

## **Estudos taxonômicos clássicos e moleculares em Entomologia Forense**

### **Classical and molecular taxonomic studies in forensic entomology**

**Juliana Silva de Melo <sup>a</sup>; Valeria do Nascimento Brito<sup>a</sup>; Daniela Ruiz Garcia<sup>a</sup>; Rogéria Maria Ventura<sup>a</sup>**

a: Faculdades de Biomedicina, Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas, Avenida Santo Amaro, 1239, Vila Nova Conceição, São Paulo, SP, Brasil, CEP: 04505-001

#### **RESUMO**

Entomologia Forense é uma área das Ciências Forenses, que utiliza informações importantes do comportamento, alimentação, reprodução e características morfológicas de insetos necrófagos. O intervalo pós-morte (IPM) de um corpo é determinado a partir das análises de insetos necrófagos encontrados em seu interior e superfície, além da causa da morte e da localidade do indivíduo. A Entomologia Molecular Forense se utiliza de técnicas da Biologia Molecular que permitem especificidade na identificação taxonômica dos insetos necrófagos que constituem a fauna cadavérica de um corpo. Além disto, é possível realizar a identificação do indivíduo através do material no saco gástrico da larva e a identificação de material genético diferente do cadáver e do inseto, ou seja, do possível suspeito, com as análises moleculares. O objetivo desse estudo foi à coleta de diferentes dípteros necrófagos na região metropolitana, interior e litoral do Estado de São Paulo, a classificação dos insetos coletados por taxonomia clássica e a verificação de metodologias eficazes para a obtenção de DNA das diferentes fases dos dípteros coletados. Foram obtidas amostras de larva, pupa e inseto adulto das espécies Sarcophagidae, Calliphoridae, Muscidae, Fanniidae e Drosophilidae, entre as diferentes localidades do estado. Amostras destes vários insetos foram utilizadas para a extração de DNA, realizada pelo método modificado de Salting-out e analisadas por espectrofotometria e eletroforese em gel de agarose para verificar as concentrações de DNA e pureza das amostras.

Palavras-Chave: Insetos necrófagos, Biologia Molecular e Entomologia forense.

#### **SUMMARY**

Forensic entomology is an area of forensic science that uses important information about the behavior, feeding, reproduction and morphological characteristics of scavenger insects. The postmortem interval (PMI) of a body is determined from the analysis of scavenger insects found in its interior and surface, beyond cause of death and location of the individual. Forensic Entomology Molecular using techniques of molecular biology that allow specificity in taxonomic identification of carrion insects that constitute the body of a cadaverous fauna. Moreover, it is possible to identify the individual through the bag material in gastric larval identification and genetic material different and insect cadaver, or suspected possible with molecular analyzes. The aim of this study was the collection of different scavengers flies in the metropolitan area, countryside and coastline of the state of São Paulo, the classification of insects collected by classical taxonomy and effective verification for obtaining DNA from different stages of dipterous collected methodologies. Samples of larvae, pupae and adult insect species Sarcophagidae, Calliphoridae, Muscidae, and Fanniidae Drosophilidae, among different localities of the state were obtained. Samples of these various insects were used for DNA extraction, performed by modified salting -out and analyzed by spectrophotometry and agarose gel electrophoresis to verify DNA concentrations and purity of samples method.

Key words: Carrion insects, Molecular Biology and Forensic entomology.

## Introdução

A Entomologia é o estudo da interação dos insetos com o homem e o meio ambiente e tem sido muito utilizado em estudos periciais, auxiliando na identificação de cadáveres devido a fauna cadavérica encontrada no corpo. Pode ser utilizado para estudos de determinadas patologias, já que algumas espécies servem de hospedeiro. Ampliando esse estudo dos insetos temos a Entomologia Forense que é uma ferramenta de suma importância para investigações. Pode ser utilizado como indicador em casos de investigação criminal, determinando a causa, local e modo da morte, intervalo pós-morte e identificação de suspeito e vítima. Outras áreas também utilizam a entomologia forense como auxílio em apurações de delitos como a Entomologia Urbana com insetos que afetam o homem e o meio ambiente e pragas que contaminam alimentos estocados de produtos industrializados.

O primeiro caso descrito na literatura utilizando a Entomologia Forense é datado do século XIII, na China, onde um homem foi assassinado a golpes de foice. No dia seguinte ao crime, o investigador de polícia intima os empregados da propriedade rural no qual se passou o ocorrido para que depositem seus instrumentos de trabalho no chão. Em questão de poucos minutos, as moscas pousaram em uma determinada foice, que apresentava vestígios de sangue, diante da evidência, o dono da foice acaba confessando o crime<sup>1</sup>.

