

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
MUSEU NACIONAL**

RECUPERAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE DNA HUMANO Y-STR, *IN VITRO* E *IN SITU*, A PARTIR DE IMATUROS DE DUAS ESPÉCIES DE CALLIPHORIDAE (INSECTA: DIPTERA) DE IMPORTÂNCIA FORENSE

Carlos Augusto Chamoun do Carmo

Rio de Janeiro

2014

RECUPERAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE DNA HUMANO Y-STR, *IN VITRO* E *IN SITU*, A PARTIR DE IMATUROS DE DUAS ESPÉCIES DE CALLIPHORIDAE (INSECTA: DIPTERA) DE IMPORTÂNCIA FORENSE

Carlos Augusto Chamoun do Carmo

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Zoologia), Museu Nacional, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Orientadoras: Prof. Dra. Márcia Souto Couri
Prof. Dra. Janyra Oliveira Costa

Banca examinadora:

Prof. Dra. Márcia Souto Couri (Orientadora e Presidente)

Prof. Dra. Selma Lilian Sallenave Sales

Prof. Dr. Rodrigo Grazinoli Garrido

Prof. Dra. Valéria Cid Maia

Prof. Dr. Leandro Barbosa

Rio de Janeiro
Outubro de 2014

CHAMOUN, Carlos Augusto.

Recuperação e Identificação de DNA Humano Y-STR, a Partir de Imaturos de Duas Espécies de Calliphoridae (Insecta: Diptera) de Importância Forense / Carlos Augusto Chamoun do Carmo. Rio de Janeiro: UFRJ/ MN, 2014.

-

Orientador: Márcia Souto Couri.

Tese (Doutorado). UFRJ /MN/Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Zoologia), 2014.

Referências Bibliográficas: f. 76-88.

1. Crimes Sexuais. 2. Estupro. 3. Homicídio. 4. Perícia Criminal. 5. Entomologia Forense
6. Genética Forense 7. Provas Materiais. I. Couri, Márcia Souto. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Museu Nacional. III. Teses.

DEDICO

Aos meus queridos pais (Maria Auxiliadora e Ualquer), à Luciana, amor da minha vida, e aos filhos que ela me deu: Lucas, Ítalo e João. Dedico, com todo amor e carinho que posso ter.

Às inúmeras vítimas de estupro seguido de morte no Brasil, a maioria delas sem que houvesse a devida justiça, pela falta de provas, consequência da péssima e arcaica gestão pública brasileira, além do ainda escasso investimento do poder público na Polícia Técnica e Científica desse país.

“Quaisquer que sejam os passos, quaisquer objetos tocados por ele, mesmo que inconscientemente, servirá como uma testemunha silenciosa contra ele. Não apenas pegadas ou dedadas, mas o seu cabelo, as fibras de suas calças, os vidros que ele porventura quebre, a marca da ferramenta deixada, a tinta que ele arranhe, o sangue ou sêmen que deixe. A evidência física não pode estar errada, não pode cometer perjúrio por si própria, não se pode tornar ausente. Cabe aos humanos, procurá-la, estudá-la e compreendê-la, apenas os humanos podem diminuir o seu valor.”

Edmond Locard (1877 – 1966).

AGRADECIMENTOS

A Deus, pois apesar de não ser religioso, acredito na existência divina sob a forma da bondade, justiça e amor, como demonstrado pelo senhor Francisco Cândido Xavier.

A minha mãezinha querida (a Vovote dos meus filhos e do Ruan, meu sobrinho), meu primeiro grande amor, que criou sua prole com sacrifício e dificuldades, sem perder a alegria e o bom humor, suas marcas inconfundíveis.

A meu pai, pelos bons conselhos, pelo exemplo de honestidade e integridade que, felizmente, procuro seguir.

A minha linda esposa e eterna namorada, Luciana, meu amor há mais de 20 anos, que compartilhou comigo tantas vitórias (e algumas derrotas, claro), além de ter gerado três das maiores conquistas da minha vida, meus filhos Lucas, Ítalo e João, que amo mais que a mim mesmo. A composição genética dela, sem dúvida, foi a principal responsável para que os moleques fossem tão lindos.

Aos meus filhos queridos, simplesmente, por existirem.

À Walkíria (Quilinha), minha irmã caçula, que amo muito, madrinha do meu primeiro filho, pela boa convivência e por ser alguém tão especial para mim.

A minha sogra, Neli Barbosa, por ter me dado sua filha (é óbvio) e por ser uma avó maravilhosa, cheia de cuidados com nosso “Janjão” (João), caçulinha da casa.

À querida Professora Titular da UFRJ/MN, autora de dezenas e dezenas de artigos científicos, Dra. Márcia Souto Couri, por ter sido uma excelente orientadora e professora, ratificando minha ideia de que competência e arrogância não precisam andar de mãos dadas. Seus três pós-doutorados (em três países diferentes) nunca impediram que sempre tomássemos um café e ríssemos de uma boa piada juntos.

A todos os colegas do maravilhoso laboratório de Diptera do Museu Nacional da UFRJ, chefiado pela Márcia Couri, em especial aos alunos Mingau, Sharlene, Viviani e Francisco e à Professora Valéria, pela ajuda, alegria e amizade.

À Professora da UFRJ/MN, Dra. Cátia Antunes de Mello Patiu, pelas aulas e seminários maravilhosos, pela amizade e alegria contagiante.

À querida Perita Criminal do RJ e Professora Universitária, Dra. Janyra Oliveira Costa, autora de livros, artigos e laudos, pelas ideias iniciais que ajudaram a inspirar essa tese, e pela excelente orientação nas etapas entomológicas do meu experimento, em parceria com a Dra. Márcia Couri. Janyra e sua história servem de inspiração para qualquer pessoa, estudante ou não.

A todos os (ex) estagiários do Laboratório de Entomologia Forense, chefiado pela Janyra, especialmente Karla, Diego, Allan, Thiago, Elena, Tati, Munchen, pela ajuda nas coletas das larvas e pela amizade.

Ao amigo, Perito Criminal do RJ e agora também Professor da UFRJ, Dr. Rodrigo Grazinoli Garrido, pela ótima orientação nas etapas moleculares, tendo contribuição crucial desde o início dessa pesquisa (em 2010), por ter aberto as portas do Instituto de Pesquisas e Perícias em Genética Forense (IPPGF), da PC do RJ, do qual ele é Diretor, onde todas as análises moleculares, dos experimentos no Brasil (*in vitro* e *in situ*), foram executadas.

A todos os colegas do IPPGF, pela ajuda, amizade e ótimo clima de trabalho, em especial aos Peritos Criminais Nádia, Sandra (e seu marido, Agnaldo), Selma, Marcelinho, Tati, Rosi, Cátia, Priscila, Alípio, Artur e Carol; aos Técnicos de Laboratório Marcel, Davi e Mônica; e à Inspectora de Polícia Fátima.

Aos Professores Dr. Iuri Drumond Louro, da UFES, e Dr. Rodrigo Moura Neto, da UFRJ, pela amizade e sugestões valiosas sobre a etapa molecular dessa pesquisa.

Aos queridos estagiários e orientandos Diego, Jéssica, Paula, Tom (da FAESA) e Juliana (da UVV), pela ajuda nos testes *in situ*, realizados no CFA da PM do ES, e pela amizade.

Aos colegas que cursaram disciplinas no Museu Nacional da UFRJ comigo, em especial à Bárbara, Guaraci e Alene, por estarmos juntos em todos os semestres letivos, pela ajuda e amizade, fazendo das aulas um momento bem mais divertido.

Ao pessoal da Secretaria do Programa de Pós-graduação em Zoologia (PPGZoo), em especial à Anete, ao Luiz e à Sônia, pela ajuda e amizade.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio de Janeiro – FAPERJ, pelo apoio na compra dos kits Y-STR, que foram usados nas etapas moleculares desenvolvidas no Brasil.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo – FAPES, pelas bolsas de doutorado.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do ES - IFES, principalmente aos servidores do campus de Venda Nova do Imigrante, em especial aos diretores: Carnielli e Patrícia Feitosa; aos pedagogos: Graça e Dable; aos professores: Bernardo, Luiz Fernando, Fabiano Caliman, Roberta Checheto, Raquel Xavier, Sônia, Liliani, Admildo, Sidney, Robinho e Cezar; aos servidores administrativos, em especial Alcione, Carla, Everton, Eliane, Elaine, Fabíola; e todo o pessoal do apoio e limpeza, pela ajuda e amizade.

Aos Delegados de Polícia Civil do ES, André dos Reis Neves, ex-chefe de Polícia, e Joel Lírio, atual chefe, pela ajuda para conseguir reverter minha absurda licença sem remuneração em licença remunerada, concedida quase um ano e meio após o início desse doutorado. E ao delegado Guilherme Daré, pela ajuda, cedendo munições para o sacrifício do animal experimental (nos testes *in situ*) e pela amizade.

À Polícia Civil do ES pela ajuda financeira, ainda que tardia, concedendo a licença remunerada (sem escala especial) após quase um ano e meio do início do meu afastamento sem remuneração.

À Polícia Civil do RJ que, diferentemente da Polícia Civil do meu Estado, apoiou desde o início essa pesquisa, abrindo as portas do Instituto Médico Legal, Laboratório de Entomologia Forense e IPPGF (DNA Forense) para os experimentos desse doutorado.

A todos os colegas do Departamento de Criminalística – DEC – do ES e das regionais, em especial aos Peritos Criminais: Clertes, Eduardo, Antônio Carlos, Mutz, Carlos Leo, Fernanda, Dalcin, Adybio, Sheila, Marvila, Trancoso, André (e sua esposa), João Rodrigues, Renato, Marcelo Seixas e Liliane, pela ajuda e amizade.

Aos Peritos Criminais lotados na regional sul (da minha época), Régis, Fabianne, Vinícius Médici e Roberta (*in memoriam*), pelas trocas de plantão (quando eu estava fazendo o projeto de doutorado, em 2009), e por terem compartilhado comigo, por mais de três anos, o descaso absurdo do poder público capixaba com o principal órgão produtor de provas.

Ao meu “amigo-irmão” e compadre (padrinho do Ítalo), Policial Militar do Rio de Janeiro, honesto (como a maioria dos policiais na verdade são), músico e compositor talentoso, Márcio Furtado dos Santos, pela amizade de quase 30 anos e pela estadia semanal, no período das disciplinas do doutorado. Compartilhamos a paixão por motos, belas músicas e uma boa cerveja, regada a conversas fiadas e lembranças engraçadas das nossas vidas.

A minha comadre querida, trabalhadora e guerreira, Tânia Siqueira, esposa do Márcio, pela amizade e ajuda, sendo sempre receptiva e agradável com os amigos, além de cuidar bem do meu compadre e dos filhos que eles têm: Rodrigo, Gabriela e Ana Clara.

À querida Lena, que trabalha há anos com a família da Tânia, pela amizade e por ter preparado sempre um jantar semanal especial para mim, durante o tempo em que cursei as disciplinas no Museu Nacional da UFRJ.

À dona Lúcia, mãe da Tânia, e toda sua maravilhosa família, pela amizade e excelente convívio, além das conversas interessantes sobre espiritualidade.

Ao senhor Alfredo e Dona Cléa (e toda a família), pais do Márcio, pela longa amizade e pela ajuda, durante os anos de ensino médio (no GPI) e faculdade (na UERJ), momentos difíceis, mas também maravilhosos. Fazem e Farão parte da minha vida para sempre.

Ao Sílvio, do setor de informática do Museu Nacional, pela ajuda e amizade, além de compartilhar comigo a paixão, quase irracional, pelas motos.

Ao Paulo, da TAM, pela amizade e por me ajudar a conseguir passagens mais baratas para os EUA. Ao lutador profissional de MMA, Rodrigo Damn, pela amizade e por ter me apresentado ao Paulo.

Aos amigos da Torre 2 do American Towers, especialmente à Patrícia (*in memoriam*) e Valter (meus compadres queridos do apto. 303, padrinhos do Janjão), à Rita (do apto. 803), Tetê e Carlos (do apto. 1603), Luzinete e Marcos Paixão (do apto. 703), e Paulo Roberto e Carol (do apto 402), pela amizade e por serem pessoas maravilhosas, engraçadas e felizes.

À Geovana Santos, minha professora de inglês e amiga, pela ajuda e amizade.

Ao Geraldo e Tião, pela ajuda na estadia em Miami, durante a maior parte do tempo da minha pesquisa desenvolvida nos EUA.

A todos os Peritos Criminais americanos do Crime Laboratory (Miami Dade Police), em especial a Jeffrey Johnson (chefe do Crime Lab) e Victor Murilo (simpatia em pessoa), do setor de DNA Forense, pela amizade e ajuda nas análises moleculares realizadas nos EUA. Ao Perito Médico-legista do RJ, Luiz C. Prestes, e ao Professor Cláudio, do Departamento de Química da UFRJ, pela ajuda com os contatos, antes da minha ida aos EUA.

A todos do Medical Examiner de Miami (Equivalente ao nosso IML), pela excelente recepção, em especial ao Dr. Hyma (chefe do Medical Examiner) e seu assessor direto, senhor Cameron, pela ajuda inicial, na primeira semana em que cheguei aos EUA.

A todos do Laboratory of Forensic Entomology, of Department of Biological Science, of the Florida International University (FIU), em especial ao Professor Dr. Jeffrey Wells, chefe desse laboratório, e aos estudantes Lili, Josh e Fanchen, pela ajuda, paciência e amizade, durante todo o período da etapa entomológica nos EUA.

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para que essa tese de doutorado pudesse se concretizar. São tantas pessoas que ajudam a moldar nossas vidas, que talvez seja impossível citar todas elas. Afinal, somos o que vivemos e o que conhecemos.

RESUMO**RECUPERAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE DNA HUMANO Y-STR, *IN VITRO* E *IN SITU*, A PARTIR DE IMATUROS DE DUAS ESPÉCIES DE CALIPHORIDAE (INSECTA: DIPTERA) DE IMPORTÂNCIA FORENSE**

Carlos Augusto Chamoun do Carmo

Orientadores: Márcia Souto Couri e Janyra Oliveira Costa

Resumo da Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Zoologia) do Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Zoologia).

Todos os dias, no Brasil e no mundo, diversas pessoas são vítimas de crimes sexuais, principalmente mulheres. Muitas delas são estupradas e mortas, sendo seus corpos encontrados dias após o crime, já em estado de decomposição, o que dificulta ou praticamente inviabiliza a perícia criminal materializar provas contra o estuprador. O presente estudo avaliou a possibilidade, *in vitro* e *in situ*, de recuperação e identificação de DNA Y-STR humano a partir do trato digestivo de imaturos (larvas e pupas) de duas espécies de moscas de grande interesse forense, ambas da família Calliphoridae: *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819) e *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794). Trata-se, portanto, de uma simulação de análise pericial, em casos de estupro e assassinato da vítima, encontrada decomposta. Utilizou-se, nos testes *in vitro*, 600g de carne moída com 3,0 mL de sêmen e nos testes *in situ* foi inoculada a mesma quantidade de sêmen na região anal e vaginal de uma porca de 15,0 kg, da espécie *Sus scrofa* (Linnaeus, 1758), logo após o abate. As coletas de imaturos foram feitas a cada 24h de decomposição. Os resultados obtidos demonstraram que a recuperação e identificação de DNA foi possível, mesmo nos casos de decomposição avançada. A técnica desenvolvida nessa pesquisa poderá servir de base para a formação de um Procedimento Operacional Padrão (POP), para ser aplicado nos órgãos periciais criminais, materializando provas cruciais que, atualmente, são negligenciadas. Isso auxiliará de forma decisiva na condenação de culpados, retirando-os das ruas, e libertação de suspeitos inocentes.

Palavras-chave: crimes sexuais, estupro, homicídio, perícia criminal, entomologia forense, genética forense, provas materiais.

Rio de Janeiro
Outubro de 2014

ABSTRACT**RECOVERY AND IDENTIFICATION OF HUMAN DNA Y-STR, *IN VITRO*
AND *IN SITU*, FROM TWO SPECIES OF IMMATURE CALLIPHORIDAE
(INSECTA: DIPTERA) OF FORENSIC IMPORTANCE**

Carlos Augusto Chamoun do Carmo

Adivisors: Márcia Souto Couri e Janyra Oliveira Costa

Abstract of Thesis submitted to the Graduate Program in Biological Sciences (Zoology) from the National Museum, Federal University of Rio de Janeiro - UFRJ, as Requirements for obtaining the degree of Doctor of Biological Sciences (Zoology).

Every day, in Brazil and around the world, many people are victims of sexual crimes, mainly women. Many are raped and killed, and their bodies found days after the crime, already decomposed, making it difficult or almost impossible to materialize Forensic evidence against the rapist. This study evaluated the ability, in vitro and in situ recovery and identification DNA human Y-STR from immature digestive tract (larvae and pupae) of two species of flies of great forensic interest, both of the family Calliphoridae: *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819) and *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794). It is, therefore, a simulation expert analysis, in cases of rape and murder victim found decomposed. It was used in in vitro tests, 600g of ground beef with 3.0 mL of semen and testing in situ was inoculated the same amount of semen anal and vaginal region a nut 15.0 kg of the species *Sus scrofa* (Linnaeus, 1758), immediately after the slaughter. The immature collections were made every 24h decomposition. The results showed that the recovery and identification of DNA was possible even in cases of advanced decay. The technique developed in this research can serve as a basis for the formation of a Standard Operating Procedure (SOP) to be applied in criminal forensic agencies, materializing crucial evidence that currently are neglected. This will help decisively in the conviction of guilty, removing them from the streets and release of innocent suspects.

Keywords: sex crimes, rape, homicide, Criminal Expertise, forensic entomology, forensic genetics, proves.

Rio de Janeiro
October of 2014

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiv – xix
ÍNDICE DE QUADROS.....	xx - xx
ÍNDICE DE TABELAS.....	xxi – xxii
1. INTRODUÇÃO.....	1 – 4
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	5 – 21
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	22 – 49
4. RESULTADOS.....	50 – 62
5. DISCUSSÃO.....	63 – 73
6. CONCLUSÕES.....	74 – 75
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76 – 88
APÊNDICE A.....	89 – 102
APÊNDICE B.....	103 – 117

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Os 13 <i>loci</i> de STR, em seus respectivos cromossomos humanos, empregados pelo <i>Combined DNA Index System (CODIS)</i> do <i>Federal Bureal of Investigation (FBI)</i>	14
Figura 2.	Cromossomos sexuais humanos: X (a) e Y (b).....	15
Figura 3.	Estrutura do cromossoma Y, com os braços curto (<i>p</i>) e longo (<i>q</i>), regiões de recombinação genética (PAR1 e PAR2) e localização dos Y-STRs utilizados na área forense.....	17
Figura 4.	Larva (a) e adulto (b) de <i>Chrysomya albiceps</i>	22
Figura 5.	<i>Sus scrofa</i> abatido com disparos de arma de fogo.....	23
Figura 6.	Dípteros Calliphoridae pousando na carcaça, do porco doméstico <i>Sus scrofa</i> , poucos minutos após a morte do animal.....	23
Figura 7.	Larva (a) e adulto (b) de <i>Chrysomya megacephala</i>	24
Figura 8.	Gaiola entomológica para a criação de <i>Chrysomya albiceps</i> (a), nos experimentos realizados no Brasil, e <i>Chrysomya megacephala</i> (b), no experientos realizados nos EUA.....	24
Figura 9.	Potes de plástico, do experimento <i>in vitro</i> com carne moída bovina (e sêmen), para oviposição de <i>C. albiceps</i> (a) e <i>C. megacephala</i> (b).....	25
Figura 10.	Pote plástico usado especificamente para a postura de ovos (indicados pela seta) das moscas da espécie <i>C. megacephala</i>	26
Figura 11.	Potes de plástico no interior da gaiola, para postura de <i>C. albiceps</i>	26

Figura 12.	Um dos potes do experimento <i>in vitro</i> no Brasil, após 8 dias (192h) de decomposição, observando-se, nas figuras “a” e “b”, grande desenvolvimento de imaturos.....	27
Figura 13	Preservação dos imaturos de <i>C. albiceps</i> (a) e <i>C. megacephala</i> (b) em álcool 70%.....	27
Figura 14.	Dissecação ventral e antero-posterior de imaturos de <i>C. albiceps</i> (a) e <i>C. megacephala</i> (b, no círculo vermelho).....	28
Figura 15.	Frascos com as vísceras de <i>C. albiceps</i> , (em álcool 70%) (a) e <i>C. megacephala</i> . (em tampão de extração) (b).....	29
Figura 16.	DNA na fase aquosa da extração orgânica.....	30
Figura 17.	Quantificador de DNA Gene Quant.....	32
Figura 18.	Termociclador GeneAmp PCR System 9700® (a) e programação térmica para Y-filer (b).....	34
Figura 19.	Aparelho ABI 3100, usado para eletroforese capilar.....	34
Figura 20.	Equipamento EZ1 Advanced XL, da Qiagen.....	36
Figura 21.	Tubos de 2,0 mL, específico para o uso no equipamento EZ1 Advanced XL (Qiagen), referente ao 6º dia de decomposição.....	37
Figura 22.	Equipamento 7500 Real Time PCR System (Life Technologies), usado no Crime Laboratory do Miami Dade Police para quantificação de DNA Y humano.....	37
Figura 23.	Tubos de Microcon (Centrifugal Filter Devices), com membrana	

filtradora.....	39
Figura 24. Desenho esquemático do funcionamento do Microcon para concentração de DNA.....	40
Figura 25. Inoculação de 3,0 mL de sêmen humano no animal da espécie <i>Sus scrofa</i> ...	42
Figura 26. Jaula de metal sobre a carcaça.....	43
Figura 27. Identificação durante as coletas, especificando cada dia de decomposição....	44
Figura 28. Kit DNA IQ, da Promega	47
Figura 29. Eletroferograma, com perfil Y-STR (16 locais) da amostra de referência usada para os testes <i>in vitro</i> e <i>in situ</i> , nos experimentos efetuados no Brasil e nos EUA.....	91
Figura 30. Eletroferograma, com perfil Y-STR da amostra 48h (2º dia de decomposição), do experimento <i>in vitro</i> no Brasil, mostrando a amplificação dos locais DYS389 I (14), DYS385 (15), DYS393 (14), DYS391 (10), DYS437 (15).....	92
Figura 31. Eletroferograma, com perfil Y-STR da amostra 72h (3º dia de decomposição), do experimento <i>in vitro</i> no Brasil, mostrando a amplificação dos locais DYS456 (16), DYS458 (15), DYS393 (14), DYS635 (22), DYS437 (15), DYS438 (8), DYS448 (20).....	93
Figura 32. Eletroferograma, com perfil Y-STR da amostra 96h (4º dia de decomposição), do experimento <i>in vitro</i> no Brasil, mostrando ausência de amplificação genética.....	94
Figura 33. Eletroferograma, com perfil Y-STR da amostra 120h (5º dia de decomposição), do experimento <i>in vitro</i> no Brasil, mostrando a	

- amplificação dos locais DYS456 (16), DYS389 I (14), DYS390 (23), DYS458 (15), DYS393 (14), DYS391 (10), DYS635 (22), GATA H4 (11), DYS437 (15), DYS438 (8), DYS448 (20)..... 95
- Figura 34. Eletroferograma, com perfil Y-STR da amostra 144h (6° dia de decomposição), do experimento *in vitro* no Brasil, mostrando a amplificação dos locais DYS456 (16), DYS389 I (14), DYS390 (23), DYS458 (15), DYS385 (15), DYS393 (14), DYS391 (10), DYS439 (12), GATA H4 (11), DYS437 (15), DYS438 (8)..... 96
- Figura 35. Eletroferograma, com perfil Y-STR da amostra 168h (7° dia de decomposição), do experimento *in vitro* no Brasil, mostrando ausência de amplificação genética..... 97
- Figura 36. Eletroferograma, com perfil Y-STR da amostra 192h (8° dia de decomposição), do experimento *in vitro* no Brasil, com a amplificação dos locais DYS456 (16), DYS389 I (14), DYS389 II (30), DYS385 (15), DYS458 (15), DYS393 (14), DYS391 (10), DYS439 (12), DYS392 (12), GATA H4 (11), DYS437 (15), DYS438 (8), DYS448 (20)..... 98
- Figura 37. Eletroferograma, com perfil Y-STR da amostra 72h (3° dia de decomposição), do experimento *in vitro* nos EUA, mostrando a amplificação dos locais DYS456 (16), DYS389 I (14), DYS390 (23), DYS389 II (30), DYS458 (15), DYS19 (16), DYS385 (15), DYS393 (14), DYS391 (10), DYS439 (12), DYS635 (22), DYS392 (12), GATA H4 (11), DYS437 (15), DYS438 (8), DYS448 (20)..... 99
- Figura 38. Eletroferograma, com perfil Y-STR da amostra 120h (5° dia de decomposição), do experimento *in vitro* nos EUA, mostrando a amplificação dos locais DYS456 (16), DYS389 I (14), DYS390 (23), DYS389 II (30), DYS458 (15), DYS19 (16), DYS385 (15), DYS393 (14), DYS391 (10), DYS439 (12), DYS635 (22), DYS392 (12), GATA H4 (11),

	DYS437 (15), DYS438 (8), DYS448 (20).....	100
Figura 39.	Eletroferograma, com perfil Y-STR da amostra 168h (7° dia de decomposição), do experimento <i>in vitro</i> nos EUA, mostrando a amplificação dos locais DYS456 (16), DYS389 I (14), DYS390 (23), DYS458 (15), DYS19 (16), DYS385 (15), DYS393 (14), DYS391 (10), DYS392 (12), GATA H4 (11), DYS437 (15), DYS438 (8), DYS448 (20).....	101
Figura 40.	Eletroferograma, com perfil Y-STR da amostra 216h (9° dia de decomposição), do experimento <i>in vitro</i> nos EUA, mostrando a amplificação dos locais DYS458 (15), DYS393 (14), DYS391 (10), DYS635 (22), DYS437 (15).....	102
Figura 41.	Eletroferograma, com perfil Y-STR da amostra 144h (6° dia de decomposição), do experimento <i>in situ</i> no Brasil, mostrando a amplificação do local DYS456 (16).....	105
Figura 42.	Eletroferograma, com perfil Y-STR da amostra 144h (6° dia de decomposição), do experimento <i>in situ</i> no Brasil, mostrando a amplificação do local DYS458 (15).....	106
Figura 43.	Eletroferograma, com perfil Y-STR da amostra 168h (7° dia de decomposição), do experimento <i>in situ</i> no Brasil, mostrando a amplificação do local DYS456 (16).....	107
Figura 44.	Eletroferograma, com perfil Y-STR da amostra 168h (7° dia de decomposição), do experimento <i>in situ</i> no Brasil, mostrando a amplificação do local DYS458 (15).....	108
Figura 45.	Eletroferograma, com perfil Y-STR da amostra 192h (8° dia de decomposição), do experimento <i>in situ</i> no Brasil, mostrando a amplificação do local DYS456 (16).....	109

Figura 46.	Eletroferograma, com perfil Y-STR da amostra 192h (8° dia de decomposição), do experimento <i>in situ</i> no Brasil, mostrando a amplificação do local DYS392 (12).....	110
Figura 47.	Eletroferograma, com perfil Y-STR da amostra 216h (9° dia de decomposição), do experimento <i>in situ</i> no Brasil, mostrando a amplificação do local DYS635 (22).....	111
Figura 48.	Eletroferograma, com perfil Y-STR da amostra 240h (10° dia de decomposição), do experimento <i>in situ</i> no Brasil, mostrando a amplificação do local DYS456 (16).....	112
Figura 49.	Eletroferograma, com perfil Y-STR da amostra 240h (10° dia de decomposição), do experimento <i>in situ</i> no Brasil, mostrando a amplificação do local DYS458 (15).....	113
Figura 50.	Eletroferograma, com perfil Y-STR da amostra 240h (10° dia de decomposição), do experimento <i>in situ</i> no Brasil, mostrando a amplificação do local DYS439 (12).....	114
Figura 51.	Eletroferograma, com perfil Y-STR da amostra 288h (12° dia de decomposição), do experimento <i>in situ</i> no Brasil, mostrando a amplificação do local DYS389I (14).....	115
Figura 52.	Eletroferograma, com perfil Y-STR da amostra 312h (13° dia de decomposição), do experimento <i>in situ</i> no Brasil, mostrando a amplificação do local DYS385 (15).....	116
Figura 53.	Eletroferograma, com perfil Y-STR da amostra 336h (14° dia de decomposição), do experimento <i>in situ</i> no Brasil, mostrando a amplificação do local DYS389 II (30) e DY439 (12).....	117

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1.	Y-STRs usados em rotinas forenses, incluídos no AmpF/STRRY filerR PCR amplification.....	18
Quadro 2.	Cálculo dos volumes usados para PCR de Y-Filer®	33
Quadro 3.	Ciclo Térmico para PCR de Y-Filer®	33
Quadro 4.	Cálculo dos volumes usados para a eletroforese capilar no ABI 3100 Genetic Analyser.....	35
Quadro 5.	Quantificação de DNA humano, realizada nos EUA, com Quantifiler Duo Human Male™ DNA.....	38

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.	Temperatura (em graus Celsius), mínima e máxima, e umidade relativa do ar (em %), mínima e máxima, nos dias de decomposição do experimento <i>in vitro</i> no Brasil.....	89
Tabela 2.	Quantidade de larvas e pupas coletadas, no experimento <i>in vitro</i> no Brasil, até o oitavo dia de decomposição.....	50
Tabela 3.	Resultados da quantificação de DNA e valores de absorvância da relação 260/280nm e 260/230, indicando presença de inibidores proteicos e fenólicos, respectivamente, em algumas amostras do experimento <i>in vitro</i> no Brasil.....	89
Tabela 4.	Perfis haplotípicos de Y das amostras 48h, 72h, 120h, 144h e 192h, do experimento preliminar <i>in vitro</i> , realizado no Brasil, usando imaturos de <i>C. albiceps</i>	53
Tabela 5.	Temperatura (em graus Celsius), mínima e máxima, e umidade relativa do ar (em %), mínima e máxima, nos dias de decomposição do experimento <i>in vitro</i> nos EUA.....	90
Tabela 6.	Quantidade de larvas e pupas de <i>C. megacephala</i> , coletadas no experimento <i>in vitro</i> nos EUA, até o 14º dia de decomposição.....	55
Tabela 7.	Perfis haplotípicos de Y-STR humano, encontrado nas amostras 72h, 120h, 168h e 216h, do experimento preliminar <i>in vitro</i> nos EUA.....	57
Tabela 8.	Temperatura, mínima e máxima, e umidade relativa do ar, nos dias de decomposição do experimento <i>in situ</i> no Brasil.....	103
Tabela 9.	Quantidade de larvas e pupas de <i>C. albiceps</i> , coletadas no	

experimento <i>in situ</i> no Brasil, até o 14º dia de decomposição.....	60
Tabela 10. Resultados da quantificação de DNA e valores de absorvância da relação 260/280nm e 260/230, indicando presença de inibidores proteicos e fenólicos, respectivamente, em quase todas as amostras do experimento <i>in situ</i> no Brasil, além de uma enorme concentração de DNA.....	104
Tabela 11. Perfis haplotípicos de Y-STR humano, encontrado nas amostras 144h, 168h, 192h, 216h, 240h, 288h, 312h e 336h, do experimento preliminar <i>in situ</i> no Brasil.....	62

1. INTRODUÇÃO

O aumento do conhecimento sobre a recuperação, isolamento e identificação de DNA humano ingerido por larvas de moscas de importância forense pode contribuir para a materialização de provas periciais, principalmente, em casos de crimes sexuais, como o estupro, culminando com a vítima morta e encontrada em estado de decomposição.

