturos do díptero *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) nutridos com sêmen humano: simulação de análises periciais em casos de crimes sexuais com vítima em decomposição. *In:* IV Congresso Internacional de Perícia Criminal, Gramado, RS, 2011
3. 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, p. 72-76, 2001
4. MILWARD-DE-AZEVEDO. M. V.; CARRARO V. M.; MARTINS C.; MOREIRA O. I.; CRUZ M.; SERAFIN I. “Desenvolvimento pós-embrionário de *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae) em diferentes temperaturas, sob condições experimentais”. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*. 39(4), p. 793-798, 1996
5. OLIVEIRA-COSTA, J. *Entomologia Forense - quando os insetos são os vestígios*. 3ª ed. Campinas: Millennium Editora, 2011.
6. QUEIROZ, M M C. 1996. Temperatures requeriments of *Chrysomya albiceps* (Widemann, 1819) (Diptera:Calliphoridae) under laboratories conditions. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 91 (6): 85-88.
7. RADSTROM, P.; KNUTSSON, R.; WOLFFS, P.; LOVENKLEV, M.; LOFSTROM, C. 2004. Pre-PCR processing: strategies to generate PCR-compatible samples. *Mol Biotechnol* 26, 133-146.
8. WELLS, J.D. & STEVENS, J.R. 2008. Aplication of DNA-Based Methods in Forensic Entomology. *An. R. of Entomology*, 53: 103-120.