Um dos casos mais relevantes da Entomologia Forense, e o caso do corpo da criança oculto sobre o piso de uma residência na França, onde *Bergeret*, em 1855, utilizou a entomologia como ferramenta auxiliar na elucidação do homicídio, onde devido ao avançado estado de decomposição que o corpo apresentava, foi possível descartar os atuais moradores da residência, já que os mesmo moravam lá a poucos meses, e colocando os ex-moradores como os principais suspeitos do crime.

No Brasil os estudos em Entomologia Forense tiveram início no ano de 1908, com trabalhos pioneiros de Edgard Roquette Pinto no Rio de Janeiro e Oscar Freire na Bahia. Obtiveram ótimos resultados, porém pela falta de

atualização de dados taxonômicos, biológicos e técnicos, além da grande diversidade biológicas, jurídicas e éticas, tiveram certa dificuldade no andamento do estudo. Com levantamentos de estudos envolvendo casos humanos e animais, esses autores registraram a diversidade da fauna de insetos necrófagos em regiões de Mata Atlântica<sup>2</sup>.

Para poder extrair quaisquer evidências a partir dos achados entomológicos é necessário que haja a identificação da espécie do inseto encontrado. Essa identificação geralmente é feita a partir das características morfológicas do espécime coletado. Porém em muitos casos essa diferenciação torna-se difícil, pois há muitas semelhanças entre certas espécies em estágios iniciais de desenvolvimento <sup>3 4</sup> . Atualmente essa identificação pode ser ampliada graças ao aperfeiçoamento de técnicas da biologia molecular e equipamentos modernos que auxiliam na perfeita identificação dos espécimes adultos e do material genético contido nos imagos.

O objetivo desse estudo é ampliar a coleta de diferentes exemplares de dípteros necrófagos na capital, já realizada inicialmente no ano anterior. Além da capital, neste ano faz parte de nossos objetivos a obtenção de exemplares de insetos necrófagos do litoral e interior de São Paulo. Será realizado a classificação desses dípteros e também sua eficiência de metodologias para obtenção de DNA dos diferentes estágios dos insetos coletados.

## **Metodologia**

### **Coleta, preservação e identificação**

As espécies de dípteros que fizeram parte desse estudo foram coletados em armadilha adaptada do modelo proposto por Ferreira<sup>5</sup> na região Litoral Sul de São Paulo no período de Junho de 2013, região metropolitana de São Paulo no período de Julho de 2013 e interior de São Paulo no período de Setembro de 2013.

As armadilhas foram confeccionadas com garrafa PET e as iscas utilizadas foram peixes. As armadilhas foram distribuídas em diferentes

ambientes de aspectos ecológicos distintos, fixadas de 1 a 10 metros do solo por aproximadamente quinze dias. Entre os períodos de 15 a 20 dias após a colocação das armadilhas, foram realizadas as coletas dos insetos adultos, larvas e pupas na armadilha.

Esses insetos adultos foram identificados por métodos convencionais de diferenciação morfológica, comparando-os com as formas descritas em atlas e livros de Parasitologia, Biologia e Entomologia Forense <sup>6 7</sup>. Algumas pupas foram acondicionadas em potes de coleta para posterior maturação e identificação. As larvas em diferentes estágios também foram devidamente identificadas morfológicamente com o guia on-line de identificação de larvas de insetos dípteros <sup>8</sup>.

### **Extração de Dna pelo Método de Salting-out**

Para a padronização da extração pelo método de *salting-out* foram utilizados larvas, pupa e imago de espécies de dípteros descritos neste trabalho de tamanhos diferentes, devidamente acondicionados em álcool 70%.

Cada exemplar foi macerado em 1000µl de PBS 1X, centrifugados a 10.000 rpm por 2 minutos, sendo pellet conservado a -20°C.

Para a extração adicionou-se ao pellet 600µl de Buffer A e misturou-se até dissolvê-lo totalmente. Após a dissolução, adicionou-se 20µl de SDS 10% e homogeneizou-se a amostra por inversão. Em seguida, adicionou-se 100µl de Pronase E, homogeneizou-se novamente a amostra por inversão, e manteve-se incubada por 20 minutos em temperatura de 60°C.

Após a incubação adicionou-se 100µl de NaCl saturado (5M) e misturou-se vigorosamente por 10 minutos. Em seguida, centrifugou-se a amostra a 10.000 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionou-se 1000µl de EtOH (etanol) absoluto gelado. Após a homogeneização, a amostra foi mantida *overnight* a -20°C para precipitação do DNA.