Um estudo realizado em 56 países, por uma das mais respeitadas revistas na área de saúde pública do mundo, mostrou que uma em cada 14 mulheres já foi – pelo menos uma vez na vida – vítima de abuso sexual por alguém que não é seu parceiro. O mesmo estudo aponta que existe uma subnotificação desse crime, pois muitas mulheres ainda têm medo de serem responsabilizadas e não têm apoio da família, dos amigos e de serviços públicos (ABRAHAMS *et al.*, 2014).

Além disso, segundo a Organização das Nações Unidas (ONU), a forma mais comum de violência contra a mulher é perpetrada por seu parceiro íntimo. A média mundial de mulheres com 15 anos ou mais que foram atacadas sexualmente por alguém que não é seu parceiro é de 7,2%. Esse estudo recolheu 412 estimativas e foi realizado em parceria com a Organização Mundial de Saúde (OMS), tendo como base pesquisas publicadas entre 1998 e 2011 (ABRAHAMS *et al.*, 2014).

No Brasil, a violência contra a mulher é alarmante. Uma pesquisa de 2013, do Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada (IPEA), estimou que nosso país registrou entre 2009 e 2011 quase 17 mil mortes de mulheres por conflito de gênero, o chamado feminicídio, crime que acontece pelo fato de ser mulher. Em outras palavras, equivale dizer que são, em média, 5.664 mulheres assassinadas de forma violenta por ano ou uma a cada 90 minutos em nosso país (GARCIA *et al.*, 2013).

Dados oficiais, apresentados no último Anuário Brasileiro de Segurança Pública, no final de 2013, mostraram que em 2011 foram registrados 43.869 estupros no país (22,8 a

cada 100 mil habitantes) e, em 2012, esses números foram ainda maiores, com 51.101 notificações desse crime (26,3 por 100 mil habitantes), um aumento de 16,5% em apenas um ano (LIMA e BUENO, 2013). Contudo, em 2013, com base em um questionário sobre vitimização, no âmbito do Sistema de Indicadores de Percepção Social (SIPS), com questões sobre violência sexual, estimou-se que a cada ano no Brasil 527 mil pessoas sofrem violência sexual, dos quais apenas 10% são reportados à polícia, demonstrando a subnotificação dos crimes dessa natureza. Essa mesma pesquisa constatou que, de acordo com fontes do Ministério da Saúde, 88,5% das vítimas de estupro em 2011 foram mulheres e 96,7% dos agressores pertenciam ao sexo masculino (CERQUEIRA e COELHO, 2014).

Comparando-se com a média nacional de casos de estupro, os números do Estado do Rio de Janeiro são ainda piores. Em 2012 foram 6.029 notificações, ou seja, 36,9 por 100 mil habitantes (contra 26,3 no Brasil), o que representou um aumento de 23,8% de estupros, em relação ao ano de 2011. Esses números indicam que ocorrem 17 estupros por dia no Rio de Janeiro, sendo que 82,8% das vítimas são mulheres (TEIXEIRA *et al.*, 2013).

Com relação ao crime de estupro, o Estado de São Paulo apresenta os dados mais assustadores e o número de vítimas não para de crescer. Segundo a Secretaria de Segurança, esse foi o delito que mais aumentou nos últimos anos. De 2005 a 2012 houve um crescimento médio anual de 19,7%, o que significa uma evolução de 230% nesse período, sendo registrados quase 53.000 estupros, ou seja, 128 pessoas estupradas a cada 100.000 habitantes. Em 2012, foram 12.886 vítimas, o que equivale a um estupro a cada 40 minutos, saltando de 10 para 35 estupros por dia em apenas oito anos (GOMES, 2013).

A prova pericial, ou seja, baseada numa análise técnica e científica, torna-se ainda mais importante para a persecução penal quando avaliamos a fragilidade da prova obtida por testemunhas oculares. LINDSAY *et al.* (2004) verificaram que existe a real

possibilidade de ocorrerem intrusões de detalhes entre eventos distintos, ou seja, uma testemunha poderia confundir narrativas de episódios vividos em épocas diferentes. CLARCK e GODFREY (2009) demonstraram que a identificação testemunhal como prova condenatória, nos crimes sexuais, apresenta grandes chances de condenação injusta. De acordo com esses pesquisadores, dentre os principais motivos para a não confiabilidade plena na prova testemunhal, destacam-se: as limitações da memória, principalmente em condições elevadas de stress; mudanças de critérios mentais compensatórios, devido à limitação da memória; e procedimentos policiais tendenciosos, induzindo o reconhecimento de indivíduos inocentes como sendo culpados.

Os dados indicam e é senso comum que a esmagadora maioria das vítimas de violência sexual é do sexo feminino, sendo que a maioria dos autores desse tipo de crime é homem, ou seja, portador do cromossomo Y. Muitas vítimas de estupro têm seus corpos abandonados em local ermo e de difícil acesso, ocorrendo o encontro desses cadáveres dias após o estupro e morte das vítimas, já em estado de putrefação. Para efeito de investigação criminal, à medida que o tempo passa, mais escassos são os vestígios encontrados numa cena de crime.

A experiência pericial demonstra que existe grande dificuldade para se conseguir vestígios de autoria nos casos em que ocorre violência sexual e morte da vítima, principalmente, quando a mesma é encontrada em avançado estado de decomposição. A possibilidade de recuperar e identificar o DNA do cromossomo Y de autores de crimes, por meio do estudo de imaturos de dípteros que se alimentam do cadáver, viabilizaria a materialização de prova de difícil refutação, além de, por outro lado, contribuir para a absolvição de suspeitos, porventura, inocentes.

Desta forma, o objetivo geral dessa pesquisa foi verificar a possibilidade de recuperação e identificação de DNA humano, *in vitro* e *in situ*, pela técnica Y-STR, presente no sêmen humano, após a ingestão desse material por estágios imaturos de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819) e *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794).

Os objetivos específicos desse estudo são: a) avaliar, nas condições desse estudo, o sucesso na amplificação de DNA humano Y-STR, presente no trato digestivo de larvas e pupas de *C. albiceps* e *C. megacephala*; b) contribuir para o desenvolvimento de protocolos específicos na área de entomogenética forense, auxiliando na materialização de provas contundentes contra autores de crimes sexuais. Alcançando os objetivos supracitados, esse estudo poderá contribuir para a execução de exames em entomologia e genética forense (entomogenética forense) da Perícia Criminal e Médico-Legal, além de possibilitar a obtenção de dados que auxiliem na investigação de crimes sexuais, seguidos de morte, com vítima encontrada em estado de decomposição inicial, intermediária e avançada.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Classificação da entomologia forense e insetos mais importantes

A entomologia forense é uma ciência que se ocupa do estudo de insetos e outros artrópodes, relacionando os conhecimentos sobre esses animais a locais de crime ou outras questões judiciais e procedimentos legais (AMENDT *et al.*, 2011).

Podemos classificar a entomologia forense em três tipos distintos: a) urbana, que inclui ações cíveis, envolvendo a presença de imóveis, por exemplo, como na compra de uma residência infestada de cupins; b) produtos estocados, que se responsabiliza pela infestação de produtos alimentares, como o besouro caruncho, muito encontrado no feijão; c) médico-legal, que se refere à área criminal, com maior ênfase à morte violenta, sendo o foco principal desse trabalho de doutorado (LORD e STEVENSON, 1986).

De acordo com DALY *et al.* (1998), podemos classificar os insetos, para fins de estudos na área forense e médico-legal, em quatro categorias ecológicas distintas, sendo: (1) necrófagos, onde os quais adultos e/ou imaturos se alimentam do cadáver em decomposição, como muitos integrantes de Diptera e Coleoptera; (2) onívoros, que retiram nutrientes tanto da carcaça em decomposição quanto da fauna associada a ela, como alguns representantes de Hymenoptera; (3) predadores e parasitas, que utilizam reservas a partir dos insetos necrófagos ou predam representantes da fauna cadavérica, como certos Coleoptera, Diptera, Dermaptera, Hymenoptera, além de alguns tipos de ácaros; e os (4) acidentais, que podem ser encontrados ocasionalmente no cadáver, como alguns colêmbolos, Isopoda terrestre, Diplopoda e Heteroptera.

Os principais grupos de insetos relacionados à decomposição cadavérica pertencem, em sequência de importância, às ordens Diptera, Coleoptera, Lepidoptera e Hymenoptera. A ordem Diptera tem representantes cosmopolitas, encontrados em quase todos os locais

do globo terrestre, com notável diversidade nos climas tropicais e subtropicais (*apud* OLIVEIRA-COSTA, 2011).

Na ordem Diptera, destacam-se na área forense as moscas das famílias Calliphoridae, Sarcophagidae e Muscidae, sendo os califorídeos encontrados em todas as regiões biogeográficas do planeta (CARVALHO e MELLO-PATIU, 2008).

As espécies mais comuns de Calliphoridae são necrófagas têm grande importância forense, fazendo postura de ovos em cadáveres nos diversos estágios de decomposição (VARGAS e WOOD, 2010). Essa família tem se mostrado como a mais representativa dentre todas as que apresentam moscas decompositoras conhecidas atualmente e, conseqüentemente, aquela com maior importância forense (MORETTI, 2006).

Na região Neotropical existem sete subfamílias de califorídeos, totalizando 29 gêneros e 99 espécies, sendo o gênero *Chrysomya* Robineau-Desvoidy 1830 um dos mais importantes na área forense (KOSMANN, 2013). Desde os trabalhos de FREIRE (1914), no Brasil a espécie nativa considerada a mais frequente nos estágios iniciais de decomposição era a *Cochliomyia macellaria* (Fabricius, 1775). Porém, desde meados da década de 1970, com a introdução de três espécies de moscas do Velho Mundo, *Chrysomya albiceps*, *C. putoria* (Wiedemann, 1830) e *C. megacephala*, as espécies que até então eram naturalmente encontradas no continente americano, vem sofrendo impactos negativos sobre suas populações por influência da competição com as moscas exóticas (GUIMARÃES *et al.*, 1983, CARVALHO *et al.*, 2000, COURI *et al.*, 2000, CARVALHO e MELLO-PATIU, 2008).

2.1.1 Espécies *Chrysomya albiceps* e *Chrysomya megacephala*

Algumas características foram determinantes para a escolha dessas espécies no presente estudo. Várias pesquisas têm demonstrado que *C. albiceps* e *C. megacephala*

podem ser usadas como ótimo indicador forense no Brasil e em outras partes do mundo, colonizando o cadáver exposto a diferentes condições ambientais. GOMES e ZUBEM (2005) verificaram o padrão de dispersão de *C. albiceps* após se alimentar do cadáver mantido a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 60% de umidade relativa do ar (UR) e fotoperíodo de 12h. GOMES *et al.* (2009), em um estudo pioneiro sobre a entomofauna cadavérica de uma carcaça exposta em plantação de cana-de-açúcar, no sudeste do Brasil, verificaram a presença de *C. albiceps* em todos os estágios de decomposição.

A presença dessas espécies foi observada até em carcaças carbonizadas. Pesquisas feitas por PROÊNCIO (2011) demonstraram a excelente capacidade de colonização cadavérica de *C. megacephala* e *C. albiceps*, tanto na fase imatura quanto na adulta. Em recente estudo, PANIGALLI e SOLIGO (2013), em Santa Catarina, demonstraram que Calliphoridae foi a família mais representativa e, notadamente, *C. albiceps* e *C. megacephala* foram as espécies mais abundantes. ROSA (2007), numa região de bioma de cerrado, em Uberlândia, Minas Gerais, verificou que *C. albiceps* figurou entre as espécies de maior predominância.

É interessante que moscas de importância forense também se mostrem adaptadas e competitivas em regiões urbanizadas. DIAS *et al.* (2012), estudando a distribuição espacial de moscas sinantrópicas, em Presidente Prudente – São Paulo, usando pontos dentro do *campus* da UNESP, verificaram alta frequência de *C. albiceps* e *C. megacephala*, dentre outros califorídeos, reforçando estudos que mostram a grande capacidade competitiva dessas espécies, que vem ocupando os espaços de espécies nativas, desde sua introdução no país na década de 1970 (GUIMARÃES *et al.* 1983).

Pesquisa recente realizada Brasil mostrou que, dentre as espécies invasoras registradas na região de cerrado do Distrito Federal, *C. albiceps* foi a espécie mais abundante (53%), seguida por *C. megacephala* (46,5%). Esse estudo apontou também que

a espécie de califorídeo mais comumente coletada na área urbana foi *C. megacephala* (49,6%), enquanto que na área rural a espécie dominante foi *C. albiceps* (71,7%) (KOSMANN, 2013).

C. albiceps também vem sendo encontrada associada abundantemente a maioria dos cadáveres e carcaças em decomposição, em todos os estágios da putrefação, principalmente em regiões como o sul da Europa, afrotropical, oriental (da Índia à China), e regiões neotropicais, como América do Sul e Central (GRASSBERGER *et al.* 2003), o que aumenta bastante sua aplicabilidade na área forense em outros países. Pesquisas feitas por VANIN *et al.* (2010), na Itália, também encontraram grande percentual de *C. albiceps* em cadáver humano.

Vários trabalhos científicos no mundo sustentam a escolha de *C. albiceps* em estudos com entomologia forense por sua presença e/ou prevalência constantes nos corpos. No Kuwait, país do Oriente Médio, em carcaças de coelho, decompondo em quatro condições distintas (agrícola, costeira, desértica e urbana, com temperaturas variando de 11,9°C a 43,2°C (na área urbana) e umidade relativa do ar entre 26% e 89%, observou-se a presença abundante de *C. albiceps* nos quatro ambientes testados, em todas as fases de decomposição (AL-MESBAH *et al.*, 2012).

Em diversos países da América Latina também tem sido observada a presença dessa espécies em números significativos. Estudos de decomposição, feitos nos Andes da Colômbia, com submersão da carcaça, observaram a presença de *C. albiceps* entre 18 e 40 dias de decomposição e de *C. megacephala* entre 25 e 43 dias (BARRIOS e WOLFF, 2011). Outro estudo de sucessão entomológica, na Argentina, demonstrou a presença de *C. megacephala* em duas estações do ano (verão e outono) e de *C. albiceps*, que participou da colonização da carcaça em todas as estações climáticas, sendo a espécie predominante, tanto na fase de imaturo quanto de adulto. Nesse estudo, observou-se a grande capacidade

predadora dessa espécie no segundo e terceiro instares de seu ciclo de vida, ratificando sua notável competitividade, frente a outras espécies, além de reforçar sua classificação como importante indicador forense (HORENSTEIN *et al.*, 2012).

De acordo com PICARD (2013), *C. albiceps* e *C. megacephala* estão entre as espécies bem estabelecidas no hemisfério ocidental, sendo a presença de *C. megacephala* abundante em várias regiões dos Estados Unidos da América, incluindo o Estado da Flórida, onde *C. megacephala* é uma das principais espécies forenses e onde se desenvolveu uma parte da presente pesquisa.

2.2 Breve Histórico da Entomologia Forense

O histórico documentado da entomologia forense inicia-se no século XIII, no ano de 1235, na China, em um manual de medicina legal, escrito por Sung Tz'u, com o título *The washing away of wrongs*, onde é descrito o homicídio de um lavrador com um instrumento de ação corto-contundente (foice), usado para degolar o trabalhador. Nesse episódio, os investigadores localizaram uma foice, onde várias moscas sobrevoavam, possivelmente atraídas pelos odores exalados de secreções biológicas da vítima assassinada. Após ser interrogado pela polícia, o usuário da foice confessou o crime, apontado inicialmente pelos insetos (*apud* OLIVEIRA-COSTA, 2011).

A primeira estimativa de intervalo pós-morte, baseada em estudos entomológicos, foi feita em 1855, pelo médico francês Bergeret, mas o primeiro livro sobre esse assunto, intitulado “La faune de cadavres”, só foi publicado em 1894, pelo pesquisador francês Mégnin e sugeriu que os insetos frequentam ambiente cadavérico de uma forma padronizada que pode ser utilizada para estimativa do intervalo pós-morte - IPM (*apud* OLIVEIRA-COSTA, 2011).

Em nosso país, o início dos trabalhos da Entomologia Forense se deu com as pesquisas de Oscar Freire, em 1908, apenas 14 anos após os trabalhos de Mégnin terem vindo à tona na França. No mesmo ano, Roquete-Pinto publicou um estudo de caso, denominado “Nota sobre a fauna cadavérica no Rio de Janeiro”. FREIRE (1914a e 1914b), também publicou “Algumas notas para o estudo da fauna cadavérica da Bahia” (PUJOL-LUZ *et al.*, 2008).

Após os trabalhos de Freire e Roquete-Pinto, os estudos em entomologia forense, ao contrário do que acontecia em diversos países europeus, ficaram esquecidos por décadas, quando MONTEIRO-FILHO e PENEREIRO, em 1987, desenvolveram pesquisas sobre a decomposição e sucessão entomológica em carcaça numa região do Estado de São Paulo (*apud* OLIVEIRA-COSTA, 2011).

No final da década de 80, Arício Xavier Linhares e Cláudio José de Barros Carvalho, além de outros colaboradores, iniciaram seus estudos nacionais sobre entomologia forense, sendo o livro de Oliveira-Costa (2003) o primeiro no Brasil sobre o assunto a compilar informações disponíveis na literatura nacional e internacional, auxiliando para que pesquisadores e peritos criminais pudessem se aproximar mais de uma linguagem uniforme (PUJOL-LUZ *et al.*, 2008).

Além da estimativa do intervalo pós-morte (IPM), contribuição mais importante e recorrente da entomologia forense, os insetos já foram usados para auxiliar a justiça nos casos de modificação da posição de cadáveres, na confirmação de abandono ou negligência de menores, além de maus tratos a idosos (BENECKE *et al.*, 2004; AMENDT *et al.*, 2011), identificação de autoria do crime, usando o exame de DNA obtido do sangue ingerido por insetos hematófagos (REPOGLE *et al.*, 1994; MUMCUOGLU *et al.*, 2004), uso excessivo de drogas como causa do óbito (entomotoxicologia), ligação do suspeito ou vítima à cena do crime, intervalo de submersão do corpo, tempo mínimo de

desmembramento e/ou decapitação de cadáver, detecção de drogas, venenos, medicamentos e metais pesados, dentre outras aplicações (AMENDT *et al.*, 2004; AMENDT *et al.*, 2011).

Infelizmente, no Brasil ainda existe uma distância muito grande entre o desenvolvimento acadêmico em diversas áreas do conhecimento e a sua aplicabilidade na área forense. Diversos fatores contribuem e/ou contribuíram para esse afastamento, como a pouca ou quase ausência da valorização da pesquisa e incentivo à qualificação dos peritos criminais e peritos médicos legistas, além de seus respectivos auxiliares técnicos; falta de estrutura e materiais adequados nos órgãos de criminalística e médico-legais. Diante desse cenário, faz-se necessário um maior investimento do poder público visando à aproximação, cada vez maior, dos conhecimentos científicos na área pericial (PUJOL-LUZ *et al.*, 2008).

Nos poucos estados do país onde ocorre uma integração entre entomologistas, peritos criminais e médicos legistas, como Rio de Janeiro e Brasília, em que há um vínculo entre conhecimentos acadêmicos e a polícia judiciária, já nota-se uma expressiva produção de provas materiais importantes na elucidação de crimes diversos (PUJOL-LUZ *et al.*, 2008). AMENDT *et al.* (2004) afirmaram que um dos maiores desafios para o futuro da Entomologia Forense seria a associação entre os dados experimentais, adquiridos principalmente em por pesquisadores de universidades e centros de pesquisa, e a casuística forense, observada no âmbito pericial e policial.

2.3 Fundamentos Básicos da Genética Forense

Em todos os cromossomos existem sequências com função codificante e outras sequências com função não codificante. As regiões não codificantes, correspondentes a 90-95% do genoma nuclear, têm permanecido com função desconhecida, apresentando grande variabilidade entre os indivíduos, exceto no caso de gêmeos idênticos, sendo por

esse motivo muito úteis na identificação genética (SAFERSTEIN, 2006). Essa região é constituída por sequências não repetitivas (70-75%) e sequências repetitivas (25-30%), que apresentam grande variabilidade e conseqüentemente um elevado nível de polimorfismo, muito útil na identificação humana, conseqüentemente, para aplicação na área forense (KAYSHYAP *et al.*, 2004).

A Genética Forense é responsável pela identificação biológica de indivíduos ou de amostras biológicas para fins jurídicos, na área civil ou criminal. Para isso, são realizados exames periciais em amostras, que consistem atualmente na determinação de um perfil genético ou perfil de DNA, contribuindo para o esclarecimento de relações biológicas de parentesco, paternidade ou maternidade, identificação de desconhecidos, além da identificação de amostras biológicas relacionadas a processos judiciais. A partir da década de 80 o desenvolvimento da genética e da biologia molecular teve grande avanço na análise científica de amostras pouco preservadas e, em conseqüência, a aplicação de métodos moleculares para resolver casos que envolvem esses materiais aumentou significativamente (KAESTLE e HORSBURGH, 2002).

2.3.1 Polimorfismos de DNA

Os polimorfismos localizados nos cromossomos demonstraram a existência de um padrão aleatório de determinadas sequências de DNA, diferentes entre os indivíduos, situadas nas regiões não codificantes, sendo constituída por pequenos segmentos da cadeia repetidos em tandem (bloco), isto é, a mesma sequência repete-se com um número variável de vezes. Cada um desses fragmentos é designado por unidade de repetição e o número de repetições varia de indivíduo para indivíduo. Dessa forma, o perfil genético do indivíduo é caracterizado pelo número de unidades de repetição que o seu genoma apresenta nos respectivos *loci* (CARRACEDO e SÁNCHEZ-DÍAZ, 2000).

De acordo com o tamanho do segmento de DNA que inclui as unidades de repetição, estas sequências polimórficas podem ser classificadas em Minissatélites ou VNTRs (Variable number of tandem repeats), Microsatélites ou STRs (Short Tandem Repeats) e SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms). Os STRs, escolhido para esse estudo, por serem relativamente pequenos, apresentam grande sucesso para análise de amostras degradadas, sobretudo em amostras antigas e esqueletos humanos, com especial aplicação em estudos antropológicos e arqueológicos, contribuindo para a reconstrução de genealogias históricas e estudos de genética populacional. Portanto, essas características são particularmente úteis no estudo forense, como em casos de amostras de cadáveres em avançado estado de decomposição e corpos sujeitos às diversas condições de degradação ambiental (PINHEIRO, 2008).

O Serviço de Ciência Forense (FSS) dos Estados Unidos da América realizou estudos com diversos STR (tetranucleotídeos) analisando suas variações entre as populações. Os primeiros multiplex (vários “primers” em reações de amplificação simultâneas, gerando produtos de múltiplos *loci*) selecionados pela FSS e aplicados pela ciência forense foram 4 *loci*: TH01, VWA, FES/FPS e F13A1 (BUTLER, 2005).

A segunda geração de multiplex foi obtida com os *loci*: TH01, VWA, FGA, D8S1179, D18S51 e D21S11. A Base de Dados Nacional de DNA do Reino Unido incluiu a tipagem sexual a esses *loci* através da análise do gene da amelogenina (gene que codifica uma proteína de matriz extracelular do esmalte dentário), que varia em comprimento (diferença de 6 pares de bases nucleotídicas) entre os cromossomos X e Y, podendo assim diferenciar o sexo masculino do feminino a partir de sua análise (BUTLER, 2005).

Verificando a aplicabilidade e segurança da tecnologia de tipagem por STR, o laboratório do FBI instituiu os 13 *loci*, que seriam o alicerce do *Combined DNA Index System* - CODIS (Sistema Combinado de Índices de DNA), banco de dados que compara o

perfil genético de criminosos, retirado de amostras em locais de crimes (Figura 1). Em abril de 1996, um projeto de STR, que durou 18 meses e envolveu 22 laboratórios, avaliou 17 *loci*, os quais foram disponibilizados em kits comerciais da Promega Corporation (Madison, WI) ou da Applied Biosystems (Foster City, CA) (BUTLER, 2005).

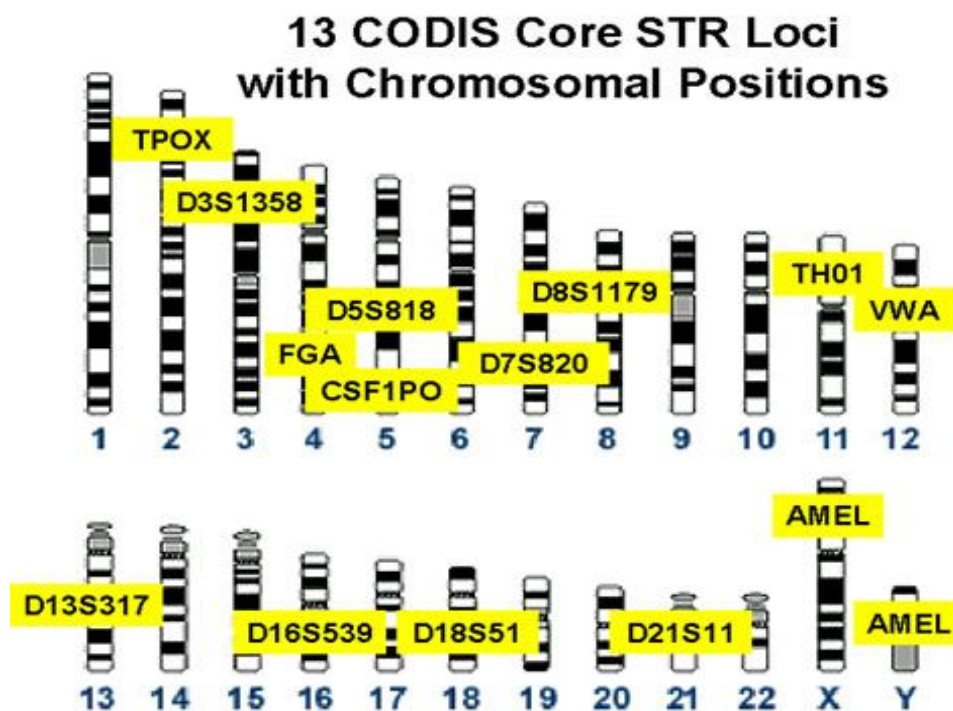


Figura 1- Os 13 *loci* de STR, em seus respectivos cromossomos humanos, empregados pelo *Combined DNA Index System* (CODIS) do *Federal Bureau of Investigation* (FBI).

Fonte: <http://www.cstl.nist.gov/strbase/fbicore.htm>

A Promega desenvolveu o kit PowerPlex 16, criado em 2000, que amplifica na mesma reação 13 *loci*, o gene da amelogenina e dois pentanucleotídeos (Penta D e Penta E). A Applied Biosystems criou o kit 16plex Identifiler, em julho de 2001, que amplifica 13 *loci*, amelogenina e dois tetranucleotídeos (D2S1338 e D19S433).

Estudos de desempenho e de protocolos foram realizados, bases de dados populacionais foram estabelecidas e vários sistemas de STR foram validados (BUTLER, 2005). Os STR são amplificados a partir de oligonucleotídeos situados em regiões adjacentes não repetitivas. Os primeiros trabalhos envolviam sua detecção através de géis

de poliacrilamida corados com prata, e mais recentemente, os pesquisadores empregam métodos de detecção de fluorescência em géis de eletroforese e eletroforese capilar, usando equipamentos como o ABI 3130 e o ABI 3500 Genetic Analyzers (BUTLER, 2005).

2.3.2 Short Tandem Repeats do cromossomo Y humano (Y-STR)

O cromossomo Y (Figura 2) é um dos menores do genoma humano, representando aproximadamente 2% do total do material cromossômico nuclear (CORACH *et al.*, 1999). Apresenta cerca de 60 milhões de pares de bases (pb) e apenas 161 genes codificantes, localizados em seu braço menor (p) (GUSMÃO *et al.*, 2000).

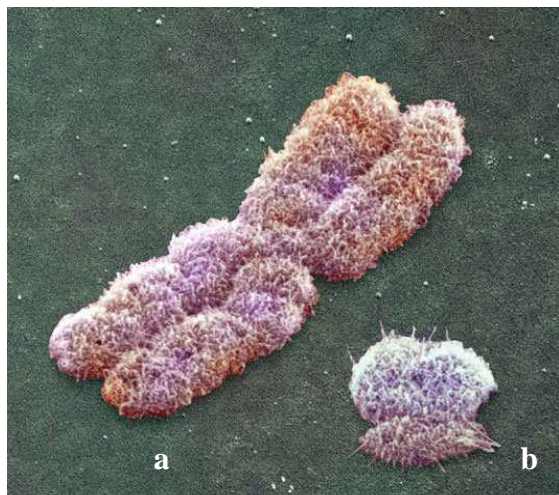


Figura 2 - Cromossomos sexuais humanos: X (a) e Y (b).

Fonte: <http://www.nature.com/nature/focus/ychromosome/>

Só ocorre recombinação genética com o cromossomo X, durante o processo de meiose, em duas pequenas regiões, localizadas em suas extremidades, designadas respectivamente por PAR I e PAR II que, obviamente, não podem ser usadas na área forense (CORACH *et al.*, 1999). Assim, a quase ausência de recombinação genética determina que todas as sequências localizadas fora dessas regiões onde ocorre o crossing-over (permutações), sejam transmitidas às gerações seguintes como um bloco, sem alterações genéticas a não ser que ocorra alguma mutação (GUSMÃO *et al.*, 2000). Desta

forma, é possível afirmar que esse cromossomo é único nos indivíduos do sexo masculino, de herança uniparental paterna (GUSMÃO *et al.*, 2000).

Estas características são de grande importância na genética forense, pois a ausência de recombinação genética implica que os haplótipos, isto é, o conjunto de características genéticas obtidas de um único cromossomo, com exceção das alterações causadas por mutação genética, que permitem identificar linhagens paternas (GUSMÃO *et al.*, 2000).

O cromossoma Y, tal como outros cromossomos nucleares, apresenta sequências polimórficas traduzidas em variantes de comprimento como os microssatélites, designados por Y-STRs, em que as unidades de repetição podem variar tanto em número como em sequência (CORACH *et al.* 1999).

Estudos iniciais com os marcadores genéticos Y- STR foram efetuados com um “locus” designado por DYS19, tendo sido descobertos e validados para a área forense um grande número de sequências polimórficas importantes (CORACH *et al.*, 1999). Os 8 (oito) primeiros marcadores a serem recomendados para utilização forense foram os seguintes: DYS19, DYS385, DYS389I, DYS389 II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393.

Com o objetivo de incrementar o poder discriminativo destes marcadores genéticos, foi recomendada a utilização dos marcadores DYS437, DYS438 e DYS439 selecionados pelo “Scientific Working Group on DNA Analysis Methods” - SWGDAM (Grupo Científico de Trabalho sobre Métodos de Análises de DNA) e incluídos nos principais kits comerciais. Posteriormente, aos 12 marcadores supracitados foram adicionados DYS448, DYS456, DYS458, DYS635 e GTA H4, todos localizados no braço curto (*p*) e longo (*q*) do cromossomo Y (Figura 3), aumentando estatisticamente o poder discriminativo entre as diversas linhagens paternas conhecidas (GUSMÃO e ALVES, 2010).

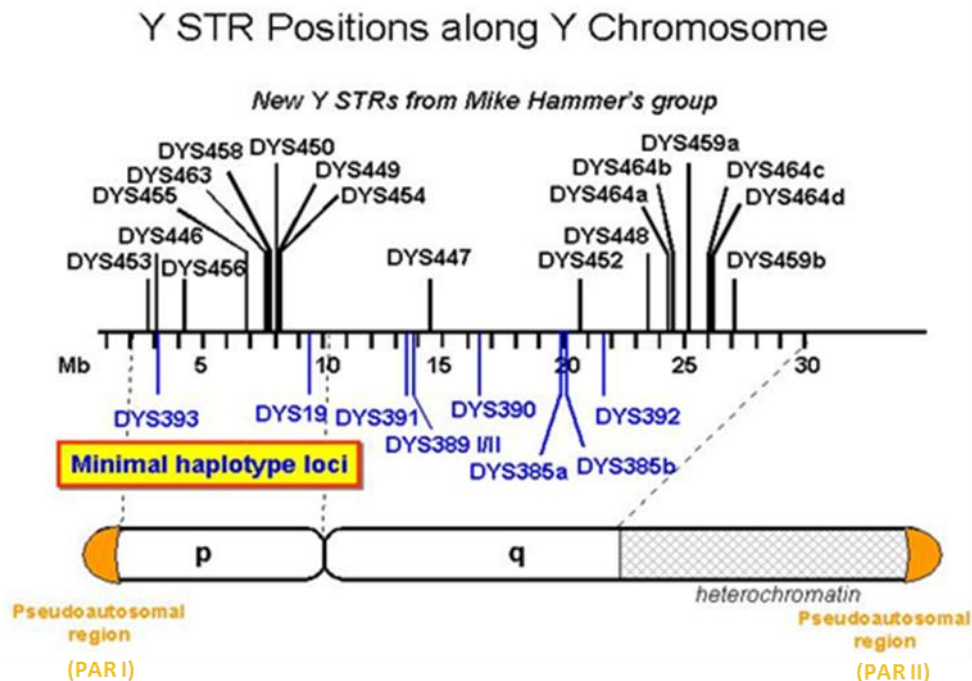


Figura 3 - Estrutura do cromossoma Y, com os braços curto (*p*) e longo (*q*), regiões de recombinação genética (PAR1 e PAR2) e localização dos Y-STRs utilizados na área forense.

Fonte: <http://www.cstl.nist.gov/strbase/ystrpos1.htm>

A região não recombinante do cromossoma Y apresenta vários tipos de polimorfismos. Observando a Figura 3, de acordo com o sistema CODIS, os marcadores representados com a cor azul, correspondem aos primeiros Y-STRs aplicados na área forense e o conjunto (oito, no total) das suas características genéticas obtidas num indivíduo é designado por Haplótipo Mínimo. O conjunto dos resultados de Y-STRs obtido com os marcadores do haplótipo mínimo, somado com outros três *loci* (DYS437, DYS438, DYS439), resultando num haplótipo com 11 locais, forma o Haplótipo Estendido, presentes em kits comerciais. Um exemplo de locais usados em um kit Y-STR pode ser observado no Quadro 1 (GUSMÃO e CARRACEDO, 2003).

Quadro 1- Y-STRs usados em rotinas forenses, incluídos no AmpF/STRRY filerR PCR amplification

Y-STRs	Estrutura Genética da Unidade de Repetição	Nº de Repetições
DYS19	(TAGA) ₃ TAGG (TAGA) _n	10-19
DYS385a/b	(AAGG) ₆₋₇ (GAAA) _n 7-	25, 28
DYS389 I	(TCTG) ₃ (TCTA) _n	9-17
DYS389 II	(TCTG) _n (TCTA) _n N28 (TCTG) ₃ (TCTA) _n	23-34
DYS390	(TCTA) ₂ (TCTG) _n (TCTA) _n (TCTG) _n (TCTA) _n TCA (TCTA) ₂	17-28
DYS391	(TCTG) ₃ (TCTA) _n	6-14
DYS392	(TAT) _n	6-18
DYS393	(AGAT) _n	8-17
DYS438	(TTTTTC) ₁ (TTTTTA) ₀₋₁ (TTTTTC) _n	6-14
DYS439	(GATA) _n	8-15
DYS437	(TCTA) _n (TCTG) ₁₋₃ (TCTA) ₄	13-17
DYS448	(AGAGAT) _n N42 (AGAGAT) _n	17-23
DYS456	(AGAT) _n	14-19
DYS458	(GAAA) _n	13-20
DYS635	(TCTA) ₄ (TGTA) ₂ (TCTA) ₂ (TGTA) ₂ (TCTA) ₂ (TGTA) _{0,2} (TCTA) _n	17, 19-26
GATA H4	(AGAT) ₄ CTAT (AGAT) ₂ (AGGT) ₃ (AGAT) _n N24 (ATAG) ₄ (ATAC) ₁ (ATAG) ₂	24-30

2.4 Entomogenética forense

Vários estudos têm sido publicados, baseados na genética e no conhecimento do DNA, aplicados na área da entomologia forense (WELLS e STEVENS, 2008; REIBE *et al.*, 2009; BOEHME *et al.*, 2010), o que tem sido chamado por alguns pesquisadores no Brasil de entomogenética forense.

ZEHNER *et al.* (2004) identificaram regiões seletivas de genes de dípteros com grande importância na decomposição de cadáveres, através da análise da subunidade I do gene mitocondrial, responsável pela produção da enzima citocromo oxidase (CO I), e da subunidade 5 da NAD desidrogenase (ND5). Seguindo a mesma linha, WELLS e WILLIAMS (2007) testaram um protocolo para identificação de moscas da subfamília

Chrysomyinae (Diptera: Calliphoridae) frequentemente encontradas em associação a cadáveres humanos no Canadá e nos Estados Unidos.

Estudos feitos por pesquisadores britânicos, em Londres, usaram o gene mitocondrial COI para diferenciar duas espécies de moscas varejeiras de interesse forense, *Calliphora vicina* e *Calliphora vomitoria*, o que possibilitou a distinção molecular entre essas espécies (AMES *et al.*, 2006). Com o uso do barcode (código de barras molecular), pesquisadores verificaram diferenças moleculares entre as ordens de insetos, usando também a sequência do DNA mitocondrial, no gene COI (VIRGÍLIO *et al.*, 2010). A partir da amplificação de 658 pb de uma região do gene COI, Rolo (2010), usando 4 espécies de Diptera (*C. vicina*, *C. vomitoria*, *Lucilia caesar* e *Musca autumnalis*), observou incongruência entre a identificação molecular e a taxonômica para *M. autumnalis*. Nesse mesmo estudo, concluiu-se que o uso da identificação molecular para insetos de interesse forense pode ser mais uma boa ferramenta.

Não é incomum que, após o homicídio, o assassino retire o corpo do local de crime original e o transporte para outra região, numa tentativa de dificultar o encontro do cadáver e as investigações subsequentes. Em alguns casos, essa remoção ocorre muitas horas após a morte da vítima. Estudos entomogenéticos foram realizados para caracterizar a possibilidade de relacionar geneticamente imaturos de insetos encontrados em locais diferentes, simulando casos de remoção de cadáver (PICARD e WELLS, 2012), o que constituiria uma excelente prova material dessa ação criminosa.

Constatou-se a utilidade da abordagem molecular e morfológica para a identificação de larvas encontradas em dez locais de crime diferentes na Malásia, coletados e armazenados em álcool 70%, em temperatura ambiente. Nesse estudo, foram utilizados “primers” para amplificação de três regiões de interesse, presentes no genoma mitocondrial: os genes da enzima citocromo oxidase I (COI) e citocromo oxidase II (COII)

e o gene do RNAt do aminoácido leucina. Essas análises filogenéticas confirmaram a presença de *Chrysomya megacephala*, *C. rufifacies* e *C. nigripes* nos locais de crime investigados (KAVITHA *et al.*, 2012).

CARVALHO *et al.* (2005), da University of Western Australia, isolaram e detectaram DNA de tecido ovino, ingerido por estágios imaturos de califorídeos da espécie *Calliphora dubia* (Macquart), obtendo detecção desde os estádios ou ínstaes larvais iniciais, referentes ao primeiro instar larval, até os estádios mais adiantados de pupa, referentes ao penúltimo estágio pupal, coletadas até 10 dias após a eclosão dos ovos.

Comparando-se a outras áreas, atualmente ainda existem poucos estudos no mundo sobre a recuperação e identificação de DNA humano ingerido por larvas de moscas saprofíticas. Sabe-se que dípteros califorídeos, como *C. albiceps* e *C. megacephala*, dentre outros, apresentam um divertículo esofágico, que funciona como um reservatório alimentar livre de enzimas digestivas, permitindo que alimentos ingeridos pelas larvas, mesmo após muitos dias, possam ser encontrados preservados, pelo menos parcialmente.

Em dois casos forenses, em que duas vítimas foram encontradas em estado de decomposição avançado, sendo uma morta por asfixia e a outra por intoxicação de drogas (de acordo com a necropsia), numa região da Itália, pesquisadores do Instituto Forense Sagrado Coração de Roma conseguiram extrair e identificar DNA humano a partir de pupas vazias encontradas nos respectivos locais onde estavam as vítimas, num estudo, publicado no ano de 2013, pioneiro no mundo (MARCHETTI *et al.*, 2013).

Um dos pontos mais importantes numa investigação criminal é descobrir o tempo decorrido a partir de quando a vítima se tornou um cadáver, ou seja, qual o IPM. Nos casos em que a vítima é encontrada em decomposição avançada, os entomologistas precisam coletar e identificar os espécimes mais antigos do local de crime, para que sejam feitos os cálculos corretos do tempo de morte. Em muitos casos, encontram-se pupas deterioradas, o

que atrasa ou inviabiliza a identificação do inseto. A partir dessa problemática, pesquisadores exploraram a aplicabilidade de técnicas biomoleculares para a identificação genética de pupas deterioradas, encontradas em carcaças em decomposição avançada, demonstrando o potencial de aplicabilidade dessa técnica (MAZZANTINI *et al.*, 2010).

CLERY (2001) verificou, com técnicas moleculares menos avançadas que as atuais, a viabilidade da tipificação de Y-STR de larvas do díptero *Lucilia sericata* Meigen 1826, numa simulação de crescimento e alimentação larval em cadáver vítima de crime sexual, onde as larvas recebiam, além da carne de fígado em decomposição, quantidades regulares de sêmen humano, usando temperatura constante de 24° C. A espécie de mosca usada na pesquisa de CLERY, apesar de cosmopolita, não é comumente encontrada associada a cadáveres em regiões que apresentam temperaturas médias mais altas, como no Brasil e em outros países da América do Sul, América Central, Ásia e África.

As espécies usadas no presente estudo, *C. albiceps* e *C. megacephala*, como ratificado nas linhas anteriores, apresentam características ideais para atuar como indicadores forenses, tanto em clima tropical quanto em regiões mais frias, pois apresentam grande predominância, destacando-se ainda os aspectos competitivos de predação e canibalismo na fase larval de *C. albiceps*, além de sua fácil diferenciação entre as demais larvas presentes num corpo em decomposição, facilitando o treinamento dos peritos criminais, presentes na cena do crime.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os experimentos desenvolvidos nessa pesquisa, *in vitro* e *in situ* no Brasil e *in vitro* nos Estados Unidos, foram realizados em duas etapas: a primeira, denominada “etapa entomológica” e a segunda, denominada “etapa molecular”. No presente estudo, foram analisados alguns dos principais STRs mapeados e catalogados na sequência do cromossoma Y humano atualmente (Y-STR).

Em todos os experimentos *in vitro* e *in situ*, foram usados os materiais e equipamentos de proteção individual (EPI): jaleco de mangas compridas, luvas descartáveis de látex, máscara e touca de cabelo.

3.1 EXPERIMENTO *IN VITRO*

3.1.1 Etapa Entomológica *in vitro*

No Brasil, essa etapa foi realizada nos laboratórios de Diptera do Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ/MNRJ) e no Laboratório de Entomologia Forense do Instituto de Criminalística Carlos Éboli, da Polícia Civil do Rio de Janeiro.

Nos EUA, essa etapa foi desenvolvida no Laboratory of Forensic Entomology, do Department of Biological Science, da Florida International University (FIU).

No experimento desenvolvido aqui, adultos e imaturos de *C. albiceps* (Figura 4), foram atraídos por carcaça em decomposição de porco doméstico – *Sus scrofa* Linnaeus, 1758 (Figuras 5 e 6). O animal modelo foi abatido com três disparos de pistola calibre .40, na região abdominal e cefálica.

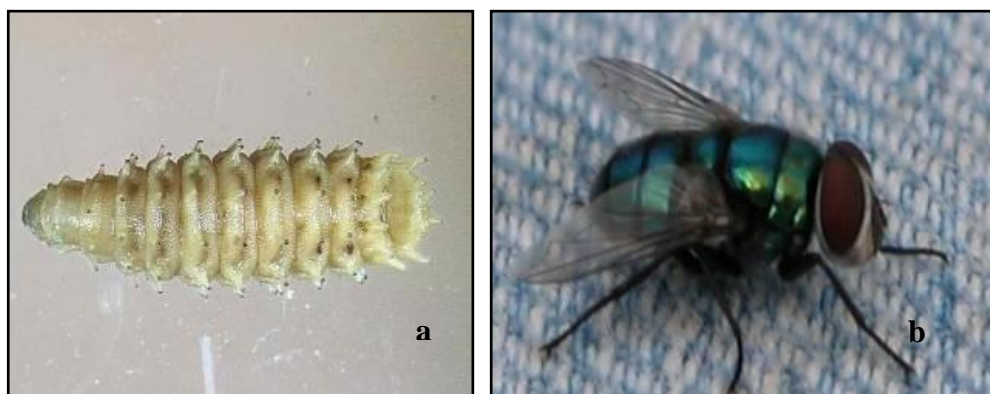


Figura 4 – Larva (a) e adulto (b) de *Chrysomya albiceps* .



Figura 5 – *Sus scrofa* abatido com disparos de arma de fogo



Figura 6 – Dípteros Calliphoridae pousando na carcaça, do porco doméstico *Sus scrofa*, poucos minutos após a morte do animal.

No experimento desenvolvido nos EUA, adultos e imaturos de *C. megacephala* (Figura 7), Diptera predominante em cadáveres na região americana onde foi feito o estudo, foram atraídos por fígado de galinha em decomposição avançada, nas imediações da Florida International University.

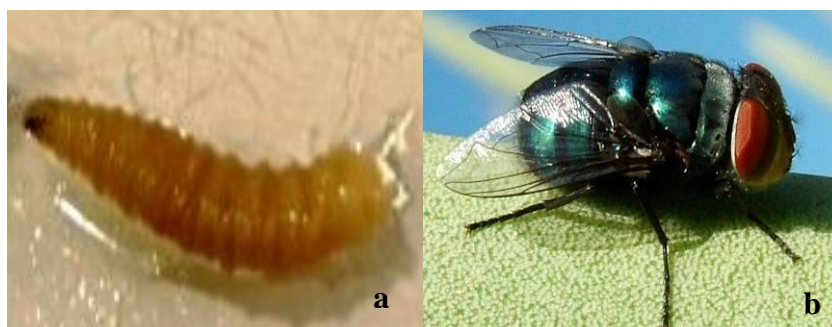


Figura 7 – Larva (a) e adulto (b) de *Chrysomya megacephala*.

Para identificação das espécies, os exemplares adultos coletados foram anestesiados por até 90 segundos, em freezer (congelador) a -20°C (ESTRADA *et al.* 2009).

Após a identificação, os exemplares adultos de *C. albiceps* e *C. megacephala* foram transferidos para gaiolas entomológicas, com dimensões de 45,0 cm de largura x 45,0 cm de altura x 45 cm de comprimento (Figura 8), recebendo água *ad libitum* e mel (no experimento no Brasil) ou pedras de açúcar branco (no experimento nos EUA), numa concentração de 50%, antes de ser oferecida a dieta de carne.



Figura 8 – Gaiola entomológica para a criação de *C. albiceps* (a), nos experimentos realizados no Brasil. e *C. megacephala* (b). nos experimentos realizados nos EUA.

Para os testes foram usados 600,0 g de carne bovina moída (d'ALMEIDA e MELLO, 1995), com 3,0 mL de sêmen (de doador voluntário e anônimo), distribuída em três potes de plástico transparentes, com a lateral coberta e uma tampa (com uma abertura de 4,0 cm²) mantendo ambiente de postura com reduzida entrada de luz (Figura 9). Em cada um dos três potes foram colocados 200,0 gramas de carne moída e 1,0 mL de sêmen.

Estudos demonstram que a quantidade de sêmen observada na ejaculação do homem é de 2,0 mL a 7,0 mL, o que daria uma média de 4,5 mL (GUZICK *et al.*, 2001). Portanto, no presente estudo, optou-se pelo uso de uma quantidade de sêmen abaixo da média observada normalmente na ejaculação do homem.



Figura 9 – Potes de plástico, do experimento *in vitro* com carne moída bovina (e sêmen), para oviposição de *C. albiceps* (a) e *C. megacephala* (b).

Ressalta-se que no experimento *in vitro* no Brasil utilizou-se, para estimular a postura, apenas carne bovina moída (d'ALMEIDA e MELLO, 1995). Porém, no experimento *in vitro* dos EUA, além da carne moída, também foi usado fígado de galinha

em decomposição. Os mesmos potes com carne, para a postura, foram usados para as coletas do experimento, nos testes realizados no Brasil. Nos EUA foram usados potes com carne moída e fígado de galinha especificamente para a postura dos ovos de *C. megacephala* (Figura 10), que foram transferidos, logo após a postura (com o uso de pincéis e pinças), para os três potes com carne moída, onde foram desenvolvidos os testes de decomposição.

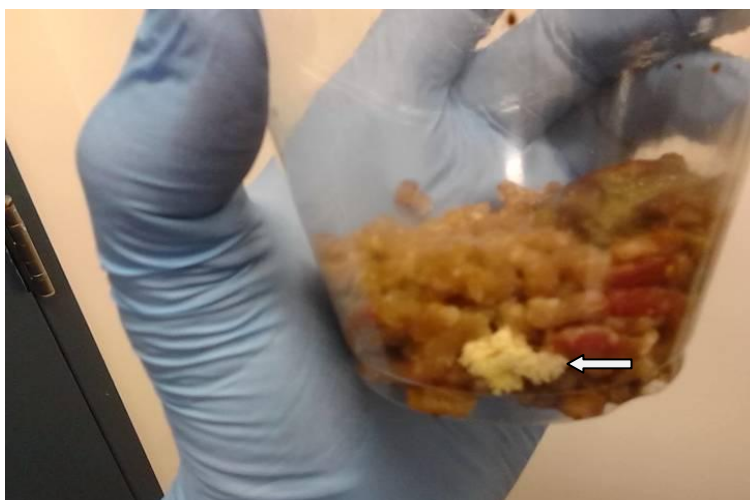


Figura 10 – Pote plástico usado especificamente para a postura de ovos (indicados pela seta) das moscas da espécie *C. megacephala*.

A carne moída bovina e fígado de galinha foram distribuídos em potes de plástico, onde, após 5 (cinco) dias, ocorreu a postura de ovos suficiente para iniciar o experimento.

Após a oviposição, os potes com os ovos foram colocados em uma gaiola vazia, com as mesmas dimensões daquelas usadas para a postura das moscas (Figura 11).



Figura 11 – Potes de plástico no interior da gaiola, para postura de *C. albiceps*.

Em seguida, iniciou-se a coleta de 10 (dez) a 15 (quinze) imaturos (larvas e/ou pupas), retirados dos potes (3 a 5 imaturos de cada pote), a cada 24 horas (um dia).

No Brasil, as coletas dos imaturos de *C. albiceps* iniciaram a partir de 48 horas de decomposição (com o aparecimento das primeiras larvas de 1º instar), até um total de 192 horas (oito dias) de decomposição (Figura 12).

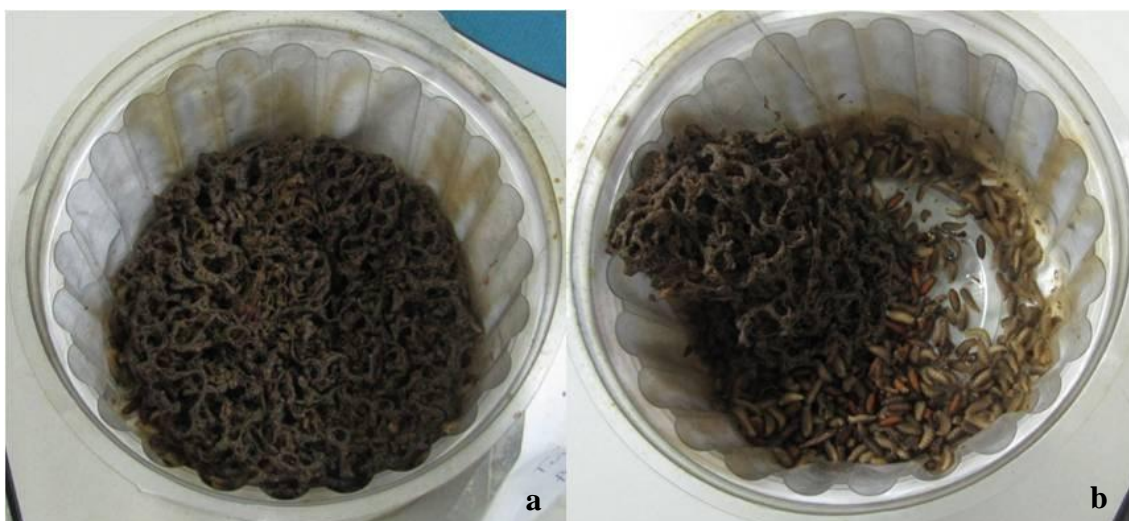


Figura 12 - Um dos potes do experimento *in vitro* no Brasil, após 8 dias (192h) de decomposição, observando-se, nas figuras “a” e “b”, grande desenvolvimento de imaturos.

Nos EUA, as coletas dos imaturos de *C. megacephala* iniciaram a partir de 72 horas de decomposição, até um total de 336 horas (14 dias) de decomposição. Os imaturos coletados no experimento *in vitro* foram preservados em frascos com álcool 70%, sendo identificados com a data e o tempo de decomposição, conforme mostrado na Figura 13.

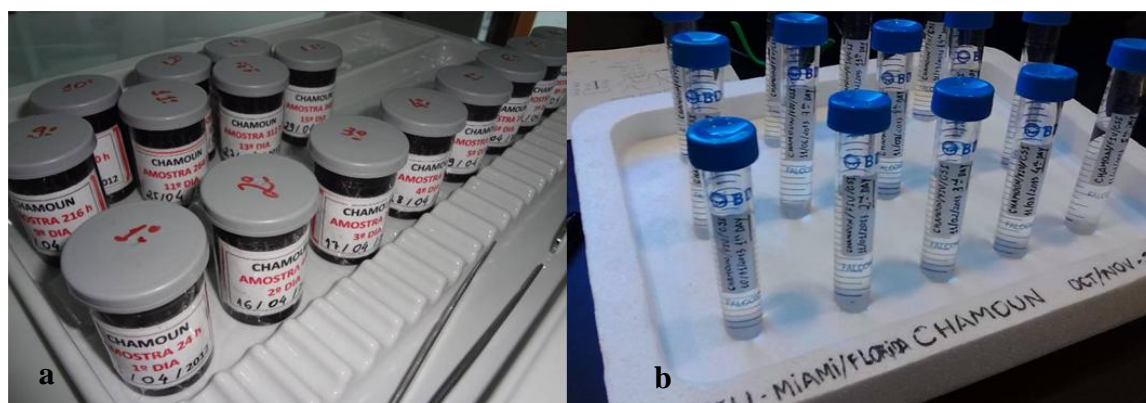


Figura 13 – Preservação dos imaturos de *C. albiceps* (a) e *C. megacephala* (b) em álcool 70%

Nos experimentos *in vitro* desenvolvidos nessa pesquisa, para efeito do tempo de coleta, o início da decomposição foi considerado a partir do momento da postura (no Brasil) ou da transferência dos ovos (nos EUA) para os potes com carne, usados para a coleta dos imaturos a cada 24 horas.

Os imaturos foram dissecados, para a retirada do material visceral, incluindo a parte inicial do intestino e tecidos adjacentes. A dissecação foi feita sempre na região ventral e no sentido ântero-posterior dos imaturos, usando-se bisturi de metal, com auxílio de uma pinça metálica e um microscópio estereoscópico (Figura 14). A região visceral coletada preferencialmente foi aquela existente nos dois primeiros terços corporais dos imaturos. Antes da dissecação, cada imaturo foi lavado externamente com álcool 70% e água destilada, a fim de retirar qualquer possibilidade de haver sêmen adsorvido na superfície externa do imaturo.

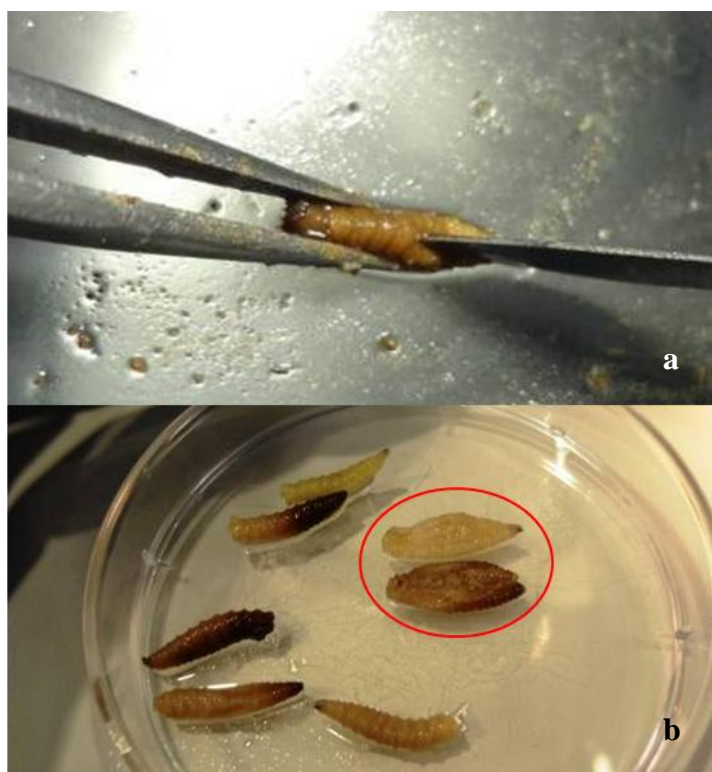


Figura 14 – Dissecação ventral e antero-posterior de imaturos de *C. albiceps* (a) e *C. megacephala* (b, no círculo vermelho)

As vísceras foram colocadas em frascos de Eppendorf, de 2,0 mL, com álcool 70%, no experimento *in vitro* no Brasil, e com solução tampão de extração, no experimento *in*

in vitro nos EUA (Figura 15). Esse material foi armazenado até a utilização nas análises moleculares posteriores. Bisturis, pinças e a placa de Petri (usada como suporte para a dissecação dos imaturos) foram lavados com água corrente, álcool 70% e água destilada, entre as disseções de cada amostra. O mesmo procedimento foi usado antes da dissecação de todos os imaturos, com a lavagem corporal externa de cada amostra coletada.