A amostra foi então, centrifugada em 10 000 rpm por 10 minutos. O EtOH absoluto foi descartado e adicionamos 400µl de EtOH 70% gelado para a

lavagem do pellet de DNA, misturando por inversão de tubos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10 000 rpm por 10 minutos. Após retirada do EtOH, foi realizada a secagem do pellet em estufa 37°C. O pellet de DNA foi ressuspensão em H<sub>2</sub>O Milli-Q estéril. As amostras foram preservadas a 4°C ou -20°C.

As amostras de DNA extraídas pelo método de *salting-out* foram submetidas a análise em espectrofotômetro para verificar a concentração de DNA e sua pureza. O valor de pureza é calculado através da relação Abs260/Abs280 que deve estar entre 1,8 e 2,0. Para valores inferiores a 1,8, considera-se contaminação da amostra e a concentração do DNA em µg/ml é calculada na fórmula ABS260 x FATOR DE DILUIÇÃO x FATOR CONSTANTE (50).

Realizado a eletroforese em gel de agarose a 0,8% das amostras de DNA obtidas e observou-se o perfil eletroforético em transluminador de luz UV<sup>3</sup>.

## Resultados

### Coleta e identificação morfológica

Após a coleta e triagem por coloração, tamanho e morfologia dos insetos necrófagos, foi realizado uma análise taxonômica e identificaram-se cinco famílias diferentes de dípteros na fase larval, pupa e imago, sendo eles: *Sarcophagidae*, *Calliphoridae*, *Muscidae*, *Fanniidae* e *Drosophilidae*, observou-se também que a espécie *Calliphoridae* tem preferência por altitude baixa, sendo sua coleta em grande quantidade, comparado com as armadilhas colocadas mais distantes do solo, onde sua coleta foi em menor quantidade.

Foram realizadas 5 coletas em datas, regiões e temperaturas diferentes. Obtivemos na região metropolitana, no mês de Agosto de 2011, larvas e imago de *Muscidae* em armadilha exposta numa altura maior (2 metros) em comparação as colocadas próximo ao solo (0,5 metro) e com temperatura baixa devido a estação do ano.

Em Setembro de 2011 foi realizada outra coleta, encontrando pupas e larvas de *Calliphoridae* em armadilha colocada próximo ao solo (0,5 metro)

com temperatura do ambiente mais baixa devido a estação do ano. Em Abril de 2012, foi encontrado após as coletas, larvas, pupas e imagos de *Sarcophagidae* em predominância e maiores quantidades em relação a coletas anteriores e armadilha também exposta em altura de 2 metros, porém com temperatura do ambiente mais quente. Em Julho de 2013 foi coletada larvas e imagos de *Calliphoridae* em grande quantidade, em armadilha exposta próximo ao solo e com temperatura baixa devido ao inverno e larvas e imagos de *Fanniidae* que raramente são encontrados em coletas. No litoral norte de São Paulo em Junho de 2013 foi coletado larvas, pupas e imagos de *Sarcophagidae*, com temperatura do ambiente mais baixa (cerca de 17<sup>o</sup>C) e pupas e imago de *Drosophilidae* que, raramente são encontrados em coletas realizadas com matéria orgânica em decomposição.

### **Extração de DNAg das larvas de dípteros**

Para a padronização da extração do DNA pelo método de *salting-out* foi utilizado larvas, pupa e inseto adulto dos espécimes *Sarcophagidae*, *Muscidae* e *Calliphoridae* devidamente identificados e acondicionados em álcool 70%. As amostras foram ressuspensas em H<sub>2</sub>O Milli-Q estéril e analisada em espectrofotometria para verificar a concentração de DNA e sua pureza. Foi possível obter amostras de DNA dos insetos analisados pela metodologia de *salting-out*, que é simples e de fácil manipulação. As amostras analisadas foram viáveis quantitativamente e qualitativamente.

### **Discussão**

O protocolo utilizado para a extração foi eficaz para o experimento, sendo também uma metodologia de baixo custo, sendo o mesmo simples e também de fácil manipulação, não contaminando o manipulador.

O método de *Salting out*, descrito nesse trabalho foi adaptado para a extração de DNA desses dípteros necrófagos em interesse forense.

## Conclusão

As coletas de insetos necrófagos em condições climáticas diferentes e locais diferentes do Estado de São Paulo entre os anos de 2011 e 2013, revelou diversidade de espécies, com a frequência de representantes das Famílias *Muscidae*, *Calliphoridae* e *Sarcophagidae*. Duas novas Famílias foram identificadas nas coletas deste ano (2013), *Drosophilidae* e *Faeniidae*.