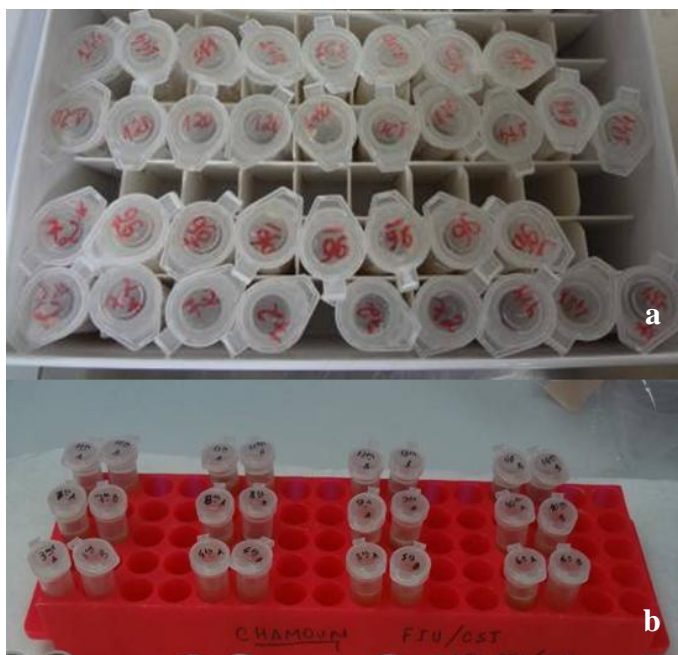


Figura 15 – Frascos com as vísceras de *C albiceps*, (em álcool 70%) (a) e *C. megacephala*. (em tampão de extração) (b).

A etapa entomológica *in vitro* nos EUA, assim como no Brasil, foi mantida inteiramente sujeita às variações climáticas de temperatura e umidade.

3.1.2 Etapa Molecular *in vitro*

No Brasil, essa etapa foi desenvolvida no Instituto de Pesquisa e Perícias em Genética Forense – IPPGF, da Polícia Civil do Estado do Rio de Janeiro.

Nos EUA, o experimento molecular *in vitro* foi desenvolvido no laboratório de DNA do Crime Laboratory Bureau (Forensic Biology Section), do Miami Dade-Police Department.

As amostras *in vitro*, com o material visceral dos imaturos, coletados na etapa entomológica, seguiram a seguinte sequência analítica: a) Extração do DNA; b) Quantificação de DNA total das amostras; c) Amplificação das sequências de interesse pela técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase); e 4) Eletroforese capilar.

As diferenças entre as análises do experimento *in vitro* no Brasil e nos EUA estão pontuadas a seguir.

No Brasil, a extração de DNA seguiu o protocolo de extração de tecidos moles, pela técnica de fenol-clorofórmio. Em seguida, as amostras foram amplificadas nas regiões de interesse (Y-STR), com o uso da PCR. A identificação e análise molecular, dos produtos da amplificação, foram realizadas pela técnica de eletroforese capilar, em sistema de análise molecular ABI PRISM 3100 *Avant Genetic Analyser* (da Applied Biosystems, atualmente Life Technologies). Sendo assim, a pesquisa molecular, dos testes *in vitro* no Brasil, seguiu a seguinte ordem:

a) Extração de DNA: Basicamente, o processo de extração de DNA compreende duas etapas, sendo a primeira, extrair o DNA propriamente dito, e a segunda etapa, purificar o DNA em solução. A extração de DNA pela técnica fenol-clorofórmio, usada nesse experimento, seguiu o protocolo utilizado para a extração de tecidos moles, com algumas alterações e adaptações, coletando-se a fase aquosa no final do processo (Figura 16).

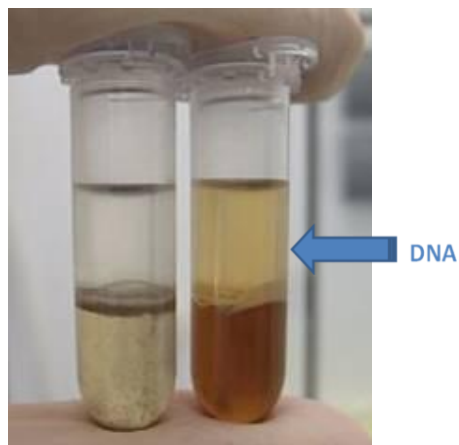


Figura 16 – DNA na fase aquosa da extração orgânica

- Material Necessário: 20 mg/mL de Proteinase K; 5 mol/L de NaCl; Tampão de extração de manchas (Tris-HCl 10 mM, NaCl 100 mM, EDTA 10 mM, SDS 1%, pH 8,0.); TE⁻⁴ (Tris-HCl 10 mM, EDTA 0,1 mM, pH 8,0); Clorofane (fenol:clorofórmio:álcool isoamílico - 24:24:1, v/v); Etanol absoluto gelado e Etanol 70% gelado.

- Procedimentos Executados:

- 1- Adicionou-se à amostra 300µL de tampão de extração de manchas, sendo vortexado e, em seguida, adicionado 20µL de proteinase K;
- 2- Incubou-se a 56°C por 2 horas;
- 3- O material foi centrifugado por 5 (cinco) minutos a 10.000 rpm (com refrigeração);
- 4- Foi adicionado o mesmo volume de clorofane e vortexado;
- 5- Centrifugação por 7 (sete) minutos a 10.000 rpm (sem refrigeração);
- 6- Recuperação do sobrenadante (fase aquosa), transferindo-o para o outro tubo;
- 7- Colocação de 10% de NaCl (saturado);
- 8- Adição de 2 (duas) vezes o volume de etanol absoluto;
- 9- Agitação por inversão e colocação em freezer a -20°C por 2h ou -80°C por 15min;
- 10- Centrifugação por 20min a 10.000 rpm, sendo desprezado o sobrenadante do tubo;
- 11- Colocação de 1,0mL de etanol 70% e agitação por inversão;

12- Centrifugação por 20min a 10.000 rpm, desprezando-se o sobrenadante;

13- Descarte do etanol e secagem do material em “Speed Vac”;

14- Resuspensão do DNA extraído em 50 μ L de TE⁻⁴ (o protocolo normal recomenda resuspensão em 30 μ L de TE⁻⁴).

As etapas oito a 14 foram repetidas, para aumentar a qualidade do produto final da extração e, ao final, o DNA extraído foi mantido em temperatura de -20° C, até seu uso na etapa subsequente, uma semana depois.

b) Quantificação de DNA: Para a quantificação na etapa molecular *in vitro* usou-se 2,0 μ L da amostra original, proveniente da resuspensão final da extração (mantida a -20°C), e 48,0 μ L de H₂O Milli Q, perfazendo uma diluição de 2/50, ou seja, 1/25 (uma parte da amostra em vinte e cinco de água). A razão 260/280, refere-se à interferência/inibição de proteínas ou de ácido ribonucleico (RNA) na reação, sendo que, valores menores que 1,8 referem-se especificamente às proteínas, e valores maiores que 2,0 referem-se ao RNA. Valores ideais da razão 260/280 situam-se entre 1,8 e 2,0. A razão 260/230, refere-se à interferência/inibição do fenol na reação. Para a leitura do quantificador Gene Quant (Figura 17), foi usado um volume de 50,0 μ L da diluição supracitada.

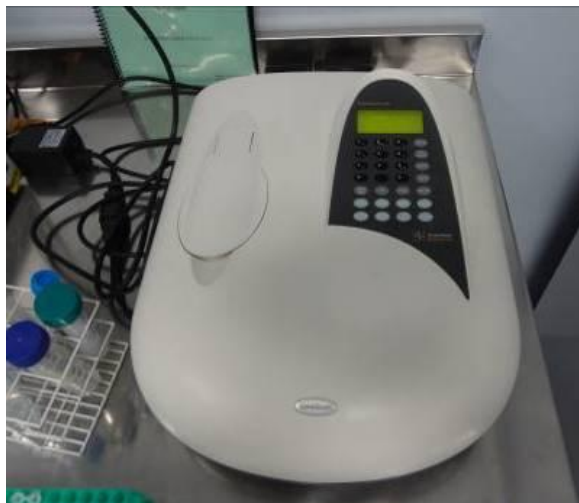


Figura 17 – Quantificador de DNA Gene Quant

A quantificação usada nessa etapa não foi específica para DNA humano, sendo apenas uma estimativa mínima, para aumentar as chances de um melhor desempenho da próxima etapa, ou seja, para otimizar a amplificação do DNA. As diluições foram feitas até que se chegasse a valores de concentração de DNA entre 0,5ng e 1,0ng por 1,0 μL da amostra, ideais para a amplificação pela técnica de PCR.

c) Amplificação de DNA: O cálculo de volume de cada componente usado para a amplificação está especificado no Quadro 2.

Quadro 2 – Cálculo dos volumes usados para PCR de Y-Filer[®]

Solução ou Reagente	Volume por reação	
Tampão AmpF/STR [®] PCR Reaction Mix	4,6 μL	Mix PCR 4,6 μL + 2,5 μL + 0,4 μL = 7,5 μL
Primer AmpF/STR [®] Yfiler [®]	2,5 μL	
AmpliTaq Gold [®] DNA Polymerase	0,4 μL	
Amostra de DNA teste	5,0 μL	
VOLUME TOTAL POR FRASCO	7,5 μL (Mix) + 5,0 μL (DNA teste) = 12,5 μL	

Para cada reação de amplificação foi usada a proporção de 7,5 μL do Mix PCR para 5,0 μL de amostra de DNA testada, formando um volume final de 12,5 μL por frasco levado ao termociclador. Em todas as reações de PCR foram utilizados controles negativo e positivo, provenientes do próprio kit de amplificação.

As amplificações foram realizadas em termociclador GeneAmp PCR System 9700[®] (Applied Biosystems, atualmente Life Technologies), com o uso de programa específico (Figura 18) para o kit usado para a amplificação nesse experimento, o Y-filer, para a determinação do perfil de Y-STR, da Applied Biosystems (atualmente Life Technologies), de acordo com o Quadro 3.

Quadro 3 – Ciclo Térmico para PCR de Y-Filer®

Incubação inicial	Desnaturação	Anelamento	Alongamento (Extensão)	Extensão final	Incubação final
95°C/11min	30 ciclos			60°C/80min	10°C ∞
	94°C/1min	61°C/1min	72°C/1min		

Ao todo, 16 locais genéticos foram testados no cromossomo Y: DYS456; DYS389 I; DYS390; DYS389 II, DYS458; DYS19; DYS385; DYS393; DYS391; DYS439; DYS635; DYS392; GATA H4; DYS437; DYS438; DYS448.



Figura 18 – Termociclador GeneAmp PCR System 9700® (a) e programação térmica para Y-filer (b)

d) Eletroforese Capilar: Os produtos da amplificação por PCR foram visualizados no sistema de eletroforese capilar ABI 3100 Genetic Analyzer (da Applied Biosystem, atualmente Life Technologies) (Figura 19), dotado de quatro capilares.



Figura 19 – Aparelho ABI 3100, usado para eletroforese capilar

Os cálculos para atingir os volumes do protocolo, para o equipamento ABI 3100 Genetic Analyzer (da Life Technologies), são mostrados no Quadro 4.

Quadro 4 – Cálculo dos volumes usados para a eletroforese capilar no ABI 3100 Genetic Analyser

Solução ou Reagente	Volume por reação	
Formamida (Hi-Di™ Formamide)	8,7µL	Mix Eletroforese
Padrão de peso (GeneScan™ 500 LIZ® Size Standard)	0,3µL	8,7 µL + 0,3 µL = 9,0 µL
Amostra de DNA teste	1,0 µL	
VOLUME TOTAL POR FRASCO	9,0 µL (Mix) + 1,0 µL (DNA teste) = 10,0 µL	

O experimento *in vitro* nos EUA, comparando-se com o experimento realizado no Brasil, teve diferenças importantes com relação à extração e quantificação de DNA das amostras analisadas.

a) Extração de DNA: No experimento molecular desenvolvido nos EUA não foi utilizada a extração orgânica de DNA, pela técnica fenol-clorofórmio, como no Brasil. Foi utilizada a extração automatizada, com o equipamento EZ1 Advanced XL (Figura 20), que realiza a purificação de ácidos nucleicos, totalmente automatizada, de, no máximo, 14 amostras por vez, utilizando partículas magnéticas. O protocolo EZ1 Advanced XL DNA Investigator Protocol for Stain Extraction (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA).



Figura 20 – Equipamento EZ1 Advanced XL, da Qiagen.

A extração automatizada, usando-se o equipamento EZ1 Advanced XL, baseia-se no uso de coluna de sílica. Esse método se baseia na atração entre o DNA e a membrana de sílica devido à diferença de cargas elétricas. Na última década, outros pesquisadores propuseram modificações no protocolo extração de DNA com coluna de sílica e recomendam a sua utilização com bom rendimento em amostras de osso humano. As principais vantagens dessa metodologia, de acordo com alguns autores, são: não utilizar reagentes cancerígenos (como o fenol-clorofórmio) e o grau de pureza do DNA extraído (retirando possíveis inibidores de PCR) (PHILLIPS *et al.*, 2012).

Para a extração de DNA do material visceral dos imaturos, utilizou o protocolo “Large Volum Protocol” (Protocolo de Grandes Volumes), seguindo o pré-tratamento de cada amostra e do branco, antes da introdução no aparelho EZ1 Advanced XL, com tubos de 2,0 mL específicos, fornecidos pela QIAGEN (Figura 21):

- I) adição de 480 ul de tampão G2 (QIAGEN) por tubo de extração;
- II) Adição de 20 ul de proteinase K (mantida em temperatura ambiente, ao contrário da convencionalmente usada);
- III) Vortexação e incubação a 56° C por 2 horas, em aparelho termomixer;
- IV) Adição de 400 ul de tampão MTL (QIAGEN);
- V) Adição de 2 ul de carregador de RNA em cada amostra. Não é necessário homogeneizar nesse momento, pois o próprio equipamento EZ1 Advanced XL faz essa função.

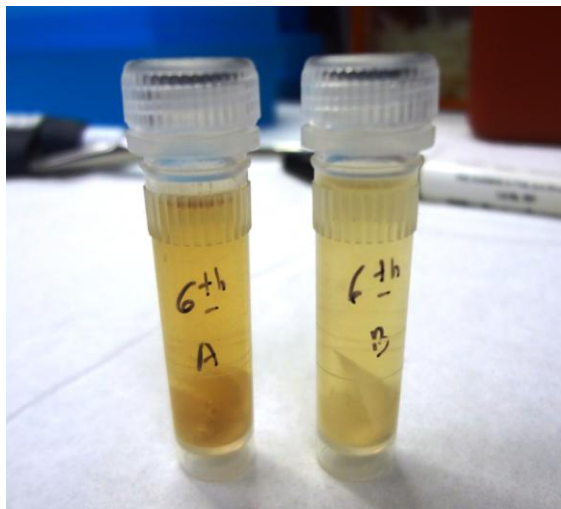


Figura 21 – Tubos de 2,0 mL, específico para o uso no equipamento EZ1 Advanced XL (Qiagen), referente ao 6º dia de decomposição.

b) Quantificação de DNA: Foi realizada a quantificação específica de DNA Y humano das amostras, após a quantificação de DNA total, utilizando o equipamento 7500 Real Time PCR System (Life Technologies) (Figura 22), com análises feitas pelo programa 7500 System SDS. No experimento previamente realizado no Brasil, utilizou-se apenas a quantificação total de DNA.



Figura 22 – Equipamento 7500 Real Time PCR System (Life Technologies), usado no Crime Laboratory do Miami Dade Police para quantificação de DNA Y humano.

Foi usado o sistema de revelação por fluorescência da Applied Biosystems, Quantifiler Duo Human Male™ DNA Quantification Kit. Em cada reação foi usado um volume final de 25 µL, sendo 12,5 µL de Reaction Mix, 10,5 µL de Primer Set e 2,0 µL da amostra de DNA extraído, de acordo com o Quadro 5. O método de quantificação por PCR em tempo real determina a quantidade de ciclos térmicos necessários para a detecção do produto em cada amostra, sendo os dados coletados na fase exponencial do processo, quando a quantidade de material amplificado é diretamente proporcional a quantidade de DNA molde, presente na amostra (GREEN et al. 2005).

Quadro 5 – Quantificação de DNA humano, realizada nos EUA, com Quantifiler Duo Human Male™ DNA

Solução ou Reagente	Volume por reação	
Reaction Mix	12,5 µL	Mix de Quantificação 12,5 µL + 10,5 µL = 23,0 µL
Primer Set	10,5 µL	
Amostra de DNA teste	2,0 µL	
VOLUME TOTAL POR FRASCO	23,0 µL (Mix) + 2,0 µL (DNA teste) = 25,0 µL	

A curva padrão de DNA foi feita usando-se diluição seriada de uma solução-estoque de DNA de 200 ng/µL, formando 8 (oito) escalas, todos feitos em duplicata (pelo menos), com as seguintes concentrações, em ordem decrescente: 50,000 ng/µL; 16,700 ng/µL; 5,560 ng/µL; 1,850 ng/µL; 0,620 ng/µL; 0,210 ng/µL; 0,068 ng/µL e 0,023 ng/µL. O diluente utilizado nas amostras foi o Tampão T₁₀E_{0,1} ou TE⁻⁴, que possui a seguinte formulação: Tris-HCl 10 mM, EDTA 0,1 mM, com pH 8,0 e 20,0 µg/mL de glicogênio. O acréscimo de 20,0 µg/mL de glicogênio é opcional, mas seu uso possibilita estocar os padrões de quantificação de DNA por mais de 2 semanas em temperaturas de 2 – 8 °C.

Utilizou-se como volume mínimo de pipetagem de 10,0 µL, para que não houvesse comprometimento da acurácia no preparo dos padrões. Além disso, as ponteiros foram trocadas sempre entre as pipetagens das diluições.

c) Concentração de DNA: Logo após os resultados da quantificação, observou-se a necessidade de concentrar as amostras. Para isso, os volumes dos frascos (em duplicata) de cada amostra, referentes ao tempo de decomposição, foram colocados em apenas um frasco e, logo depois, utilizou-se a técnica de concentração de DNA com o uso de Microcon (Centrifugal Filter Devices), onde o produto da extração é submetido à filtração e centrifugação (Figura 23).



Figura 23 – Tubos de Microcon (Centrifugal Filter Devices), com membrana filtradora.

As amostras foram purificadas e concentradas, O kit Microcon[®] (Millipore) atua com um sistema de filtros e através de centrifugações (*Centrifugal Filter Devices*). No final das lavagens, o filtro é invertido e, por centrifugação, o DNA é obtido (Figura 24).

O uso do kit Microcon[®] (Millipore) seguiu as normas de uso do fabricante, de acordo com o protocolo a seguir (para amostras líquidas), com adaptação de alguns procedimentos:

- 1) Centrifugar, a 6000 rpm, a unidade concentradora contendo 100,0 μL de água destilada estéril. Nessa análise, utilizou-se água ultrapura Milli Q estéril;

- 2) Transferir a fase aquosa, proveniente da extração por fenol-clorofórmio, para as unidades concentradoras de Microcon Ultracel YM-100;
- 3) Centrifugar a 6000 rpm, até que o volume tenha sido filtrado. Essa etapa foi repetida 2 vezes;
- 4) Adicionar 400 μL (2x de 200 μL) de H_2O estéril (Milli Q) à unidade concentradora de Microcon Ultracel YM-100 e centrifugar a 6000 rpm, até que o volume tenha sido filtrado. Essa etapa foi repetida 2 vezes;
- 5) Trocar o microtubo, virando-se a membrana concentradora para baixo (inversão da membrana do Microcon).
- 6) Adicionar 50 μL de TE^{-4} sobre o Microcon invertido;
- 7) Centrifugar a 12000 rpm por 7 min;
- 8) Recolher a solução que passou pelo Microcon invertido, carreando o DNA concentrado.

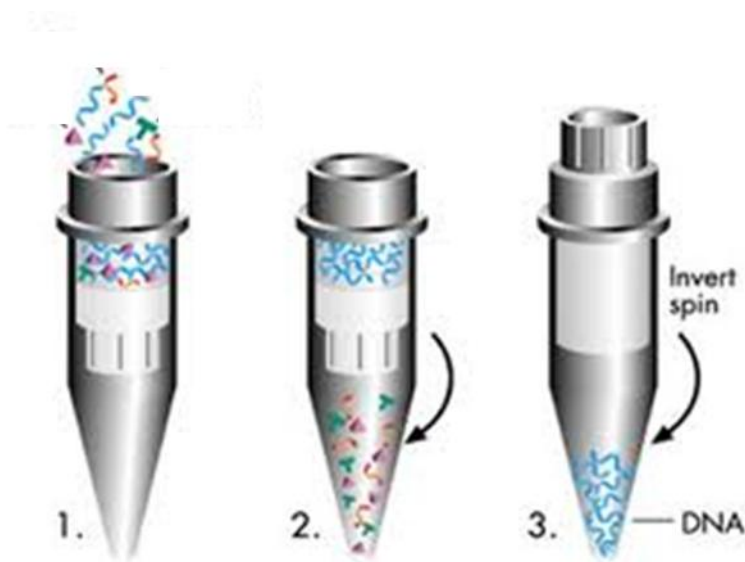


Figura 24 – Desenho esquemático do funcionamento do Microcon para concentração de DNA

d) Amplificação de DNA: A amplificação molecular nos EUA seguiu o mesmo protocolo observado na etapa molecular *in vitro* executada no Brasil. Da mesma forma, também foram testados os mesmos 16 locais genéticos no cromossomo Y, igual ao que foi executado nos testes anteriores *in vitro*, no Brasil. O cálculo de volume de cada componente usado para a amplificação está especificado no Quadro 2

As amplificações foram realizadas em termociclador GeneAmp PCR System 9700® (Life Technologies) igual ao visto nos testes no Brasil (Figura 18 e Quadro 3).

e) Eletroforese Capilar: Os produtos da amplificação por PCR foram visualizados no sistema de eletroforese capilar ABI PRISM 3130 *Genetic Analyser* (Life Technologies)

Enquanto o equipamento de eletroforese capilar usado nos experimentos realizados no Brasil (ABI 3100) apresentava 4 (quatro) capilares, a versão 3130 desse equipamento, usado no Crime Laboratory (dos EUA), apresenta 16 capilares. O princípio básico de funcionamento de ambos os equipamentos usados na eletroforese capilar, no Brasil e nos EUA, é o mesmo.

Os cálculos para atingir os volumes do protocolo, para o equipamento ABI PRISM 3130 *Genetic Analyser* são os mesmos dos testes *in vitro* realizados no Brasil, mostrados no Quadro 4.

Nos experimentos *in vitro* realizados em ambos os países, utilizou-se a pesquisa haplotípica, para verificação de compatibilidade geográfica do haplótipo Y, realizada no banco de dados Y Chromosome Haplotype Reference Database (YHRD), pelo site <http://www.yhrd.org>, a partir de um haplótipo completo com 16 locais.

3.2 EXPERIMENTO *IN SITU*

O experimento *in situ* foi realizado apenas no Brasil.

3.2.1 Etapa Entomológica

Além dos laboratórios de Diptera do Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ/MNRJ) e no Laboratório de Entomologia Forense do Instituto de Criminalística Carlos Éboli, da Polícia Civil do Rio de Janeiro, especificados na etapa entomológica do experimento *in vitro* no Brasil, a etapa entomológica *in situ* também utilizou as dependências do Centro de Formação e Aperfeiçoamento (CFA) da Polícia Militar do Espírito Santo (PM-ES).

Adultos e imaturos da mosca *C. albiceps* (Figura 4) foram atraídos por carcaça em decomposição de uma fêmea do porco doméstico da espécie *Sus scrofa*, pesando 15,0 kg. Esse animal foi sacrificado numa área de floresta do CFA (20°18'26.31"S e 40°22'59.07"O), com três disparos de arma de fogo, a curta distância (entre 25 e 40 cm), efetuados com pistola da marca Taurus, calibre .40, modelo 940, sendo dois disparos na região cefálica e um na região abdominal. Depois de constatada a morte do animal, foi feita a inoculação de 3,0 mL de sêmen humano (de doador voluntário e anônimo) nas regiões anal e vaginal (1,5 mL em cada região), usando-se uma seringa plástica para essa ação, simulando a ejaculação do estuprador (Figura 25).



Figura 25 – Inoculação de 3,0 mL de sêmen humano no animal

Após a inoculação do sêmen humano, colocou-se sobre o animal uma jaula de metal (Figura 26), de formato retangular, medindo 90 cm de comprimento, 70,0 cm de largura e 50,0 cm de altura, com fundo cortado, forrada com tela de pinteiro, fixando-a no solo com 8 (oito) pinos de metal.



Figura 26 – Jaula de metal sobre a carcaça

A partir do 3º dia de decomposição, foram coletados imaturos nas regiões corporais e proximidades onde houve a inoculação de sêmen humano, até o 14º dia de decomposição (15 dias após a morte do animal), perfazendo as etapas inicial, moderada e avançada de decomposição cadavérica. Convencionou-se coletar um mínimo de 20 e um máximo de 80 imaturos, com prioridade para os indivíduos que estivessem presentes nas regiões anal e vaginal. Todas as pupas foram coletadas no solo, em um raio de até 2,5 metros do corpo, em uma profundidade aproximada de até 10 cm, utilizando uma pequena pá de jardinagem e uma peneira (nos dias de coleta em que o solo estava seco). As coletas foram identificadas com a data e tempo de decomposição (Figura 27).



Figura 27 – Identificação durante as coletas, especificando cada dia de decomposição

Similar aos experimentos *in vitro*, todos os imaturos coletados foram preservados em álcool 70% (Figura 13, experimento *in vitro*), onde permaneceram até o momento da dissecação. Todos os procedimentos de preparo da amostra para a dissecação dos imaturos e a dissecação propriamente dita seguiram a metodologia dos experimentos realizados *in vitro*, no Brasil e nos EUA.

As vísceras dissecadas foram mantidas em frascos de Eppendorf, de 2,0 mL, com 1,5 mL de tampão de extração por no mínimo 18 horas e no máximo 24 horas de tempo de incubação (Figura 13), para análises moleculares posteriores, similar às análises *in vitro* executadas nos EUA. Assim como nos testes *in vitro*, todos os processos de lavagem dos materiais de dissecação e das amostras se repetiram nos testes *in situ*.

3.2.2 Etapa Molecular *in situ*

Essa etapa foi desenvolvida nos mesmos laboratórios utilizados no experimento *in vitro* do Brasil. A pesquisa molecular seguiu a sequência normal de extração, quantificação, PCR e Eletroforese capilar, observada no experimento *in vitro* no Brasil, com algumas adaptações, que serão especificadas mais a frente.

a) Extração de DNA nos testes *in situ*: Ocorreu de forma similar ao experimento *in vitro* no Brasil, usando a técnica de fenol-clorofórmio (Figura 14). Porém, após a finalização do protocolo de extração orgânica, com a obtenção da fase aquosa, foi executada uma “segunda lavagem” das amostras, objetivando melhorar o produto final extraído.

Outra diferença do experimento *in vitro*, é que, após a extração orgânica, também foram usadas técnicas auxiliares para extração, purificação e concentração do DNA, usando o kit DNA IQ[®], da Promega, também usado no experimento dos EUA (Figura 23, teste *in vitro* nos EUA), e a técnica de Microcon (Millipore), respectivamente (Figura 28).

Na extração pelo kit DNA IQ[®] (Promega), o DNA é capturado por 7,0 µL de resina, composta por partículas magnéticas. Ao final, o DNA é lavado por 3 (três) vezes, com 300,0 µL de solução *Wash Buffer* e eluído em até 100,0 µL solução *Elution Buffer*. O uso dessa técnica permite a obtenção de DNA bastante purificado e em quantidades muito pequenas (cerca de 100,0 ng ou menos), sem a necessidade de novas diluições para o uso da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

O uso do kit DNA IQ[®] (Promega) seguiu as normas de uso do fabricante, de acordo com o protocolo a seguir (para amostras líquidas), adaptando-se alguns procedimentos:

- 1) Acrescentar 100,0 µL a 250,0 µL de *Lysis Buffer* por amostra. Utilizou-se 200,0 µL;
- 2) Adicionar de 7,0 µL de resina em suspensão;
- 3) Vortexar por 3 segundos em alta velocidade;

- 4) Deixar em repouso por 5 minutos em temperatura ambiente;
- 5) Vortexar por 2 segundos em alta velocidade;
- 6) Colocar o tubo imediatamente na estante magnética;
- 7) Retirar e descartar toda a solução, usando pipeta, sem perturbar a resina magnética;
- 8) Acrescentar 100,0 μL de *Lysis Buffer* por amostra; *OBS: Essa etapa foi repetida e acrescentou-se 7,0 μL de resina no lugar da solução de Lysis Buffer.*
- 9) Vortexar por 2 segundos em alta velocidade;
- 10) Colocar o tubo imediatamente na estante magnética;
- 11) Retirar e descartar toda a solução, usando pipeta, sem perturbar a resina magnética;
- 12) Acrescentar 100,0 μL de *1X Wash Buffer*;
- 13) Vortexar por 2 segundos em alta velocidade;
- 14) Colocar o tubo imediatamente na estante magnética;
- 15) Retirar e descartar toda a solução, usando pipeta, sem perturbar a resina magnética;
- 16) Repetir os passos 12 a 15 do protocolo mais 2 vezes (totalizando 3 lavagens);
- 17) Deixar o tubo aberto, por 5 minutos, para a resina secar, em temperatura ambiente (na estante magnética);
- 18) Acrescentar 25,0 - 100,0 μL de *Elution Buffer*. Nesse estudo, utilizou-se 50,0 μL ;
- 19) Fechar o tubo e vortexar por 2 segundos em alta velocidade;
- 20) Aquecer a 65° C por 5 minutos;
- 21) Vortexar por 2 segundos em alta velocidade;
- 22) Colocar o tubo imediatamente na estante magnética;
- 23) Retirar cuidadosamente, com pipeta, a solução contendo DNA e transferir para outro tubo, rotulado e identificado, onde será armazenado por 4° C (para períodos curtos) ou a temperaturas mais baixas, de -20° C até -70° C (para longos períodos).

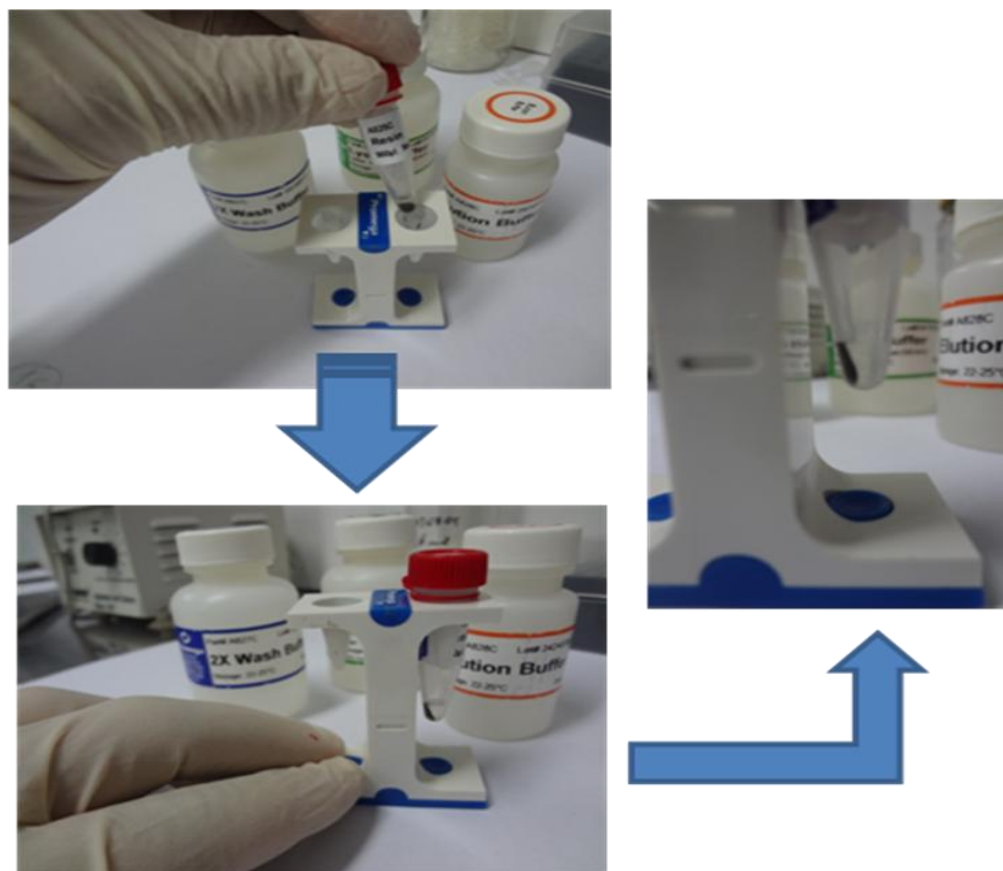


Figura 28 – Kit DNA IQ, da Promega

b) Quantificação de DNA nos testes *in situ*: Após a extração, as amostras foram quantificadas no aparelho Gene Quant (Figura 15), da Applied Biosystems (atualmente LIFE), antes da etapa de amplificação, similar ao observado na etapa molecular *in vitro* realizada no Brasil. Na etapa *in situ*, porém, também foi realizada a quantificação específica de DNA Y humano das amostras, após a quantificação de DNA total, com o equipamento 7500 Real Time PCR System da Applied Biosystems (atualmente Life), com as análises sendo feitas pelo programa 7500 System (Applied Biosystems), similar ao observado na etapa *in vitro* realizada nos EUA.

O volume mínimo de pipetagem foi de 10,0 μL , para que não houvesse comprometimento da acurácia no preparo dos padrões. Além disso, as ponteiros foram trocadas sempre entre as pipetagens das diluições.

Logo após os resultados iniciais da quantificação específica de DNA Y humano, as etapas de extração nº. 8 até nº.14 foram repetidas, como na etapa *in vitro*, para aumentar a qualidade do produto final. Adicionalmente, juntaram-se as amostras da primeira e segunda extração e concentrou-se o produto final com a técnica de Microcon (Centrifugal Filter Devices) (Figura 22). Em seguida, a quantificação Quantifiler Duo Human Male™ DNA foi repetida, nos moldes supracitados.

c) Amplificação de DNA nos testes *in situ*: A amplificação seguiu o mesmo protocolo daquela utilizada nas análises *in vitro* e o cálculo de volume de cada componente usado para a amplificação está especificado no Quadro 2.

As amplificações foram realizadas em termociclador GeneAmp PCR System 9700® (Applied Biosystems, atualmente Life Technologies), similar ao observado no experimento *in vitro* (Figura 16 e Quadro 3).

d) Eletroforese Capilar nos testes *in situ*: Os produtos da amplificação por PCR foram visualizados no sistema de eletroforese capilar ABI 3100 Genetic Analyzer (da Applied Biosystem, atualmente Life Technologies) (Figura 17), seguindo procedimentos similares aos observados na etapa *in vitro*.

Assim como nos experimentos *in vitro*, na reação de “branco” dos testes *in situ*, utilizou-se 10 μL de Hi-Di™ Formamide e os cálculos para atingir os volumes do protocolo também podem ser vistos no Quadro 4, das análises *in vitro*.

Também como nos experimentos *in vitro*, foi feita a pesquisa haplotípica nos testes *in situ*, para verificação de compatibilidade geográfica do haplótipo Y, realizada no banco de dados Y Chromosome Haplotype Reference Database (YHRD), pelo site <http://www.yhrd.org>, a partir de um haplótipo completo com 16 locais.

4. RESULTADOS

4.1 EXPERIMENTO *IN VITRO*

4.1.1 Experimento *in vitro* no Brasil

Nessa fase experimental, a temperatura (em graus Celsius), durante os oito dias de decomposição, variou de 23,5°C até 34,8°C. A umidade relativa do ar nesse período variou de 56,0% até 86,0%. As temperaturas mínima e máxima e a umidade relativa do ar, mínima e máxima, para cada dia de decomposição, podem ser observadas na Tabela 1 (Apêndice A)

Foram coletados, até o 8º dia (192 horas) de decomposição, 96 imaturos, sendo 81 larvas e 15 pupas. O número mínimo de imaturos coletados foi de 12 (doze) e o número máximo foi de 15 (quinze). O número de imaturos coletados, em cada dia de decomposição, pode ser observado na Tabela 2.

Tabela 2 – Quantidade de larvas e pupas coletadas, no experimento *in vitro* no Brasil, até o oitavo dia de decomposição.

TEMPO DE DECOMPOSIÇÃO	NÚMERO DE IMATUROS
48 horas (2º dia)	15 larvas e 0 pupas = 15 imaturos
72 horas (4º dia)	14 larvas e 0 pupas = 14 imaturos
96 horas (4º dia)	14 larvas e 0 pupas = 14 imaturos
120 horas (5º dia)	15 larvas e 0 pupas = 15 imaturos
144 horas (6º dia)	13 larvas e 0 pupas = 13 imaturos
168 horas (7º dia)	8 larvas e 4 pupas = 12 imaturos
192 horas (8º dia)	2 larvas e 11 pupas = 13 imaturos
Total de dias: 8 dias de decomposição	81 larvas e 15 pupas = <u>96 imaturos</u>

Os resultados da espectrofotometria, usando a relação 260/280nm e 260/230nm, demonstraram que algumas amostras apresentavam valores fora do limite de pureza, entre 1,8 e 2,0, confirmando a interferência proteica e fenólica, após ter sido feita uma segunda passagem pela extração orgânica. Os resultados provenientes de uma única passagem mostraram todas as amostras com interferência por proteínas e fenol. Além disso, foi detectada quantidade de DNA bem acima do ideal, nos testes de quantificação, ratificando a necessidade de realização de diluições seriadas, para a obtenção de valores ideais, que giraram em torno de 0,5 e 1,0 ng de DNA/ μ L, antes de se executar a etapa de amplificação por PCR. Os resultados da quantificação de DNA e dos valores de espectrofotometria para detecção de inibidores podem ser observados na Tabela 3 (Apêndice A).

O eletroferograma da amostra de referência, do sêmen doado para o uso nas pesquisas feitas no Brasil e nos EUA, pode ser observado na Figura 29 (Apêndice A). Os eletroferogramas das amostras do experimento *in vitro* no Brasil demonstraram que houve amplificação em quase todos os horários de decomposição testados, variando de 5 a 11 *loci* amplificados, quando se analisa as amostras individualmente. Os resultados das amostras combinadas demonstraram amplificação de 15 dos 16 *loci* testados.

A amostra 48h (2º dia de decomposição) obteve a amplificação de cinco locais genéticos: DYS389I , DYS385, DYS393, DYS391, DYS437, ou seja, 5 *loci* em 16 testados (Figura 30 – Apêndice A).

A amostra 72h (3º dia de decomposição) obteve a amplificação de 7 locais genéticos: DYS456, DYS458, DYS39, DYS635, DYS437, DYS438, DYS448, ou seja, 7 *loci* em 16 testados (Figura 31 – Apêndice A).

As amostras 120h, 144h e 192h foram as que obtiveram o maior número de *loci* amplificados nessa etapa da pesquisa.

A amostra 120h (5º dia de decomposição) obteve a amplificação de 11 locais genéticos: DYS456, DYS389I, DYS390, DYS458, DYS393, DYS391, DYS635, GATA H4, DYS437, DYS438, DYS448, ou seja, 11 *loci* em 16 testados (Figura 33 – Apêndice A).

A amostra 144h (6º dia de decomposição) obteve a amplificação de 11 locais genéticos: DYS456, DYS389I, DYS390, DYS458, DYS385, DYS393, DYS391, DYS439, GATA H4, DYS437, DYS438, ou seja, 11 *loci* em 16 testados (Figura 34 – Apêndice A).

A amostra 192h (8º dia de decomposição) obteve a amplificação de 11 locais genéticos: DYS456, DYS389 I, DYS389II, DYS385, DYS458, DYS393, DYS391, DYS439, DYS392, GATA H4, DYS437, DYS438, DYS448, ou seja, 11 *loci* em 16 testados (Figura 36 – Apêndice A).

Nos eletroferogramas das amostras 96h (4º dia de decomposição) e 168h (7º dia de decomposição) não foi observado êxito na amplificação de nenhum *locus* (Figuras 32 e 35 - Apêndice A).

A Tabela 4 apresenta os resultados individuais de amplificação das amostras, os resultados combinados, comparados com o haplótipo de referência. Os locais amplificados apresentaram total compatibilidade alélica com o haplótipo do doador da amostra de referência, sendo o local DYS19 o único onde não houve amplificação em nenhuma amostra testada.

Verificou-se uma evidente variação na sensibilidade de amplificação dos locais genéticos. Os *loci* que obtiveram maior sucesso de amplificação nesses testes foram DYS393, DYS437, DYS389I, DYS458 e DYS391. Por outro lado, os *loci* menos amplificados foram DYS389II, DYS390, DYS385, DYS439, DYS635 e DYS392.

Tabela 4 – Perfis haplotípicos de Y das amostras 48h, 72h, 120h, 144h e 192h, do experimento preliminar *in vitro*, realizado no Brasil, usando imaturos de *C. albiceps*.

LOCAIS GENÉTICOS	ALELOS DAS AMOSTRAS						
	TEMPO DE DECOMPOSIÇÃO					Haplótipo Questionado	Haplótipo Referência
	48h (2º dia)	72h (3º dia)	120h (5º dia)	144h (6º dia)	192h (8º dia)		
<u>DYS456</u>		16	16	16	16	16	16
<u>DYS389 I</u>	14		14	14	14	14	14
<u>DYS390</u>			23	23		23	23
<u>DYS389 II</u>					30	30	30
<u>DYS458</u>	15	15	15	15		15	15
<u>DYS19</u>							16
<u>DYS385</u>				15	15	15	15
<u>DYS393</u>	14	14	14	14	14	14	14
<u>DYS391</u>	10		10	10	10	10	10
<u>DYS439</u>					12	12	12
<u>DYS635</u>		22	22			22	22
<u>DYS392</u>				12	12	12	12
<u>GATA H4</u>			11	11	11	11	11
<u>DYS437</u>	15	15	15	15	15	15	15
<u>DYS438</u>		8	8	8		8	8
<u>DYS448</u>		20	20		20	20	20

Um resultado com um perfil haplotípico hipotético, apresentando total compatibilidade com o perfil de algum suspeito, indica a existência de uma mesma linhagem patrilínea entre o suspeito e a amostra coletada, o que pode, no mínimo, auxiliar a nortear as investigações policiais e/ou ajudar a libertar suspeitos inocentes. Ao ser pesquisado no banco YHRD (www.yhrd.org), o haplótipo de 15 locais, encontrado na pesquisa *in vitro* no Brasil, mostrou compatibilidade com apenas uma população miscigenada.

4.1.2 Experimento *in vitro* nos EUA

No experimento *in vitro* nos EUA, a temperatura, durante os 14 dias de decomposição, variou de 16,8°C até 30,0°C. A umidade relativa do ar variou de 45,0% até 100,0%. As temperaturas, mínima e máxima, e a umidade relativa do ar, mínima e máxima, para cada dia de decomposição, podem ser observadas na Tabela 5 (Apêndice A).

As coletas dos imaturos de *C. megacephala* tiveram início a partir do 3º dia de decomposição (72 horas). Nos dias anteriores (1º e 2º dia), não havia quantidade significativa de imaturos. Foram coletados, a partir do 3º dia até o 14º dia de decomposição, 208 imaturos, sendo 155 larvas e 53 pupas. Até o 6º dia de decomposição foram coletadas apenas larvas (a maioria de terceiro instar) e no 14º dia, apenas pupas. Fora coletadas larvas e pupas do 7º ao 13º dia de decomposição. A Tabela 6 apresenta a quantidade de imaturos de *C. megacephala*, coletados nos respectivos dias de coleta, no experimento executado nos EUA.

Tabela 6 – Quantidade de larvas e pupas de *C. megacephala*, coletadas no experimento *in vitro* nos EUA, até o 14º dia de decomposição.

TEMPO DE DECOMPOSIÇÃO	NÚMERO DE IMATUROS COLETADOS
72 horas (3º dia)	15 larvas e 0 pupa = 15 imaturos
96 horas (4º dia)	16 larvas e 0 pupa = 16 imaturos
120 horas (5º dia)	16 larvas e 0 pupa = 16 imaturos
144 horas (6º dia)	18 larvas e 0 pupa = 18 imaturos
168 horas (7º dia)	17 larvas e 3 pupas = 20 imaturos
192 horas (8º dia)	15 larvas e 4 pupas = 19 imaturos
216 horas (9º dia)	16 larvas e 4 pupas = 20 imaturos
240 horas (10º dia)	15 larvas e 5 pupas = 20 imaturos
264 horas (11º dia)	8 larvas e 7 pupas = 15 imaturos
288 horas (12º dia)	11 larvas e 6 pupas = 17 imaturos
312 horas (13º dia)	6 larvas e 9 pupas = 15 imaturos
336 horas (14º dia)	0 larvas e 15 pupas = 15 imaturos
Total de dias: 14 dias de decomposição	155 larvas e 53 pupas = <u>208 imaturos</u>

Os eletroferogramas, do experimento *in vitro* desenvolvido em Miami-FL (EUA), demonstraram que houve amplificação de Y-STR bem sucedida em quatro das amostras testadas: 72h (3º dia de decomposição), 120h (5º dia de decomposição), 168h (7º dia de decomposição) e 216h (9º dia de decomposição). Houve variação de 5 a 16 *loci* amplificados, ao se analisar as amostras individualmente. Das amostras que tiveram sucesso na amplificação, as de 72h (3º dia) e 120h (5º dia) de decomposição foram aquelas com maior quantidade de locos amplificados e a amostra 216h foi que obteve o menor número de locais. Os resultados das amostras combinadas demonstraram amplificação de 16 dos 16 *loci* testados.

As amostras 72h (3º dia) e 120h (5º dia) de decomposição obtiveram a amplificação de TODOS os locais genéticos testados, ou seja, 16 *loci*: DYS456, DYS389I, DYS390, DYS389II, DYS458, DYS19, DYS385, DYS393, DYS391, DYS439, DYS635, DYS392, GATA H4, DYS437, DYS438, DYS448 (Figuras 37 e 38 – Apêndice A).

A amostra 168h (7º dia) de decomposição obteve a amplificação de 13 locais genéticos: DYS456, DYS389I, DYS390, DYS458, DYS19, DYS385, DYS393, DYS391, DYS392, GATA H4, DYS437, DYS438, DYS448. (Figura 39 – Apêndice A).

A amostra 216h (9º dia) de decomposição obteve a amplificação de cinco locais genéticos: DYS458, DYS393, DYS391, DYS635, DYS437 (Figura 40 – Apêndice A).

Nos eletroferogramas das amostras 96h (4º dia), 144h (6º dia), 192h (8º dia) e a partir de 240h (10º dia) de decomposição não houve amplificação de nenhum *locus*.

Os resultados individuais de amplificação das amostras e os resultados combinados, comparados com o haplótipo de referência, referentes ao experimento *in vitro* nos EUA, Podem ser observados na Tabela 7.

No experimento desenvolvido nos EUA, 4 (quatro) locais genéticos obtiveram maior sucesso na amplificação: DYS458, DYS393, DYS391 e DYS437, com amplificação nas quatro amostras amplificadas: 72h (3º dia), 120h (5º dia), 168h (7º dia) e 216h (9º dia) de decomposição. Dos locais genéticos amplificados nesse experimento, os que obtiveram a menor taxa de amplificação foram DYS389II e DYS439, com sucesso em apenas duas amostras: 72h (3º dia) e 120h (5º dia) de decomposição.

Tabela 7 – Perfis haplotípicos de Y-STR humano, encontrado nas amostras 72h, 120h, 168h e 216h, do experimento preliminar *in vitro* nos EUA.

LOCAIS GENÉTICOS	HORÁRIOS E ALELOS DAS AMOSTRAS					
	72h (3º dia)	120h (5º dia)	168h (7º dia)	216h (9º dia)	Haplótipo Questionado	Haplótipo de Referência
<u>DYS456</u>	16	16	16		16	16
<u>DYS389 I</u>	14	14	14		14	14
<u>DYS390</u>	23	23	23		23	23
<u>DYS389 II</u>	30	30			30	30
<u>DYS458</u>	15	15	15	15	15	15
<u>DYS19</u>	16	16	16		16	16
<u>DYS385</u>	15	15	15		15	15
<u>DYS393</u>	14	14	14	14	14	14
<u>DYS391</u>	10	10	10	10	10	10
<u>DYS439</u>	12	12			12	12
<u>DYS635</u>	22	22		22	22	22
<u>DYS392</u>	12	12	12		12	12
<u>GATA H4</u>	11	11	11		11	11
<u>DYS437</u>	15	15	15	15	15	15
<u>DYS438</u>	8	8	8		8	8
<u>DYS448</u>	20	20	20		20	20

A Tabela 7 mostra a amplificação de 16 (oito) regiões STR do cromossomo Y no experimento *in vitro* nos EUA, num total de 16 regiões testado, levando-se em consideração a combinação dos tempos de coleta, sendo que em duas amostras, foram amplificados todos os locais individualmente (72h e 120h de decomposição). Houve coincidência também com relação aos *loci* menos amplificados nos experimentos *in vitro* realizados em ambos os países: Nos EUA, a menor taxa de amplificação foi dos locais genéticos DYS389II e DYS439, que foram dois dos seis locais menos amplificados no experimento realizado no Brasil (DYS389II, DYS390, DYS385, DYS439, DYS635 e DYS392).

Comparando com os resultados *in situ* no Brasil, os locais com maior (DYS393, DYS437, DYS389I, DYS458 e DYS391) e menor amplificação (DYS389II, DYS390, DYS385, DYS439, DYS635 e DYS392) também coincidem quase totalmente com os do experimento *in vitro* realizado nos EUA.

Os resultados analisados, individualmente e de forma combinada, demonstram que o experimento *in vitro* nos EUA obteve resultados de amplificação bem satisfatórios, pois 2 (duas) amostras (72h e 120h de decomposição) tiveram amplificação de todos os locais testados (16 *loci*), o que havia sido inédito até então nessa pesquisa, pois as amostras com maior sucesso antes desses resultados, tinham sido algumas amostras do experimento *in vitro* no Brasil, que havia demonstrado amplificação máxima, levando em consideração as amostras individualmente, de 11 *loci*. A segunda amostra (168h de decomposição = 7 dias) com melhor desempenho individual, das pesquisas feitas nos EUA, obteve amplificação de 13 locais genéticos, ou seja, foi superior a maior amplificação individual dos testes *in vitro* no Brasil, com 11 locais genéticos.

4.2 EXPERIMENTO *IN SITU*

No experimento *in situ* no Brasil, a temperatura, durante os 14 dias de decomposição, variou de 19,2°C até 30,6°C e a umidade relativa do ar de 46,0% até 89,0%. As temperaturas mínima e máxima e a umidade relativa do ar, mínima e máxima, para cada dia de decomposição, podem ser observadas na Tabela 8 (Apêndice B)

As coletas dos imaturos tiveram início a partir do 4º dia de decomposição (96 horas), pois nos dias anteriores (1º, 2º e 3º dia) não havia quantidade significativa de imaturos. Foram coletados, até o 14º dia de decomposição, 446 imaturos, sendo 289 larvas e 157 pupas.

Até o 8º dia de decomposição, foram coletadas apenas larvas (a maioria de terceiro instar) e, a partir do 11º dia, apenas pupas, como mostrado na Tabela 9.

A Tabela 10 (Apêndice B) apresenta os resultados da quantificação por espectrofotometria, mostrando a concentração de DNA nas amostras e os respectivos valores da absorbância 260/280nm e 260/230nm.

Tabela 9 – Quantidade de larvas e pupas de *C. albiceps*, coletadas no experimento *in situ* no Brasil, até o 14º dia de decomposição.

TEMPO DE DECOMPOSIÇÃO	NÚMERO DE IMATUROS COLETADOS
96 horas (4º dia)	51 larvas e 0 pupas = 51 imaturos
120 horas (5º dia)	53 larvas e 0 pupas = 53 imaturos
144 horas (6º dia)	76 larvas e 0 pupas = 76 imaturos
168 horas (7º dia)	28 larvas e 0 pupas = 28 imaturos
192 horas (8º dia)	32 larvas e 0 pupas = 32 imaturos
216 horas (9º dia)	48 larvas e 1 pupa = 49 imaturos
240 horas (10º dia)	11 larvas e 28 pupas = 39 imaturos
264 horas (11º dia)	0 larvas e 18 pupas = 18 imaturos
288 horas (12º dia)	0 larvas e 23 pupas = 23 imaturos
312 horas (13º dia)	0 larvas e 57 pupas = 57 imaturos
336 horas (14º dia)	0 larvas e 20 pupas = 20 imaturos
Total de dias: 14 dias de decomposição	289 larvas e 157 pupas = <u>446 imaturos</u>

Nesse experimento, os eletroferogramas demonstraram que houve amplificação nas amostras do 6º dia até o 14º dia de decomposição, ou seja, de 144h até 336h após a morte do animal, com exceção da amostra 264h, onde nenhum local foi amplificado. Houve variação de 1 a 3 *loci* amplificados, ao se analisar as amostras individualmente. A amostra 240h foi a que obteve maior quantidade de locos amplificados e as amostras 216h, 288h e 312h foram as que obtiveram menor número. Os resultados das amostras combinadas demonstraram amplificação de 8 dos 16 *loci* testados.

A amostra 144h (6º dia de decomposição) obteve a amplificação de dois locais genéticos: DYS456 e DYS458 (Figuras 41 e 42 – Apêndice B).

A amostra 168h (7º dia de decomposição) obteve a amplificação dos dois locais genéticos, observados na amostra 144h: DYS456, DYS458 (Figuras 43 e 44 – Apêndice B).

A amostra 192h (8º dia de decomposição) obteve a amplificação de dois locais genéticos: DYS456 e DYS392 (Figuras 45 e 46 – Apêndice B).

A amostra 216h (9º dia de decomposição) obteve a amplificação de um local genético: DYS635 (Figura 47 – Apêndice B).

A amostra 240h (10º dia de decomposição) obteve a amplificação de três locais genéticos: DYS456, DYS458 e DYS439 (Figuras 48, 49 e 50 – Apêndice B).

A amostra 288h (12º dia de decomposição) obteve a amplificação de um local genético: DYS389 I (Figura 51 – Apêndice B).

A amostra 312h (13º dia de decomposição) obteve a amplificação de um local genético: DYS385 (Figura 52 – Apêndice B).

A amostra 336h (14º dia de decomposição) obteve a amplificação de dois locais genéticos: DYS389 II e DYS439 (Figura 53 – Apêndice B).

Nos eletroferogramas das amostras 96h (4º dia de decomposição) e 120h (5º dia de decomposição) não foi observado êxito na amplificação de nenhum *locus* além da amostra 264h, citada anteriormente. A Tabela 11 apresenta os resultados individuais de amplificação das amostras, os resultados combinados, comparados com o haplótipo de referência, relativos ao experimento *in situ* no Brasil.

Nessa etapa do experimento, os locais que obtiveram maior sucesso na amplificação foram DYS456 e DYS458, com amplificação em quatro e três amostras, respectivamente. Dos locais genéticos amplificados no experimento *in situ*, os que obtiveram a menor taxa de amplificação foram DYS389II, DYS390, DYS385, DYS439, DYS635 e DYS392.

5. DISCUSSÃO

Nas análises *in vitro* dos imaturos (larvas e pupas) de *C. albiceps*, todas as amostras analisadas foram amplificadas com sucesso, exceto as amostras de 96h e 168h de decomposição. Isso pode ter ocorrido devido à interferência de contaminantes diversos e/ou também pela distribuição desigual do sêmen na carne. Vários resultados dos testes *in vitro* com *C. albiceps* foram obtidos de amostras com decomposição bastante avançada, o que poderia ser explicado, pelo menos em parte, por uma exposição dessas larvas a quantidades mais elevadas de sêmen, já que permaneceram em contato com o substrato de postura por um período mais longo que as demais. Ressalta-se que não houve aderência externa de sêmen, já que todos os imaturos foram devidamente lavados antes da dissecação e retirada visceral.

Para fins investigativos e melhoria na materialização de provas, o fato de termos tido grande sucesso de amplificação nas amostras com decomposição avançada, corrobora ainda mais para a indicação do bom potencial dessa técnica na área criminal, pois a medida que o tempo passa, após o ato criminoso, menos vestígios estarão disponíveis para os peritos criminais e médicos legistas.

De forma similar, o sucesso na amplificação de amostras em decomposição avançada também foi observado no experimento desenvolvido com imaturos de *C. megacephala* (nos EUA), reforçando ainda mais a sugestão do grande potencial dessa técnica para aplicação forense em crimes sexuais onde a vítima é assassinada e encontrada dias após o homicídio, já em estado de putrefação. Isso porque, encontrar a vítima muito tempo após a sua morte constitui um fator limitante em qualquer investigação criminal, sendo muitas vezes um fator impeditivo para a obtenção de provas materiais, principalmente de autoria do delito.

A experiência pericial demonstra que existe uma razão claramente inversa entre tempo decorrido após o crime e a quantidade de provas adquiridas, ou seja, quanto mais o tempo passa, após o homicídio, menores são as chances de se encontrar vestígios importantes para desvendar o crime, principalmente quando se diz respeito à autoria. Dessa forma, a recuperação de DNA humano a partir de imaturos de moscas presentes em corpos decompostos, pode ser uma excelente ferramenta para peritos criminais e médicos legistas.

Comparando-se com o estudo desenvolvido por CLERY (2001), o presente estudo demonstrou resultados bem mais precisos. Em uma pesquisa sobre a estabilidade do antígeno prostático específico (PSA) e subsequente tipificação de Y-STR humano, a partir de imaturos de *Lucilia sericata*, CLERY (2001), há mais de uma década atrás, testou a amplificação *in vitro* de apenas quatro *loci* de Y-STR (DYS19, DY389I, DYS389II e DYS390), usando uma proporção de sêmen de 4 a 12 vezes superior a que foi utilizada no presente estudo, além de manter a temperatura controlada, incomum numa cena de morte violenta e utilizar apenas 2 (dois) horários para coleta dos imaturos (48h e 145h), conseguindo resultado em apenas 1 (uma) amostra de 48h de decomposição, representando uma decomposição bem inicial.