O protocolo de extração com clorofórmio/fenol ou *kits* necessitam de um tempo maior para a execução, um alto custo para o laboratório além de utilizarem substâncias tóxicas, o que oferece um risco para nosso organismo diferente da extração com NaCl que usa um protocolo simples, com substâncias de fácil acesso e manipulação, não contaminante é que não oferece risco para nosso organismo.

A identificação baseada no DNA depende de um protocolo elaborado para uma eficiência na extração com qualidade das amostras e que evitem falsos resultados, desperdiçando assim material.

A técnica proposta nesse estudo para a obtenção do material genético, mostrou-se válida para a extração das larvas *Chrysomya spp* e *Sarcophaga spp* de 10mm a 13mm. Provavelmente esse resultado se deu pela quantidade de células e proteínas que o imaturo possui na sua fase larval mais avançada.

A metodologia de *salting-out* que é simples, de fácil manuseio e de baixo custo mostrou que é possível sua utilização na Entomologia Molecular Forense, associada a diversas técnicas moleculares na identificação de insetos imaturos ou espécies desmembradas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Benecke M. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) typing of necrophagous insects (diptera, coleoptera) in criminal forensic studies: validation and use in practice. *Forensic Science Internacional*. 98, 157-168.
2. Pujol-Luz JR, Arantes LC, Constantino R. Cem anos da Entomologia Forense no Brasil (1908-2008). *Revista Brasileira de entomologia*. 2008, 52, (4): 485-492.

3. Thyssen PJ. As aplicações do DNA na entomologia forense e no contexto legal. *Biológico* 2008; 70 ( 2): 49-50.
4. Garcia Dr; Brito VN. Análise Entomológica Forense de algumas espécies de insetos necrófagos (adultos e larvas) de São Paulo, SP. 11º Congresso de Iniciação Científica, 2011.
5. Guimaraes RR. Armadilhas usadas para coleta de dípteros muscóides (insecta: diptera). *Bol. S.E.A* (33): 281-283.
6. Rey L. Dípteros ciclorrafos: As moscas. *Bases da Parasitologia Médica*. 2ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, p. 296-303 .
7. Oliveira Costa J. Entomologia Forense: quando os insetos são vestígios. 3ª ed. Campinas: Editora Millenium155 p.
8. Pinho LC. Diptera. *In: Guia on-line: Identificação de larvas de Insetos Aquáticos do Estado de São Paulo*. Froehlich CG. Disponível em: [http://sites.ffclrp.usp.br/aguadoce/Guia\\_online/index.htm](http://sites.ffclrp.usp.br/aguadoce/Guia_online/index.htm).





Figura. 1 Modelo de armadilha proposto por Ferreira (1978 apud AMAT, 2010) para captura de dípteros, modificado por GARCIA & BRITO (2011).

Fonte: Arquivo Pessoal

Adulto1   Adulto2   Larva 1   Larva2   Pupa1   Pupa2   Dna Lambda

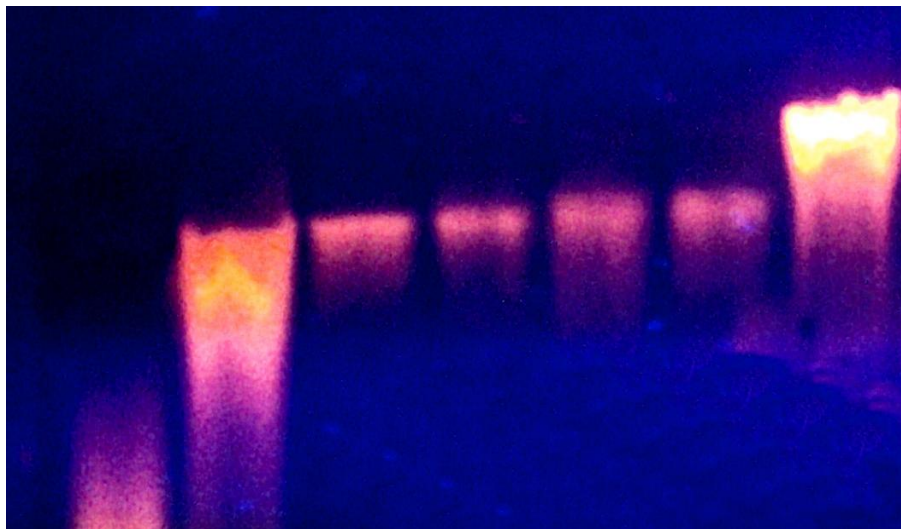


Figura. 2 Eletroforese em gel de agarose 0,8% das amostras de DNA obtidas e observou-se o perfil eletroforético em transluminador de luz UV.

Fonte: Arquivo Pessoal