Ao contrário de CLERY (2001) e mesmo com temperatura e umidade não controlada (regra geral para crimes sexuais), foram testados aqui 16 *loci* de Y-STR, usando uma proporção de sêmen bem abaixo da média ejaculada por um homem normal que, de acordo com GUZICK *et al.* (2001) é de 4,5 mL (nos testes, utilizou-se 3,0 mL). Ressalta-se também que foram usados no presente estudo 7 (sete) horários diferentes de decomposição (48h, 72h, 96h, 120h, 144h, 168h e 192h) no teste *in vitro* com *C. albiceps* (no Brasil), e 13 horários, no teste *in vitro* com *C. megacephala* (nos EUA) e no teste *in situ* com *C. albiceps* (no Brasil), obtendo-se sucesso de amplificação de até 16 *loci* em 16 testados.

Esses diferenciais ajudam a fortalecer a necessidade de implantar essa técnica na rotina pericial.

Obviamente, um dos principais motivos desse resultado satisfatório (comparado aos resultados de CLERY, em 2001), relaciona-se à melhoria das técnicas e reagentes, como o poder de amplificação dos kits atualmente usados na rotina dos laboratórios de DNA forense, os equipamentos mais sofisticados de eletroforese capilar e a diferença entre as técnicas de extração usadas nos dois estudos (CLERY utilizou apenas a extração com Chelex), contribuindo para um produto final de extração mais amplificável.

Nos experimentos *in vitro* e *in situ*, com imaturos de *C. albiceps* e *C. megacephala*, foi feita a construção do perfil haplotípico hipotético usando a combinação dos perfis parciais obtidos, o que seria plenamente possível e bem previsível na prática pericial. Isso porque, em nenhum dos experimentos realizados, foram detectados perfis de mistura e, do ponto de vista criminalístico, o perito criminal, presente na cena de crime, coletaria amostras bastante heterogêneas, com imaturos em diversos estágios de desenvolvimento, ocorrendo uma mistura das amostras coletadas. O mesmo seria válido para a coleta nos Departamentos e Institutos Médico-Legais. No ensaio em questão, essas amostras foram analisadas de forma independente, com coletas a cada 24 horas de decomposição, mas em um caso real de crime, com vítima encontrada em decomposição, haveria apenas uma coleta, logo após o cadáver ser encontrado e, conseqüentemente, as análises seriam feitas usando diversos imaturos com idades distintas.

Mesmo observando-se apenas os resultados das amostras isoladamente, também houve êxito, principalmente nos experimentos *in vitro*. Os resultados individuais obtidos no experimento *in vitro* no Brasil (com imaturos de *C. albiceps*) em 3 amostras (120h, 144h e 192h) tiveram amplificação de 11 locais genéticos cada um. As observações da quantidade de perfis amplificados, tanto individualmente (considerando cada amostra)

quanto com as amostras combinadas, indicam que os melhores resultados de amplificação foram os obtidos no experimento realizado com *C. megacephala* (nos EUA), onde houve recuperação completa do haplótipo em duas amostras (72h e 120h de decomposição).

Vale ressaltar que os resultados do experimento *in vitro*, mesmo analisando as amostras individualmente, já poderiam ser usados como haplótipo mínimo nos dois principais parâmetros mundiais. Apesar de já terem sido encontrados e descritos mais que 400 *loci* de Y-STR (CHIANCA, 2013), o haplótipo mínimo para o European Minimal Haplotype é de 9 *loci* e as recomendações do Scientific Working Group on DNA Analysis Methods (SWGDM) estabelecem 11 *loci*, que é a soma dos 9 anteriores mais DYS438 e DYS439 (MULERO *et al.*, 2006; THOMPSON *et al.*, 2013). Esses locais sustentam inclusive os bancos de dados genéticos que utilizam o sistema CODIS (*Combined DNA Index System*), estabelecido em mais de 60 países, onde existem mais de 36 milhões de perfis genéticos já catalogados, de acordo com as últimas estatísticas fornecidas, em julho de 2013, pelo INTERPOL Global DNA Profiling Survey. Atualmente, de 190 países-membros, 135 utilizam perfis de DNA em investigações criminais, incluindo o Brasil (INTERPOL, 2013).

A diferença da técnica de extração utilizada no experimento *in vitro* desenvolvido nos EUA, com imaturos de *C. megacephala*, pode ajudar a justificar os resultados mais robustos obtidos nessa etapa. Esse experimento foi o único dos testes realizados nesse estudo a usar extração baseada em coluna de sílica, totalmente automatizada, com o aparelho EZ1 Advanced XL (Qiagen). CLERY utilizou extração por Chelex e nos experimentos *in vitro* e *in situ*, realizados no Brasil, com imaturos de *C. albiceps*, o principal método de extração foi a técnica de fenol-clorofórmio (extração orgânica).

Alguns estudos comparativos já constataram a eficiência da extração automatizada com coluna de sílica. Pesquisadores americanos fizeram a comparação entre a extração

automatizada, usando três plataformas distintas: Automate Express (Life Technologies), EZ1 Advanced XL (Qiagen) e o Sistema de Extração de DNA Maxwell 16 Bench-top (Promega), com o uso de vários tipos de amostras diferentes: sangue, sêmen, ossos, cabelos com raiz, células epiteliais, dentes e guimbas de cigarro. Nessa pesquisa, os resultados demonstraram que o equipamento EZ1 Advanced XL foi o que obteve maior rendimento, na maioria das amostras testadas, além de apresentar a maior flexibilidade nas análises. Os três equipamentos testados se mostraram bem eficientes na limpeza e retirada de inibidores das amostras (DAVIS *et al.*, 2012).

Outro ponto importante, além da diferença de extração, no experimento desenvolvido nos EUA, foi o uso da quantificação específica de DNA das amostras, com o equipamento 7500 Real Time PCR System (Life Technologies), se mostrou uma excelente ferramenta, facilitando a escolha das amostras a serem processadas e as melhores diluições para a obtenção de resultados, otimizando o custo e o uso do tempo para as análises posteriores. Nos testes *in vitro* no Brasil, foi executada apenas a quantificação total (inespecífica) de DNA, tendo sido necessário fazer várias diluições por amostra até a obtenção de resultados favoráveis, o que se mostra como uma prática demorada, custosa e que seria inviável para a rotina laboratorial forense. Por isso, é recomendável, nos casos em que forem analisadas amostras como as que foram usadas aqui, a utilização da quantificação pela técnica de RT-PCR (RT = Real Time) nas rotinas dos laboratórios de DNA forense, para estudos de Y-STR.

Os resultados do experimento *in situ*, com oito locais amplificados, quando comparados com os observados nos testes *in vitro*, obtiveram sucesso de amplificação inferior, o que já era esperado. Isso porque, no experimento *in vitro* com *C. albiceps* e com *C. megacephala* obteve-se perfil completo ou quase completo, mas a proporção de sêmen na carne (3,0 mL de sêmen em 600g de carne) no experimento *in vitro* foi muito diferente

da que foi usada na etapa experimental *in situ*, onde foi mantido o volume de sêmen, mas a quantidade de carne, referente ao peso do animal abatido, foi bem maior, ou seja, 3,0 mL de sêmen em 15,0 Kg de carne. Isso significa que no experimento *in situ* foi usada uma proporção de sêmen 25 vezes menor do que no experimento *in vitro*. Com isso, a dificuldade de recuperação de DNA no teste *in situ* também se torna bem maior. Comparado ao experimento desenvolvido por CLERY (2001), citado anteriormente, essa diferença na proporção de sêmen do experimento *in situ* é maior ainda: de 100 a 300 vezes.

Cada célula haploide (n) íntegra (espermatozóide) apresenta em torno de 3,0 pg de DNA. Em média, um homem normal e fértil apresenta $56,0 \times 10^6$ (56 milhões) de espermatozóides por mL de sêmen (GUZICK *et al.* 2001). Logo, teríamos em cada mL de sêmen 56 milhões de espermatozóides x 3,0 pg de DNA, que daria 168 µg de DNA por mL de sêmen. Como nesse estudo foram utilizados 3,0 mL de sêmen, teremos um total de 504 µg de DNA humano em cada experimento.

Se pensarmos que no experimento *in vitro* foram usados 600 gramas de carne moída e no experimento *in situ* 15.000 gramas (o animal pesava cerca de 15,0 kg), é de se esperar que exista uma dificuldade bem maior para obtenção de resultados satisfatórios, não apenas pela “diluição” maior do sêmen nos testes *in situ*, mas também pela possibilidade maior de inibidores e/ou interferentes de PCR. Deve-se frisar também que, além da enorme diferença na proporção de sêmen utilizado, o experimento *in situ* foi desenvolvido em área de floresta, com o cadáver do animal experimental ficando exposto a todos intempéries que afetam um corpo numa cena de crime real. Além disso, a maioria das pupas foi encontrada embaixo do solo, em um raio de até 3,0 metros do cadáver e numa profundidade aproximada de até 10 cm da superfície.

É importante ressaltar também que o sistema CODIS, usado pelo FBI e diversos países, incluindo o Brasil, tem exigência mínima de 7 locais genéticos. Como no

experimento *in situ* houve amplificação de 8 (oito) *loci*, seria o suficiente para nortear investigações de autoria e, mais importante ainda, libertar suspeitos inocentes.

Outro fator importante, com relação ao experimento *in situ*, é que em quase todos os casos de estupro com penetração vaginal e/ou anal, ocorrem lesões nessa região, com saída de fluido biológico, principalmente sangue. Também ocorrem, com frequência, lesões em outras partes do corpo da vítima, provocadas pela violência perpetrada pelo estuprador. Isso facilita a atração de uma quantidade maior de moscas para a postura de ovos. A ausência dessas lesões na região vaginal e anal dos animais usados nessa fase experimental parece ter reduzido o número de insetos nessas regiões de interesse, quando se compara com as regiões de entrada e saída de projéteis de arma fogo, usados para sacrificar o animal. Vários autores já relataram a preferência das moscas pela postura dos ovos em orifícios naturais úmidos e lesões corporais, atraídas pelos fluidos liberados desses locais (CAMPOBASSO e INTRONA, 2001, BYRD e CASTNER, 2012).

Uma boa amplificação depende, dentre outros fatores, da qualidade do DNA extraído, que pode sofrer grande influência de contaminantes e interferentes diversos, como proteínas, ácido ribonucleico (RNA) e o próprio fenol, usado na extração orgânica. O produto final das amplificações *in situ* foi melhor em todas as amostras onde foi feita a dupla e/ou tripla passagem na extração orgânica e combinando esse método com outros, como IQ (da Promega) e Microcon (da Millipore), para a purificação e concentração do DNA. Isto foi necessário, pois nos testes *in situ*, o produto final da extração apresentava-se visivelmente muito mais “sujo” que o material obtido dos testes *in vitro*. Portanto, para amostras de imaturos de moscas cadavéricas o procedimento de “limpeza extra” é recomendado na etapa de extração de DNA.

Outro aspecto importante no experimento *in situ* é a possibilidade da grande quantidade de DNA indesejado (DNA do imaturo da mosca, DNA do animal abatido,

DNA bacteriano, DNA de fungos, etc.) interferirem na amplificação. Realmente, foram encontradas concentrações altíssimas de DNA em todas as amostras analisadas (entre 96,4 ng/ μ L e 161,84 ng/ μ L – o ideal seriam valores entre 0,5 ng/ μ L e 1,0 ng/ μ L), bem maiores que as observadas nos testes *in vitro*, efetuando-se diluições seriadas para a obtenção de concentrações ideais. Por isso, nos testes moleculares preliminares *in situ*, em que foi usada apenas a extração por fenol-clorofórmio, sem dupla ou tripla passagem e sem o uso de Microcon, não houve amplificação em nenhuma das amostras testadas *in situ*.

De acordo com alguns pesquisadores, a amplificação de DNA Y-STR, proveniente de amostras de vítimas de estupro, estando decomposto ou não, deveria ser uma rotina nos laboratórios forenses, por permitir a detecção de perfis masculinos presentes na amostra em quantidades menores que às requeridas para amplificação de STRs autossômicos (SIBILLE *et al.*, 2002; ROEWER, 2009). Pesquisas recentes, com o uso do kit PowerPlex[®]Y23 (Promega), demonstraram a grande sensibilidade do limiar de amplificação dos *loci* Y-STR. Esses pesquisadores conseguiram perfis completos de DNA Y-STR em amostras com 62,5 picogramas (pg) de DNA masculino, misturado a 400,0 nanogramas (ng) de DNA feminino. O mesmo ocorreu quando havia 125,0 pg de DNA masculino em 3000,0 ng (3,0 μ g) de DNA feminino (THOMPSON *et al.*, 2013).

Os kits moleculares usados no presente estudo amplificam amostras com concentrações em torno de 500 pg (0,5 ng). Isso indica que se a técnica utilizada aqui for repetida com o uso de kits moleculares mais avançados, os resultados de amplificação podem ser melhores ainda, pois apresenta sensibilidade bem maior.

Normalmente, o cromossomo Y é utilizado na área forense apenas para indicar a linhagem patrilínea de um indivíduo ou um suspeito de crime sexual, o que já, por si só, ajuda bastante a nortear a investigação e reduzir as chances de erros, além de possibilitar a soltura de indivíduos inocentes. Porém, existem estudos apontando que, ao contrário do

que sempre foi afirmado, podem existir diferenças significativas entre alguns locos do cromossomo Y, denominados RM Y-STR (RM = Rapidly Mutating), em homens pertencentes a uma mesma linhagem patrilinear. Das regiões RM Y-STR descobertas, 13 delas correspondem a locos já usados rotineiramente nas análises forenses do cromossomo Y humano (GOEDBLOED *et al.*, 2009).

Com o avanço das pesquisas usando RM Y-STR poderemos ter uma grande mudança da utilização do cromossomo Y, que passará de indicador da linhagem patrilinea, para identificação individual de suspeitos com essa mesma linhagem (BALLANTYNE *et al.*, 2010). Em estudos posteriores, BALLANTYNE *et al.* (2012) ratificaram a expectativa positiva de se usar essas regiões RM, que apresentam uma alta taxa de mutação no cromossomo Y, para aplicação forense, auxiliando na investigação e individualização de autores de crimes sexuais, principalmente naqueles casos mais complexos, em que existem dois ou mais homens suspeitos de crime sexual, pertencentes a uma mesma linhagem patrilinea (BALLANTYNE *et al.*, 2012).

Outro fator importante para a melhoria e otimização da aplicabilidade dessa técnica, na rotina pericial, seria a possibilidade de eliminar a fase de dissecação dos imaturos, que é bastante trabalhosa e demorada. Isso poderia ser conseguido com o aprimoramento da etapa de extração do DNA diretamente dos imaturos íntegros, sem a retirada visceral de larvas e pupas coletadas. Assim, seriam aceleradas as análises, trazendo resultados mais rápidos, crucial para a casos de crimes sexuais, pois quanto antes autores desses crimes hediondos forem retirados das ruas, menor a exposição de futuras vítimas e maior a segurança de todos.

O fato de haver ausência de amplificação apenas do *locus* DYS19, em todas as amostras testadas *in vitro* no Brasil, corrobora com resultados de algumas pesquisas realizadas para testar a sensibilidade de amplificação dos locais genéticos, usados

normalmente em kits da área forense no mundo. Nesses estudos, observou-se que DYS19 foi um dos quatro locos com a maior taxa de ausência de amplificação (MAIQUILLA *et al.*, 2011). De acordo com esses autores, o sucesso da amplificação de um local não está relacionado significativamente com o tamanho dos amplicons testados. BEN ZAKOUR *et al.* (2004) demonstraram que um dos principais fatores responsáveis pela diferença da taxa de amplificação entre os locais genéticos parece ser a diferença na hibridização dos primers (iniciadores) de cada *locus*.

Em todos os experimentos desenvolvidos no presente estudo houve diferença na sensibilidade de amplificação entre os locais testados. Assim como nos testes *in vitro* com *C. albiceps*, verificou-se também no experimento com *C. megacephala* (em solo americano) uma evidente variação na sensibilidade dos locais genéticos amplificados. No experimento desenvolvido nos EUA, quatro locais genéticos obtiveram maior sucesso na amplificação: DYS458, DYS393, DYS391 e DYS437, com sucesso nas quatro amostras amplificadas: 72h (3º dia), 120h (5º dia), 168h (7º dia) e 216h (9º dia) de decomposição. Esses mesmos *loci* estavam entre os 5 (cinco) com maior sucesso de amplificação nos testes *in vitro* desenvolvidos com imaturos de *C. albiceps* (no Brasil), que foram DYS393, DYS437, DYS389I, DYS458 e DYS391.

A variação na sensibilidade de amplificação dos *loci* também foi observada nos testes *in situ*, onde alguns locais tiveram maior amplificação (DYS393, DYS437, DYS389I, DYS458 e DYS391) e outros locais foram menos amplificados (DYS389II, DYS390, DYS385, DYS439, DYS635 e DYS392). Isso condiz com os resultados de experimentos *in vitro*.

Semelhante aos resultados apresentados no estudo em questão, pesquisas com marcadores Y-STRs humanos, com espermatozoides provenientes de mulheres vítimas de

crimes sexuais, realizados na década passada, em um hospital da França, demonstraram que DYS393 foi o *locus* com maior sucesso na amplificação (SIBILLE *et al.*, 2002).

Em um estudo feito nas Filipinas, com 154 crianças do sexo feminino, vítimas de estupro, constatou-se que os *loci* DYS391, DYS393 e DYS437 foram os que obtiveram maior sucesso na amplificação, similar à pesquisa em questão. Esses mesmos pesquisadores constataram também que os *locos* DYS385, DYS392 e DYS428 foram os menos efetivos, corroborando com os resultados encontrados aqui (MAIQUILLA *et al.*, 2011).

Pesquisas moleculares, com Y-STR de amostras obtidas de vítimas de estupro, sem detecção de espermatozoides, mostrou que DYS391 foi o *locus* amplificado com maior sucesso, seguido dos *loci* DYS393, DYS389I, DYS458 e DYS437, sendo os de menor eficiência os *loci* DYS392 e DYS439, que também foram pouco efetivos em nosso estudo (CHIANCA, 2013).

Obviamente, é aconselhável que se faça como primeira opção a amplificação de STRs autossômicos, caso a análise citológica encontre espermatozoides íntegros na amostra (PRINZ *et al.*, 2007), o que não seria comum num corpo em decomposição. Os resultados satisfatórios obtidos nas pesquisas realizadas *in vitro* e *in situ*, com duas espécies diferentes de moscas cadavéricas, sendo os testes *in vitro* realizados em dois países e condições climáticas diferentes, ratificaram ainda mais o potencial e promissor uso da técnica de recuperação de DNA humano Y-STR, a partir de imaturos de moscas, nos casos de estupro com vítima encontrada em decomposição inicial, intermediária e avançada.

6. CONCLUSÕES

A recuperação e identificação de DNA Y-STR humano, a partir de imaturos de Diptera é plenamente possível. Houve sucesso nas ampliações, nas condições ambientais observadas nos três experimentos realizados nesse estudo: *in vitro* e *in situ* no Brasil e *in vitro* nos EUA.

Os resultados das análises demonstraram a possibilidade de se obter material genético humano amplificável para Y-STR do trato digestivo de imaturos de dípteros (larvas e pupas), de *C.albiceps* (nos experimentos executados no Brasil) e de *C. megacephala* (no experimento desenvolvido nos EUA) em condições similares às observadas numa cena de crime sexual, com vítima em estado de decomposição inicial, moderada e avançada.

De acordo com os resultados observados, é possível afirmar que, nas condições em que esse estudo foi desenvolvido, o tempo de recuperação de DNA Y-STR a partir de imaturos de *C. albiceps* foi de 8 dias (192 horas de decomposição), com 11 locais amplificados, nos testes *in vitro*. Nos testes *in situ* para essa espécie obtivemos amplificação parcial com até 14 dias de decomposição. Já para *C. megacephala*, a amplificação máxima ocorreu com 9 dias (216 horas de decomposição).

O fato de ter havido sucesso na amplificação dos locais genéticos usando duas espécies diferentes de Diptera, ambas predominantes em cadáveres em regiões dos seus respectivos países (Brasil e EUA), ratificaram a grande potencialidade dessa técnica na aplicação criminal e na rotina dos laboratórios forenses.

É necessária a continuidade dos estudos relacionados a essa técnica, visando à melhoria dos resultados práticos. A quantidade mínima e máxima de imaturos coletados nos locais de crime, presentes nos cadáveres humanos decompostos, deve ser alvo de mais

pesquisas, adequando à quantidade média ideal de coleta com o que possa ser aplicado na prática pericial. Isso deve levar em conta aspectos como tempo médio gasto, no caso das perícias de locais com vítima em decomposição, demanda reprimida desses tipos de crime e a capacidade estrutural disponível.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAMS, N., DEVRIES, K., WATTS, C., PALLITO, C., PETZOLD, M., SHAMU, S., GARCIA-MORENO, C. 2014. Worldwide prevalence of non-partner sexual violence: a systematic review. *Lancet* 383: 1648–54.

AMES, A., TURNER, B. DANIEL, B. 2006. The use of mitochondrial cytochrome oxidase I gene (COI) to differentiate two UK blowfly species – *Calliphora vicina* and *Calliphora vomitoria*. *Forensic Sci. Int.*, 164: 179-182.

AL-MESBAH, H., MOFFATT, C., EL-AZAZY, O. M. E., MAJEED Q. A. H. 2012. The decomposition of rabbit carcasses and associated necrophagous Diptera in Kuwait. *Forensic Sci. Int.*, 217: 27-31.

AMENDT, J.; RICHARDS, C.S.; CAMPOBASSO, C. P.; ZEHNER, R.; HALL, M.J.R. 2011 Forensic entomology: applications and limitations – Review. *Forensic Sci. Med. Pathol.* 7: 379-392.

AMENDT, J.; KRETTEK, R., ZEHNER, R. 2004. Forensic Entomology. *Naturwissenschaften*.91: 51–65.

BALLANTYNE, K. N., GOEDBLOED, M., FANG, R. 2010. Mutability of Y-chromosomal microsatellites: rates, characteristics, molecular bases, and forensic implications. *Am. J. Hum. Gen.*, 87: 341–353.

BALLANTYNE, K. N., KEERL, V., WOLLSTEIN, A., CHOI, Y., ZUNIGA, S. B., RALF, A. VERMEULEN, M., KINIJJF, P., KAYSER, M. 2012. A new future of forensic Y-chromosome analysis: rapidly mutating Y-STRs for differentiating male relatives and paternal lineages. *Forensic Sci. Int. - Gen*, 6: 208–218.

BARRIOS, M. WOLFF, M. 2011. Initial study of arthropods succession and pig carrion decomposition in two freshwater ecosystems in the Colombian Andes. *Forensic Sci. Int.*, 212: 164-172.

BENECKE, M., E. JOSEPHI; ZWEIHOFF, R. 2004. Neglect of the elderly: forensic entomology cases and considerations. *Forensic Sci. Int.*, 146: 195–199.

BEN ZAKOUR, N., GAUTIER, M., ANDONOV, R. LAVENIER, D., COCHET, M. F., VEBER, P., SOROKIN, A., LOIR, Y. 2004. GenoFrag: software to design primers optimized for whole genome scanning by long-range PCR amplification. *Nucleic Acids Res.*, 32 (1): 17-24.

BOEHME, P.; AMENDT, J.; DISNEY, R. H. L. 2010. Molecular identification of carrion-breeding scuttle flies (Diptera: Phoridae) using COI barcodes. *Int J. Legal Med.*, versão on-line DOI 10.1007/s00414-010-0429-5.

BUTLER, J.M. 2005. *Forensic DNA Typing: Biology, Technology, and Genetics of STR Markers*. Elsevier Academic Press. New York – USA.

BYRD, J. H., CASTNER, J. L. 2012. *Forensic Entomology. The Utility of Arthropods in Legal Investigations*. Florida-USA: CRC Press 2nd ed. 705 p.

CAMPOBASSO, C. P., INTRONA, F. 2001. The forensic entomologist in the contexto of the forensic pathologist's roles. *Forensic Sci Int*, 120: 132-139.

CARRACEDO, A., SÁNCHEZ-DÍAZ, P., 2000. *Forensic genetics: from classical serological genetic markers to DNA polymorphis analysed by microarray technology em Handbook of analytical separations. Elsevier*. 1st edition, vol 2, Amsterdam.

CARVALHO, C. J. B.; MELLO-PATIU, C. A. 2008. Keys to the adults of the most common forensic species of Diptera in South America. *Rev Bras Entomol*, 52: 390-406

CARVALHO, F., DADOUR, I.R., GROTH, D.M. E HARVEY, M.L. 2005. Isolation and Detection of Ingested DNA from the Immature Stages of *Calliphora dubia* (Diptera: Calliphoridae), *Forensic Sci Med Pathol*, 1: 261-266.

CARVALHO, L. M. L.; THYSSEN, P. J.; LINHARES, A. X. ; PALHARES; F. A. B.. 2000. Checklist of arthropods associated with pig carrion and human corpses in Southeastern Brazil. *Mem I Oswaldo Cruz* 95: 135-138.

CERQUEIRA, D., COELHO, D. S. C. 2014. Estupro no Brasil: uma radiografia segundo os dados da saúde. *Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada*. Disponível em: http://www.compromissoeatitude.org.br/wpcontent/uploads/2014/03/IPEA_estupronobrasil_dadosdasaude_marco2014.pdf. Acesso em 18 de junho de 2014.

CHIANCA, C. F. 2013. Diversidade Haplotípica de 23 Y-Strs em uma Mostra da População do Distrito Federal (Brasil) - Um Território que Surgiu do Nada à Realidade. Brasília, DF, 73 p. *Dissertação (Mestrado). Universidade de Brasília.*

CLARCK, S. E., GODFREY, R. D. 2009. Eyewitness identification evidence and innocence risk, *Psychon B Rev*, 16 (1): 22-42.

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

CORACH, D., PENACINO, G. E SALA, A. 1999. Marcadores del cromosoma Y en la identificación de rastros de interés forense y en el rastreo de línea paterna Em *La prueba del ADN en medicina Forense*. Cap 6. Masson S.A, Barcelona.

COURI, M. S., LAMAS, C. J. E., AIRES, C. C. C., MELLO-PATIU, C. A., MAIA, V. C., PAMPLONA, D. M., MAGNO, P. 2000. Diptera da Serra do Navio (Amapá, Brasil): Asilidae, Bombyliidae, Calliphoridae, Micropezidae, Muscidae, Sarcophagidae, Stratiomyiidae, Syrphidae, Tabanidae e Tachnidae. *Rev Bras Zoociências Juiz de Fora*. Juiz de Fora. 2 (1): 91 - 101.

d' ALMEIDA, J.M. E MELLO, R.P., 1995. 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.

DALY, H.V., DOYEN, J. T., PURCELL, A. H. 1998. Introduction to insect biology and diversity. *Oxford University Press*, Oxford, 675 p.

DAVIS, C. P., KING, J. L., BUDOWLE, B., EISENBERG, A. J., TURNBOUGH, M. A. 2012. Extraction platform evaluations: a comparison of AutoMate Express™, EZ1® Advanced XL, and Maxwell® 16 Bench-top DNA extraction systems. *Legal Med.* 14: 36-39.

DIAS, L. S., FONSECA, E. S., BORGES, R. G. 2012. Distribuição espacial de moscas sintrópicas (Insecta: Diptera) no campus da Unesp de Presidente Prudente (SP). *Geo Atos*, 12 (1): 43-53.

ESTRADA, D. A., GRELLA, M. D., THYSSEN, P.J., LINHARES, A. X. 2009. Taxa de Desenvolvimento de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) em Dieta Artificial Acrescida de Tecido Animal para Uso Forense. *N. Entomol*, 38 (2):1-5.

FREIRE, O. 1914a. Algumas notas para o estudo da fauna cadavérica da Bahia. *Gazeta Médica da Bahia* 46: 110–125.

FREIRE, O. 1914b. Algumas notas para o estudo da fauna cadavérica da Bahia. *Gazeta Médica da Bahia* 46: 149–162.

GARCIA, L. P., FREITAS, L. R. S., SILVA, G. D. M., HOFELMANN, D. A. 2013. Violência contra a mulher: feminicídios no Brasil. *Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada*. Disponível em: http://www.ipea.gov.br/portal/images/stories/PDFs/130925_sum_estudo_femicidio_leilagarcia.pdf. Acesso em 08 de junho de 2014.

GOEDBLOED, M., VERMEULEN, M., FANG, R. N. M., LEMBRING, M., WOLLSTEIN, A., BALLANTYNE, K., LAO, O., BRAUER, S., KRÜGER, C. ROEWER, L., LESSIG, R., PLOSKI, R., DOBONZ, T., HENKE, L., HENKE, J., FURTADO, M. R., KAYSER, M. 2009. Comprehensive mutation analysis of 17 Ychromosomal short tandem repeat polymorphisms included in the AmpFlSTR Yfiler PCR amplification kit. *Int. J. Legal Med.* 123:471–482.

GOMES, L., GOMES, G., DESUÓ, I. C. 2009. A preliminary study of insect fauna on pig carcasses located in sugarcane in winter in southeastern Brazil. *Med Vet Entomol*, 23: 155-159.

GOMES, L., ZUBEM, C. J. V. 2005. Postfeeding radial dispersal in larvae of *Chrysomya albiceps* (Diptera: Calliphoridae): implications for forensic entomology. *Forensic Sci Int*, 155: 61-64.

GOMES, L. F. 2013. Estupro em São Paulo cresceu 230%. Instituto Avante Brasil – IVB. Disponível em: <http://institutoavantebrasil.com.br/estupro-em-sp-cresceu-230/>. Acesso em 15 de junho de 2014.

GRASSBERGER, M. FRIEDRICH, E., REITER, C. 2003. The blowfly *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) as a new forensic indicator in central Europe. *Int. J. Legal Med*, 117: 75-81.

GREEN, R. ROINESTED, I. C., BOLAND, C.; HENNESSY, L. K. 2005. Developmental Validation of the Quantifiler™ Real-Time PCR Kits for the Quantification of Human Nuclear DNA Samples. *J. Forensic Sci*, 50 (4): 1-17.

GUIMARÃES, J. H., PAPAVERO, N. A., PRADO, A. P. 1983. As mífases na região Neotropical (identificação, biologia e bibliografia). *Rev Bras Zoo*, 1 (4): 239-416.

GUSMÃO, L., ALVES C. 2010. Marcadores dos cromossomas sexuais. Relevância na identificação Genética. Em Pinheiro, M.F.T. *Genetica Forense Perspectivas da identificação Genetica*. 1ª Edição, Edições Universidade Fernando Pessoa. Porto.

GUSMÃO, L., BRIÓN M. E GONZÁLEZ-NEIRA, A. 2000. The human Y-chromosome. Male Specific polymorphism and forensic genetics. *Forensic Science handbook of analytical separations*. Vol. 2.

GUSMÃO, L., CARRACEDO, A. 2003. Y Chromosome-specific STRs. *Profiles DNA*, 6 (1): 3-6.

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. 2001. Sperm Morphology, Motility, and Concentration in Fertile and Infertile Men. *N Engl J Med*, 345 (19): 1388-1393.

HORENSTEIN, M. B., ROSSO, B., GARCÍA, M. D. 2012. Seasonal structure and dynamics of sarcosaprophagous fauna on pig carrion in a rural área of Cordoba (Argentina): Their importance in forensic science. *Forensic Sci Int*, 217: 146-156.

INTERPOL Global DNA Profiling Survey. 2013. Global DNA Profiling Survey Results 2012. Disponível em: <http://www.interpol.int/INTERPOL-expertise/Forensics/DNA>. Acesso em 24 de maio de 2014.

KAESTLE, F. A., HORSBURGH, K. A. 2002. Ancient DNA in anthropology: methods, applications, and ethics. *Am J Phys Anthropol*, 35: 92-130.

KAVITHA, R., NAZNI, W. A., TAN, T. C., LEE, H. L., MAT-ISA, M. N., SOFIAN-AZIRUN, M. 2012. Molecular identification of blow flies recovered from human cadavers during crime scene investigations in Malaysia. *Malay J Pathol*. 34 (2): 127 – 132.

KAYSHYAP, V. K., SITALAXIMI T., CHATTOPADHYAY P., AND TRIVEDI R. 2004. DNA profiling technologies in forensic analysis. *Int J Human Gen*, 4(1): 11-30.

KOSMANN, C. 2013. Calliphoridae (Diptera): Identificação, Sinantropia e Análise Microbiológica. Brasília, DF, 243 p. *Dissertação (Doutorado), Universidade de Brasília*.

LIMA, R. S., BUENO, S. 2013. Anuário Brasileiro de Segurança Pública. Fórum Brasileiro de Segurança Pública. Ano 7 (7ª Edição), 136p.

LINDSAY, D. S., ALLEN, B. P., CHAN, J. C. K., DAHL, L. C. 2004. Eyewitness suggestibility and source similarity: Intrusions of details from one event into memory reports of another event. *J Mem Lang*, 50: 96–111.

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

MAIQUILLA, S. M. B., SALVADOR, J. M., CALACAL, G. C., SAGUM, M. S, DALET, M. R. M., DELFIN, F. C., TABBADA, K. A., FRANCO, A. E. L, PERDIGON, H. B., MADRI, B. J., TAN, M. P., UNGRIA, M. C. A. 2011. Y-STR DNA analysis of 154 female child sexual assault cases in the Philippines. *Int J Legal Med* 125: 817–824.

MARCHETTI, D., ARENA, E., BOSCHI, I., VANIN, S. 2013. Human DNA extraction from empty puparia. *Forensic Sci Int*, 229: 26-29.

MAZZANTINI, M.; ALESSANDRINI, F.; TAGLIABRACCI, A.; WELLS, J. D.; CAMPOBASSO, C. P. 2010. DNA degradation and genetic analysis of empty puparia: Genetic identification limits in forensic entomology. *Forensic Sci Int*, 195: 99-102.

MORETTI, T. C. 2006. Artrópodes Associados Às Carcaças de Pequenos Roedores Expostas Em Área de Formação Vegetal Secundária no Município de Campinas, SP. Campinas, SP, 101 p. *Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Campinas*.

MULERO, J. J., CHANG, C. W., CALANDRO, L. M., GREEN, R. L., LI, Y., JOHNSON, C. L., HENNESSY, L. K. 2006. Development and Validation of the AmpF‘STRs

Yfiler™ PCR Amplification Kit: A Male Specific, Single Amplification 17 Y-STR Multiplex System. *J. Forensic Sci*, versão on line, doi:10.1111/j.1556-4029.2005.00016.x.

MUMCUOGLU, K., GALLILI, N., RESHEF, A., BRAUNER, P., GRANT, H. 2004. Use of human lice in forensic entomology. *J. Med. Entomol*, 41: 803–806.

OLIVEIRA-COSTA, J. 2011. Entomologia Forense: quando os insetos são vestígios. Campinas: Ed. Millennium. 3ª ed., 502 p.

PANIGALLI, G., SOLIGO, K.G. 2013. Diversidade de *Insecta (Arthropoda)* associada à carcaça de *Sus scrofa* em um fragmento de mata atlântica de Xanxerê. Joaçaba-SC. *Unoesc & Ciência – ACBS*. v. 4, n. 1, p. 15-26.

PHILLIPS, K., MACCALLUM N., WELCH L. A. 2012. Comparison of methods for forensic DNA extraction: Chelex-100 and the QIAGEN DNA Investigator Kit (manual and automated). *Forensic Sci Int - Gen*, 6(2): 282-5.

PINHEIRO, M. F. T. 2008. *CSI Criminal*. 1ª edição, Edições Universidade Fernando Pessoa. Porto, Portugal.

PICARD, C. J. 2013. First Record of *Chrysomya megacephala* Fabricius (Diptera: Calliphoridae) in Indiana, USA. *Proc Entomol Soc Wash* 115 (3): 265–267.

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

PRINZ, M., CARRACEDO, A., MAYR, W. R., MORLING, N., PARSONS, T. J., SAJANTILA, A., SCHEITHAUER, R., SCHMITTER, H., SCHNEIDER, P. M. 2007. DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics (ISFG): Recommendations regarding the role of forensic genetics for disaster victim identification (DVI). *Forensic Sci Int- Gen*, 1:3–12.

PROÊNCIO, V. M. 2011. O Efeito da Carbonização de Carcaças Suínas no Tempo de Decomposição, na Atratividade e Diversidade de Artrópodes de Interesse Forense. Campinas, SP, 94 p. *Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Campinas.*

PUJOL-LUZ, J. R., ARANTES, L. C., CONSTANTINO, R. 2008. Cem anos da entomologia Forense no Brasil (1908–2008). *Rev Bras Entomol*, 54: 485–492.

REIBE, S., SCHMITZ J., MADEA, B. 2009. Molecular identification of forensically important blowfly species (Diptera: Calliphoridae) from Germany. *Parasitol Res*, 106: 257-261.

REPOGLE, J., LORD, W.D., BODOWLE, B., MEINKING, T. E.; TAPLIN., D. 1994. Identification of host DNA by amplified fragment length polymorphism (AMP-FLP) analysis of human crab louse excreta. *J. Med Entomol*, 31: 686–690.

ROEWER, L. 2009. Y chromosome STR typing in crime casework. *Forensic Sci* ROLO, E. S. A. 2010. DNA Barcoding and forensic entomology: a molecular approach for Diptera species' identification. Lisboa, Portugal, 70 p. *Dissertação (Mestrado). Universidade de Lisboa.*

ROSA, T. A. 2007. Artropodofauna de interesse forense no cerrado do município de Uberlândia, MG: Abundância relativa, diversidade e sucessão entomológica. Uberlândia, MG, 84 p. *Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Uberlândia.*

SAFERSTEIN, R. 2006. *Criminalistics An introduction to Forensic Science*. 9th edition, Prentice Hall, New Jersey.

SIBILLE, I., DUVERNEUIL, C., GRANDMAISON, G. L., GUERROUCHE, K., TEISSIÈRE, F., DURIGON, M., MAZANCOURT, P. 2002. Y-STR DNA amplification as biological evidence in sexually assaulted female victims with no cytological detection of spermatozoa. *Forensic Sci Int*, 125: 212-216.

TEIXEIRA, P. A. S., PINTO, A. S., MORAES, O. C. R. 2013. Dossiê Mulher 2013. Secretaria de Segurança, Instituto de Segurança Pública do Rio de Janeiro. Disponível em: http://arquivos.proderj.rj.gov.br/isp_imagens/Uploads/DossieMulher2013.pdf. Acesso em 14 de junho de 2014.

THOMPSON, J. M., EWING, M. M., FRANK, W. E., POGEMILLER, J. J., NOLDE, C. A., KOEHLER, D. J., SHAFFER, A. M., RABBACH, D. R., FULMER, P. M., SPRECHER, C. J., STORTS, D. R. 2013. Developmental validation of de PowerPlex® Y23 System: A single multiplex Y-STR analysis system for casework and database samples. *Forensic Sci Int- Gen*, 7: 240–250.

VANIN, S., GHERARDI, M., BUGELI, V., DI PAOLO, M. 2010 Insects found on a human cadaver in central Italy including the blowfly *Calliphora loewi* (Diptera, Calliphoridae), a new species of forensic interest. *Else Ireland* n. 207: 30-33.

VARGAS, J.; WOOD, D. M. 2010. Calliphoridae, p. 1297–1304. *In*: B. V. Brown, A. Borkent, J. M. Cumming, D. M. Wood, N. E. Woodley & M. A. Zumbado (eds.). *Manual of Central American Diptera*. Vol. 2. Canada, Ontario, *NCR Research Press*, 728 p.

VIRGÍLIO, M., BACKELJAU, T., NEVADO, B., DE MEYER, M. 2010. Comparative performances of DNA barcoding across insect orders. *BMC Bioinformatics*, 11: 206.

WELLS, J. D., STEVENS, J.R. 2008. Application of DNA-Based Methods in Forensic Entomology. *Annu Rev Entomol*, 53: 103-120.

WELLS J. D., WILLIAMS D. W. 2007. Validation of a DNA-based method for identifying Chrysomyinae (Diptera: Calliphoridae) used in death investigation. *Int J Legal Med*, 121:1–8.

ZEHNER, R., AMENDT J., SCHUTT, S., SAUER, J., KRETTEK, R. E POVOLNY, D. 2004. Genetic identification of forensically important flesh flies (Diptera: Sarcophagidae). *Int J Legal Med*, 118: 245–47.

7. APÊNDICE A – EXPERIMENTO *IN VITRO*

Tabela 1 - Temperatura (em graus Celsius), mínima e máxima, e umidade relativa do ar (em %), mínima e máxima, nos dias de decomposição do experimento *in vitro* no Brasil.

TEMPO DE DECOMPOSIÇÃO	TEMPERATURA		UMIDADE	
	MÍNIMA	MÁXIMA	MÍNIMA	MÁXIMA
1º dia (24 horas)	26,1°C	34,4°C	58,0%	79,0%
2º dia (48 horas)	25,9°C	34,8°C	57,0%	86,0%
3º dia (72 horas)	25,7°C	33,8°C	58,0%	83,0%
4º dia (96 horas)	25,3°C	34,0°C	56,0%	81,0%
5º dia (120 horas)	24,3°C	32,8°C	59,0%	83,0%
6º dia (144 horas)	24,5°C	34,1°C	56,0%	83,0%
7º dia (168 horas)	25,40°C	32,3°C	58,0%	77,0%
8º dia (192 horas)	23,50°C	31,5°C	62,0%	80,0%

Tabela 3 - Resultados da quantificação de DNA e valores de absorvância da relação 260/280nm e 260/230, indicando presença de inibidores proteicos e fenólicos, respectivamente, em amostras do experimento *in vitro* no Brasil.

AMOSTRAS	Relação da absorvância 260/280nm	Relação da absorvância 260/230nm	Concentração de DNA (ng/µL)
48 horas (2º dia)	1,95	2,20	10,5
72 horas (3º dia)	1,95	2,49	38,22
96 horas (4º dia)	1,95	2,35	35,07
120 horas (5º dia)	2,13	2,12	37,59
144 horas (6º dia)	1,64	1,71	66,36
168 horas (7º dia)	1,38	1,46	49,14
192 horas (8º dia)	1,35	1,87	12,32

Tabela 5 - Temperatura (em graus Celsius), mínima e máxima, e umidade relativa do ar (em %), mínima e máxima, nos dias de decomposição do experimento *in vitro* nos EUA.

<u>TEMPO DE DECOMPOSIÇÃO</u>	<u>TEMPERATURA</u>		<u>UMIDADE</u>	
	<u>MÍNIMA</u>	<u>MÁXIMA</u>	<u>MÍNIMA</u>	<u>MÁXIMA</u>
24horas (1º dia)	22,0°C	29,0°C	65,0%	93,0%
48 horas (2º dia)	19,0°C	28,0°C	61,0%	93,0%
72 horas (3º dia)	18,0°C	26,0°C	62,0%	84,0%
96 horas (4º dia)	23,0°C	28,0°C	65,0%	87,0%
120 horas (5º dia)	23,0°C	30,0°C	61,0%	93,0%
144 horas (6º dia)	18,0°C	24,0°C	61,0%	87,0%
168 horas (7º dia)	16,0°C	26,0°C	54,0%	90,0%
192 horas (8º dia)	17,0°C	26,0°C	45,0%	84,0%
216 horas (9º dia)	16,0°C	26,0°C	50,0%	90,0%
240 horas (10º dia)	22,0°C	28,0°C	58,0%	84,0%
264 horas (11º dia)	24,0°C	28,0°C	65,0%	82,0%
288 horas (12º dia)	24,0°C	28,0°C	65,0%	82,0%
312 horas (13º dia)	23,0°C	28,0°C	65,0%	87,0%
336 horas (14º dia)	20,0°C	30,0°C	51,0%	100,0%

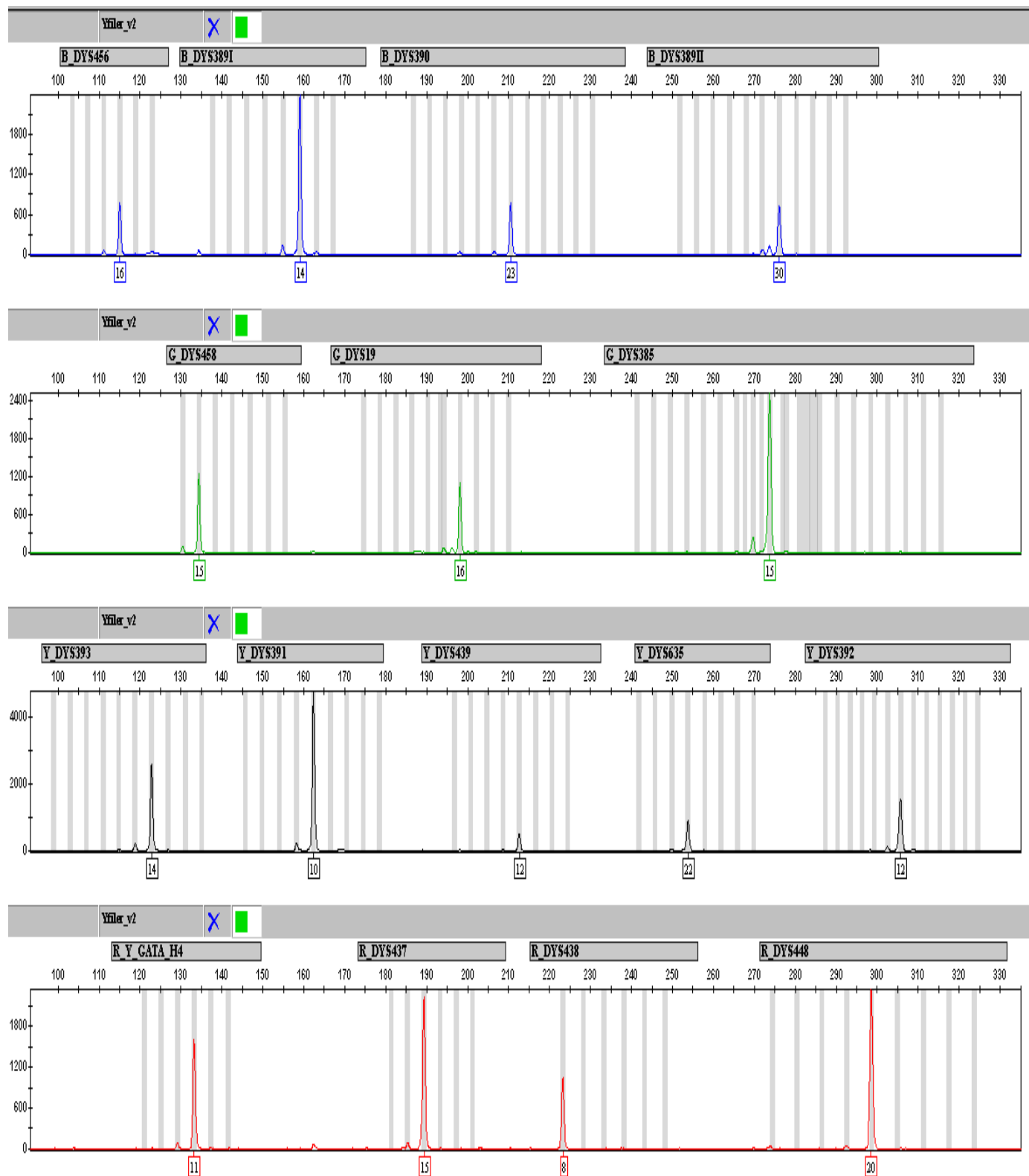


Figura 29 - Eletroferograma, com perfil Y-STR (16 locais) da amostra de referência usada para os testes *in vitro* e *in situ*, nos experimentos efetuados no Brasil e nos EUA.

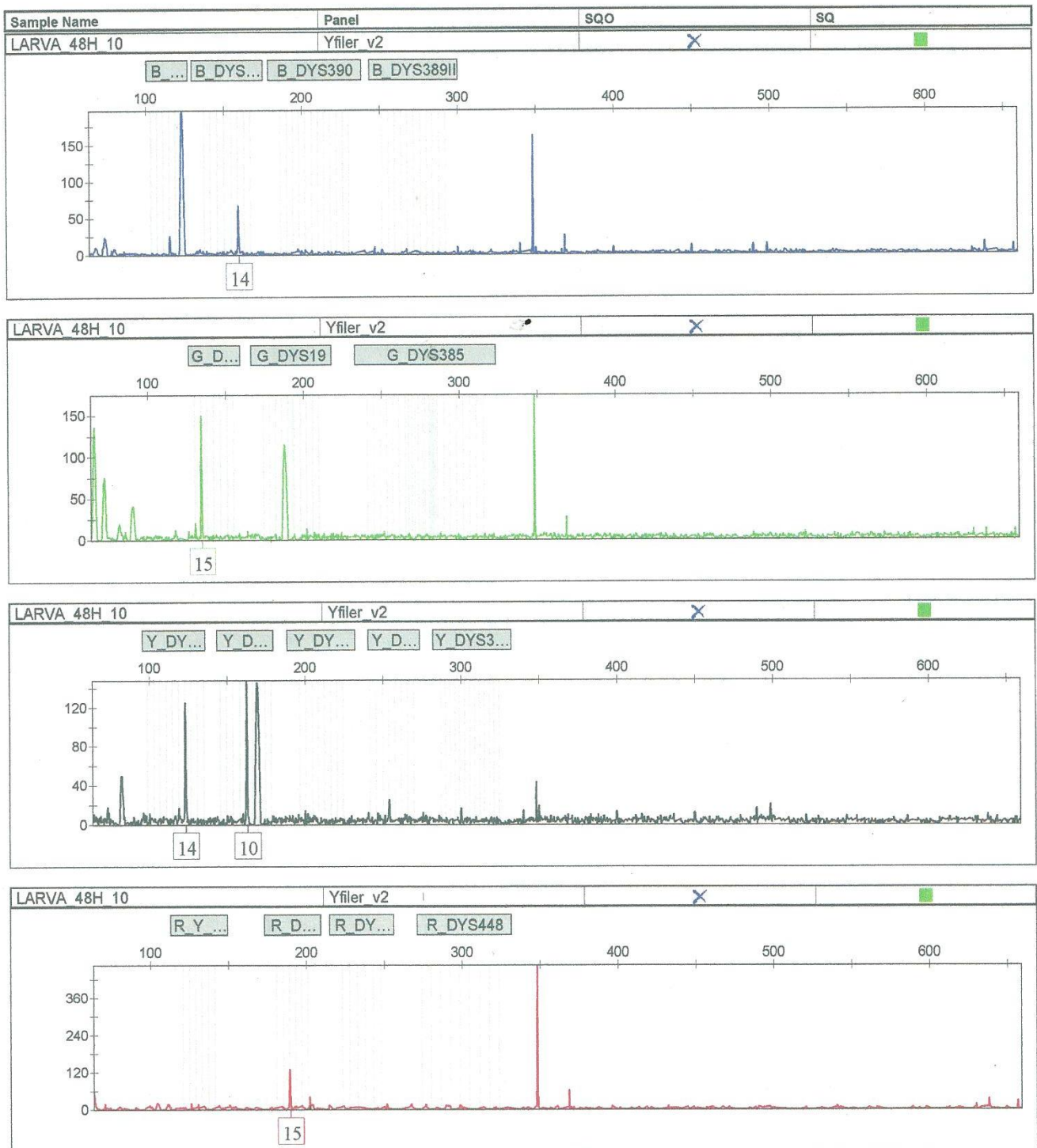


Figura 30 - Eletroferograma, com perfil Y-STR da amostra 48h (2º dia de decomposição), do experimento *in vitro* no Brasil, mostrando a amplificação dos locais DYS389 I (14), DYS385 (15), DYS393 (14), DYS391 (10), DYS437 (15).

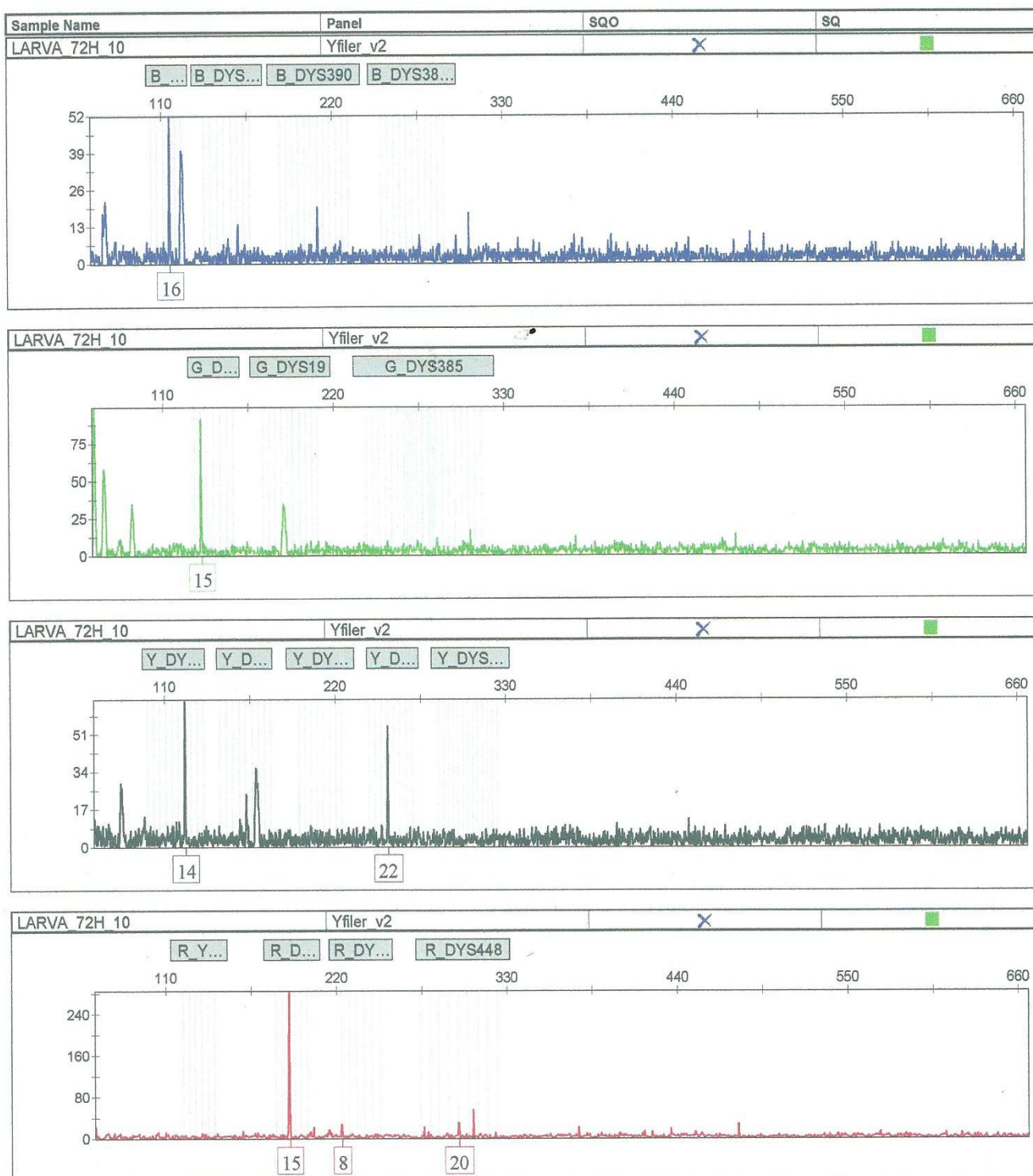


Figura 31- Eletroferograma, com perfil Y-STR da amostra 72h (3º dia de decomposição), do experimento *in vitro* no Brasil, mostrando a amplificação dos locais DYS456 (16), DYS458 (15), DYS393 (14), DYS635 (22), DYS437 (15), DYS438 (8), DYS448 (20).

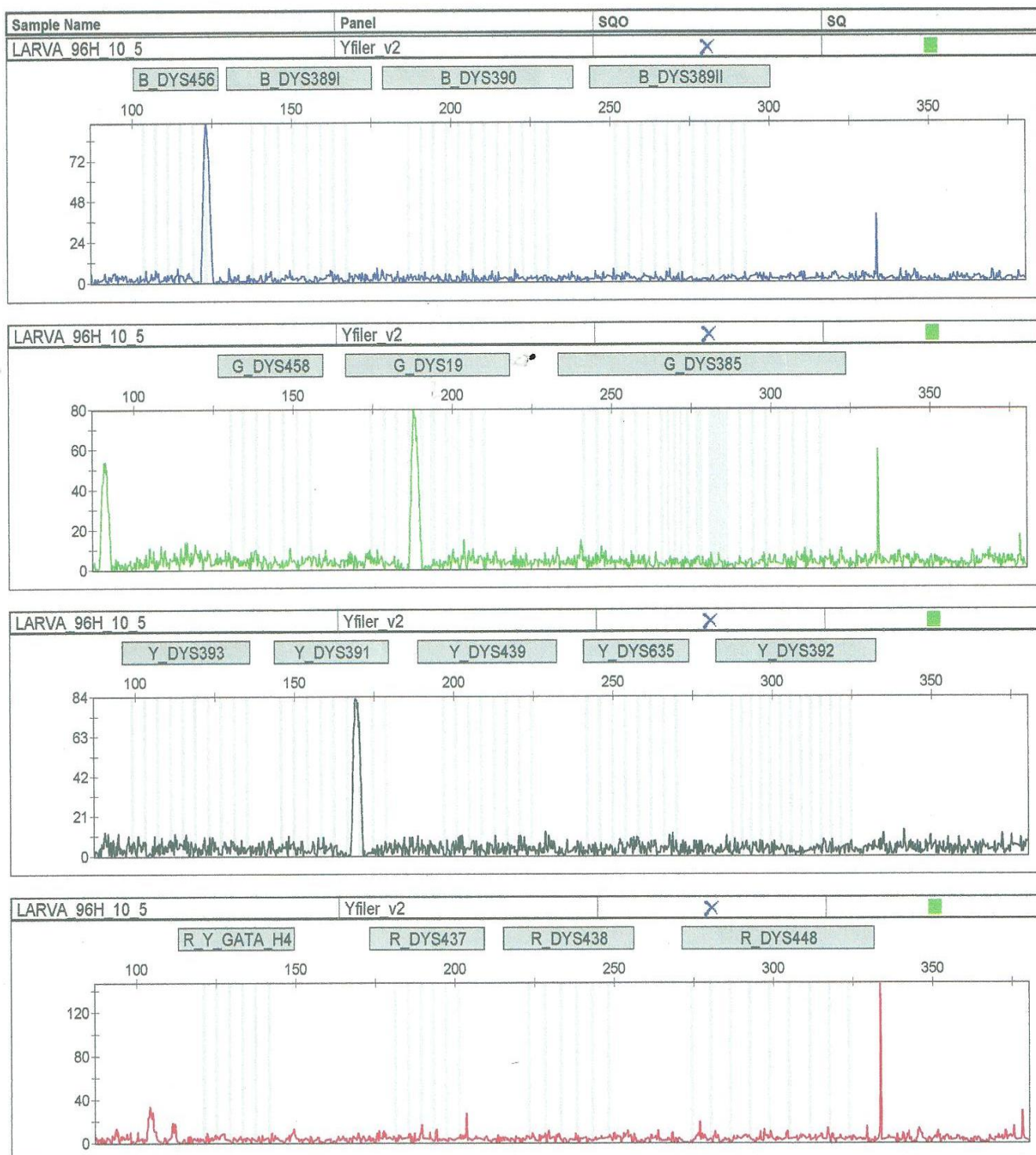


Figura 32 - Eletroferograma, com perfil Y-STR da amostra 96h (4º dia de decomposição), do experimento *in vitro* no Brasil, mostrando ausência de amplificação genética.

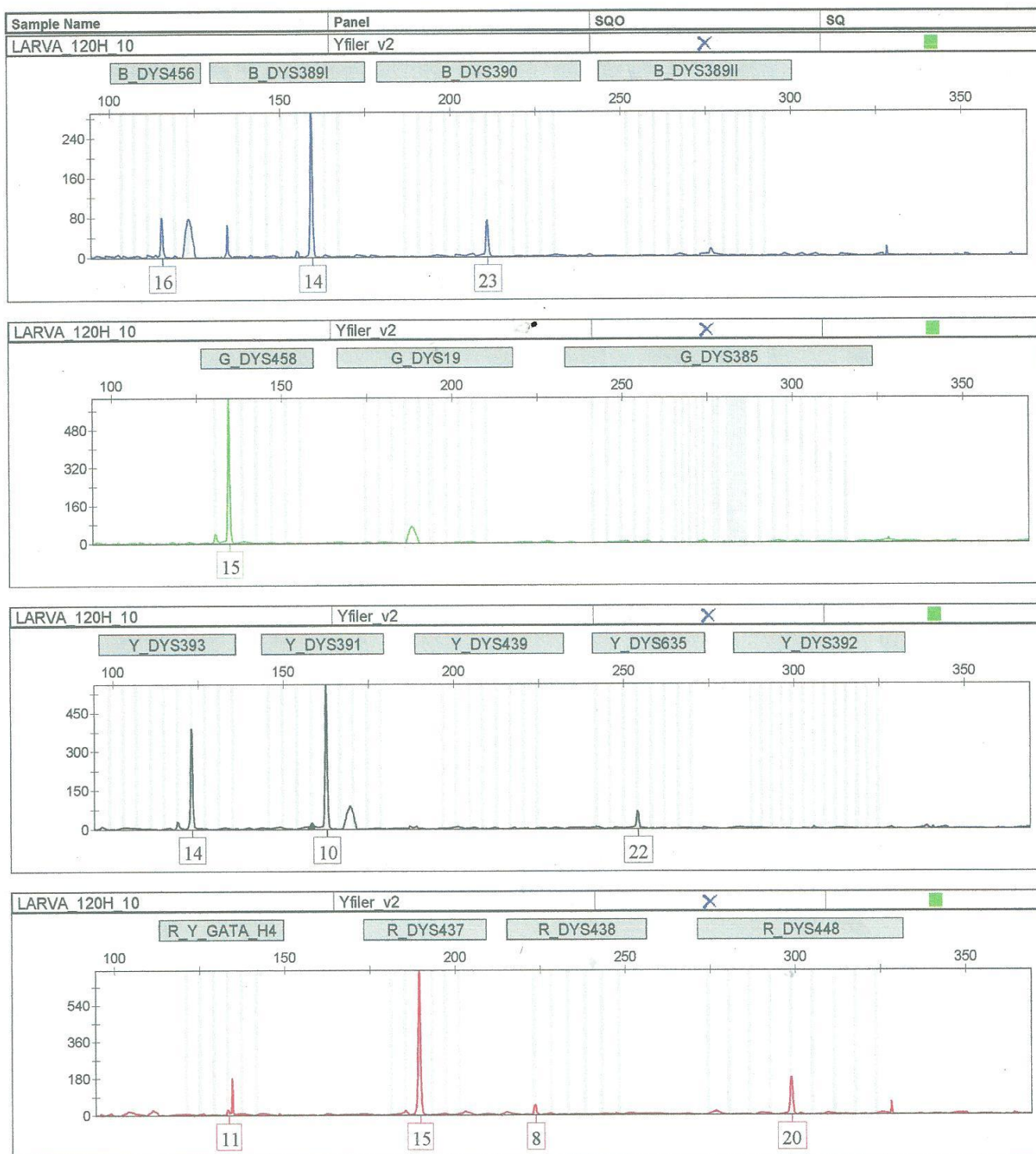


Figura 33 - Eletroferograma, com perfil Y-STR da amostra 120h (5º dia de decomposição), do experimento *in vitro* no Brasil, mostrando a amplificação dos locais DYS456 (16), DYS389 I (14), DYS390 (23), DYS458 (15), DYS393 (14), DYS391 (10), DYS635 (22), GATA H4 (11), DYS437 (15), DYS438 (8), DYS448 (20).

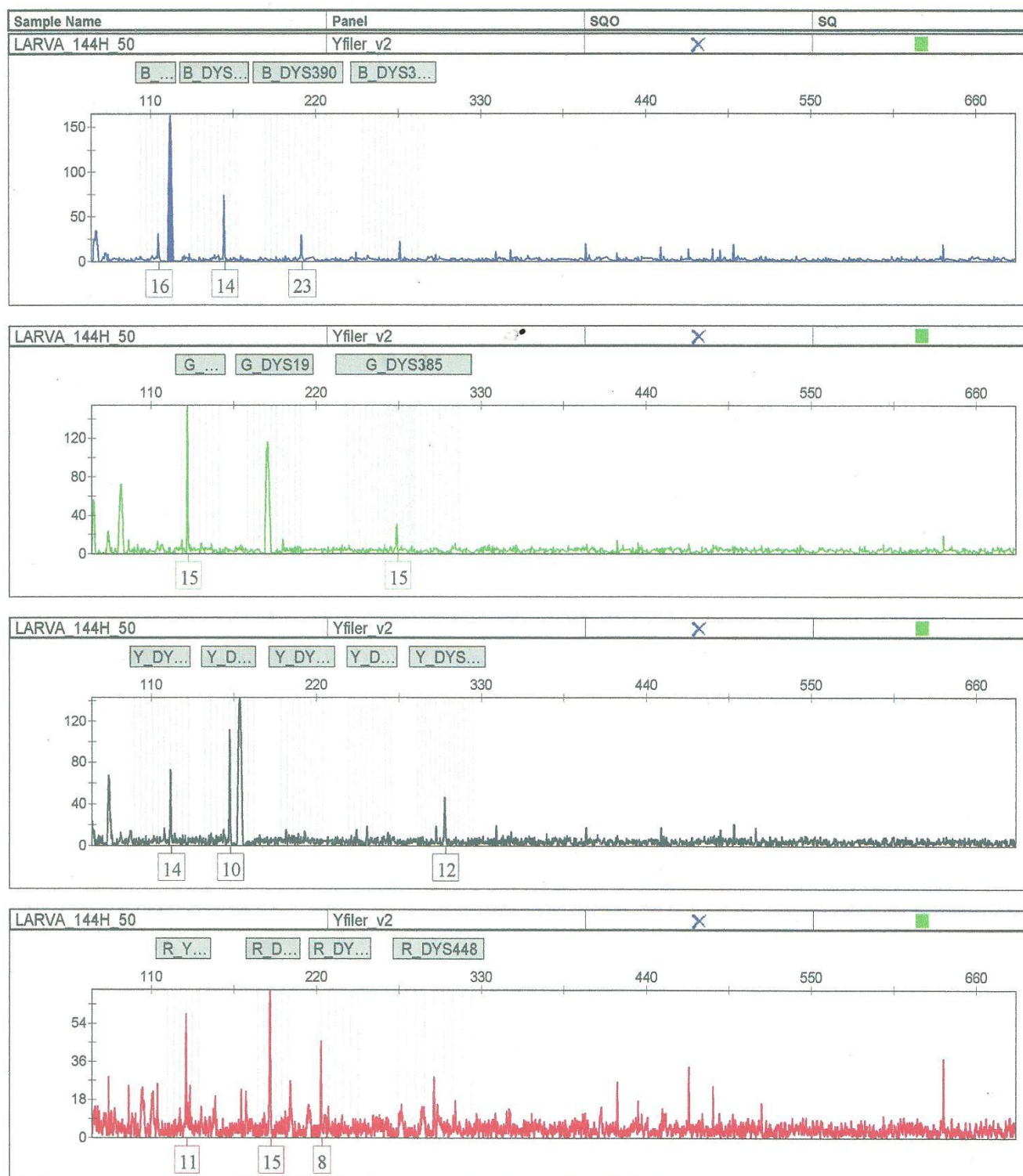


Figura 34 - Eletroferograma, com perfil Y-STR da amostra 144h (6º dia de decomposição), do experimento *in vitro* no Brasil, mostrando a amplificação dos locais DYS456 (16), DYS389 I (14), DYS390 (23), DYS458 (15), DYS385 (15), DYS393 (14), DYS391 (10), DYS439 (12), GATA H4 (11), DYS437 (15), DYS438 (8).

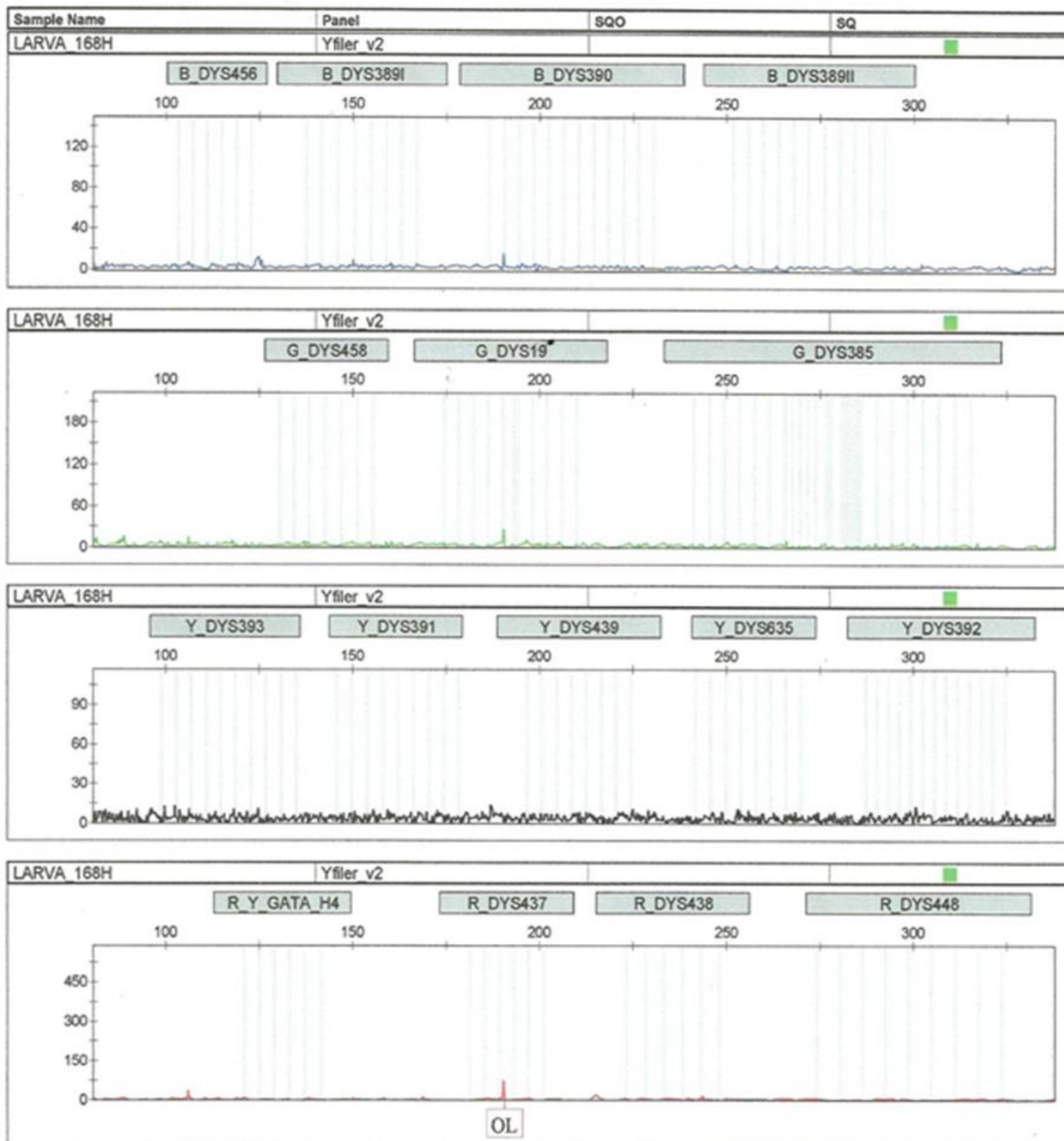


Figura 35 - Eletroferograma, com perfil Y-STR da amostra 168h (7º dia de decomposição), do experimento *in vitro* no Brasil, mostrando ausência de amplificação genética.

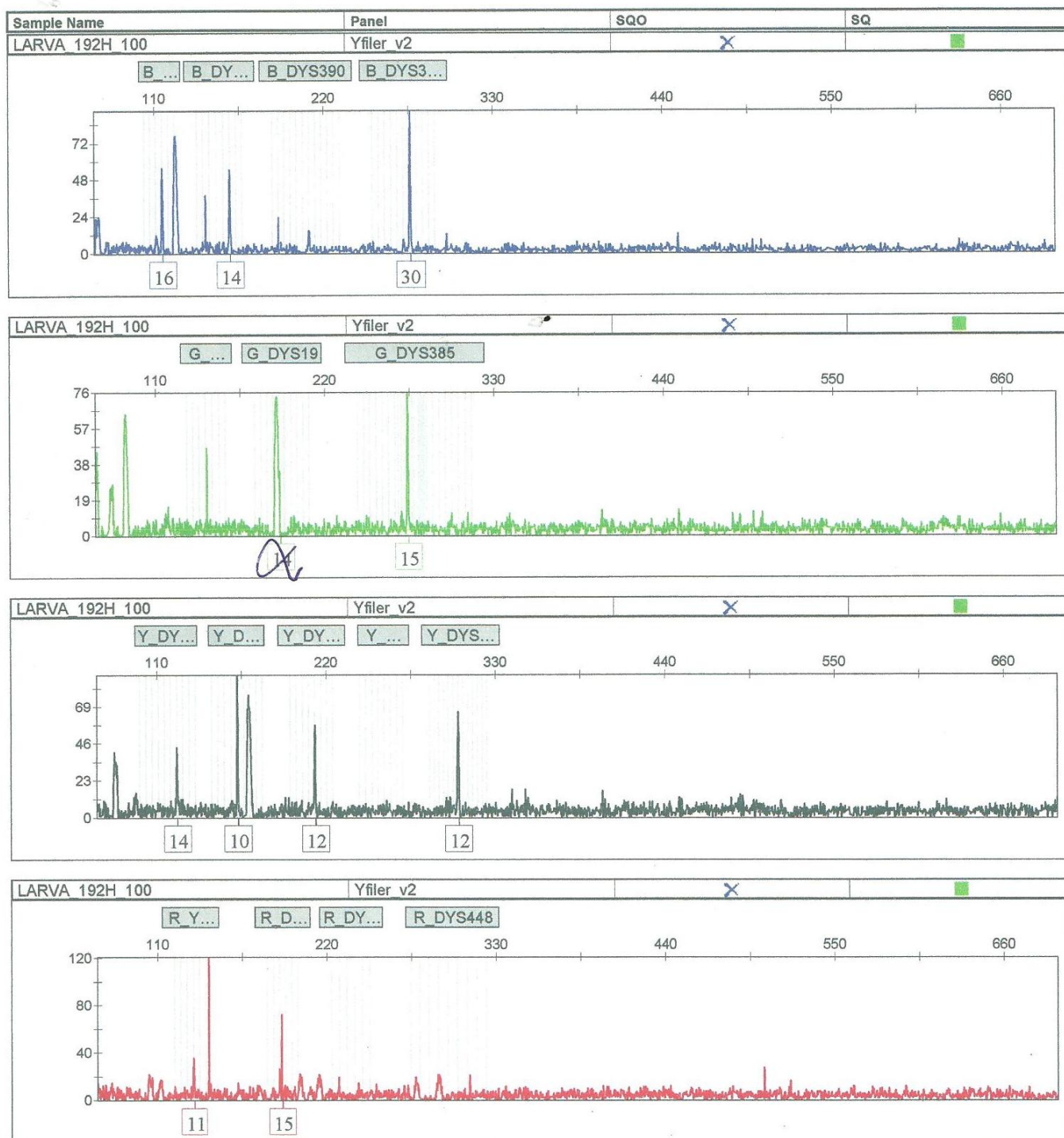


Figura 36 - Eletroferograma, com perfil Y-STR da amostra 192h (8º dia de decomposição), do experimento *in vitro* no Brasil, com a amplificação dos locais DYS456 (16), DYS389 I (14), DYS389 II (30), DYS385 (15), DYS458 (15), DYS393 (14), DYS391 (10), DYS439 (12), DYS392 (12), GATA H4 (11), DYS437 (15), DYS438 (8), DYS448 (20).

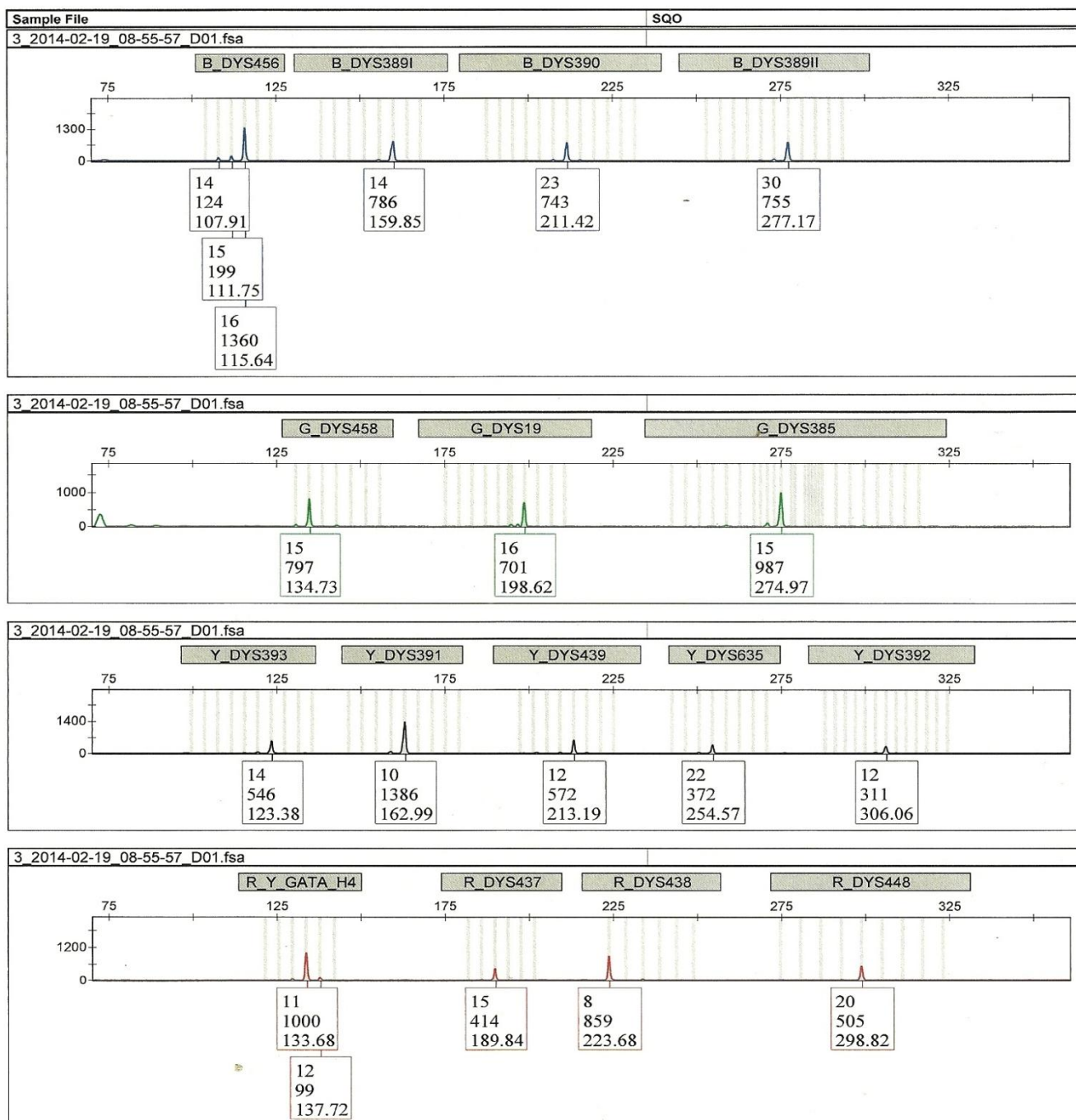


Figura 37 - Eletroferograma, com perfil Y-STR da amostra 72h (3º dia de decomposição), do experimento *in vitro* nos EUA, mostrando a amplificação dos locais DYS456 (16), DYS389 I (14), DYS390 (23), DYS389 II (30), DYS458 (15), DYS19 (16), DYS385 (15), DYS393 (14), DYS391 (10), DYS439 (12), DYS635 (22), DYS392 (12), GATA H4 (11), DYS437 (15), DYS438 (8), DYS448 (20).

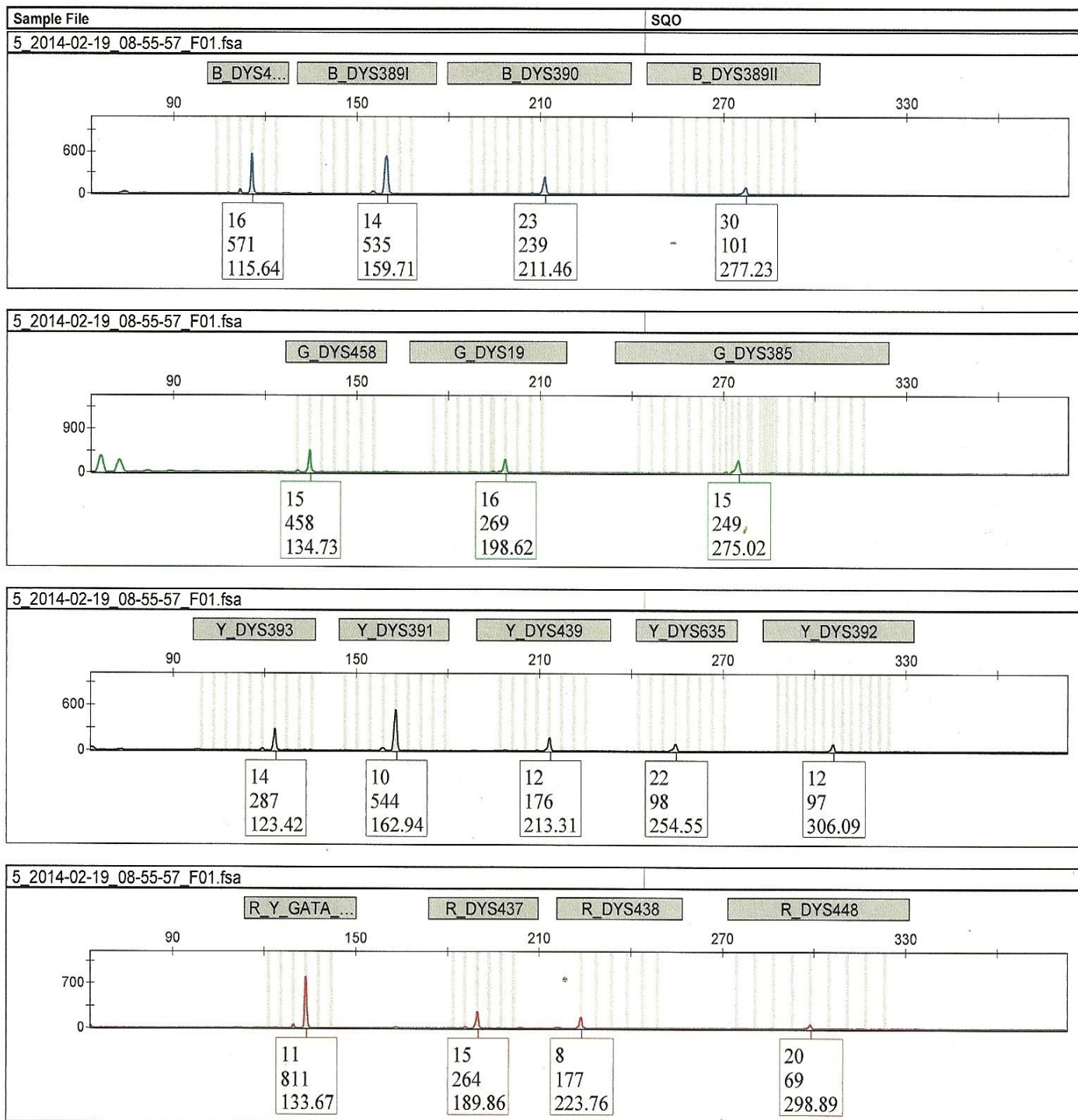


Figura 38 - Eletroferograma, com perfil Y-STR da amostra 120h (5º dia de decomposição), do experimento *in vitro* nos EUA, mostrando a amplificação dos locais DYS456 (16), DYS389 I (14), DYS390 (23), DYS389 II (30), DYS458 (15), DYS19 (16), DYS385 (15), DYS393 (14), DYS391 (10), DYS439 (12), DYS635 (22), DYS392 (12), GATA H4 (11), DYS437 (15), DYS438 (8), DYS448 (20).

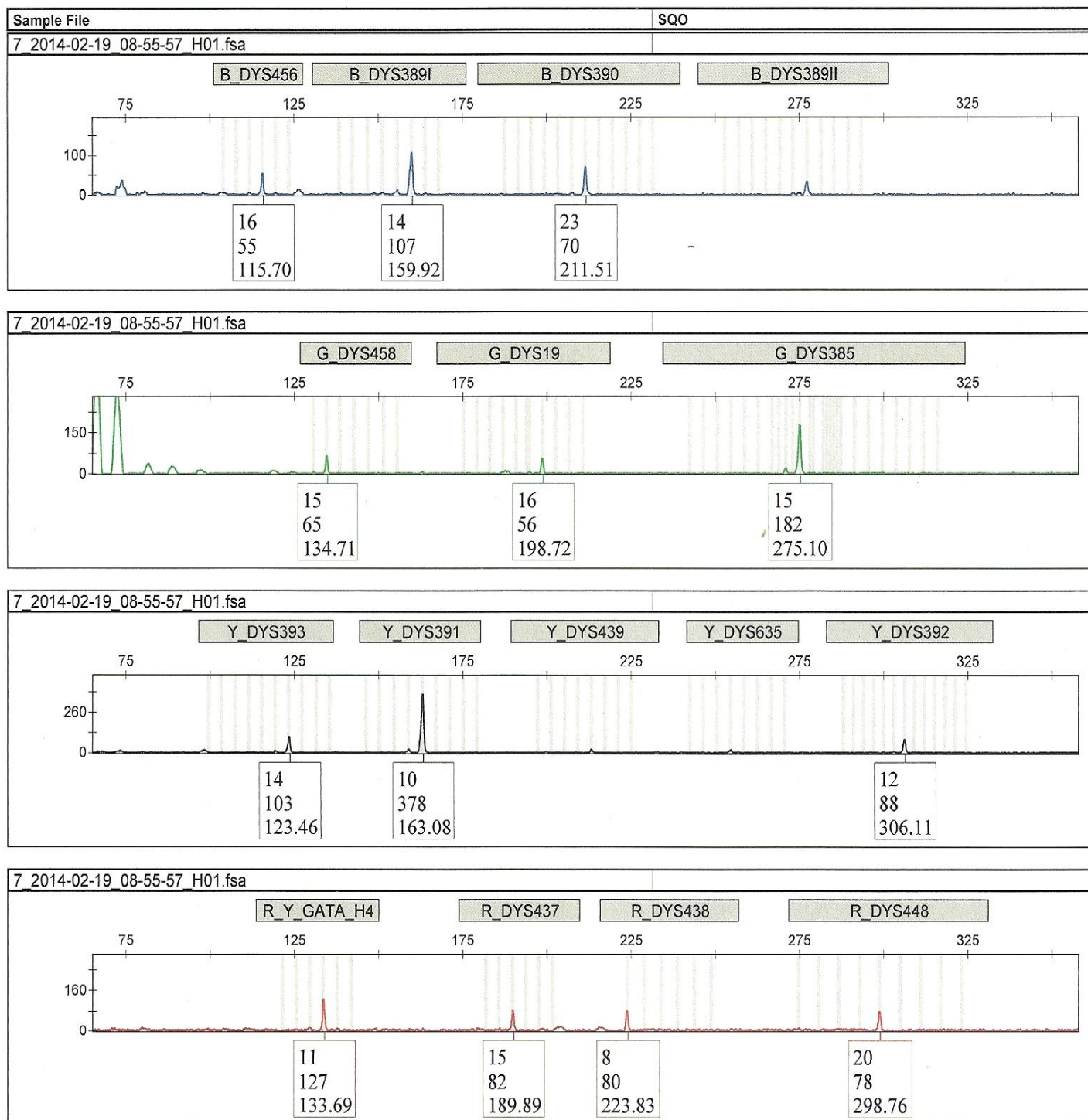


Figura 39 - Eletroferograma, com perfil Y-STR da amostra 168h (7º dia de decomposição), do experimento *in vitro* nos EUA, mostrando a amplificação dos locais DYS456 (16), DYS389 I (14), DYS390 (23), DYS458 (15), DYS19 (16), DYS385 (15), DYS393 (14), DYS391 (10), DYS392 (12), GATA H4 (11), DYS437 (15), DYS438 (8), DYS448 (20).

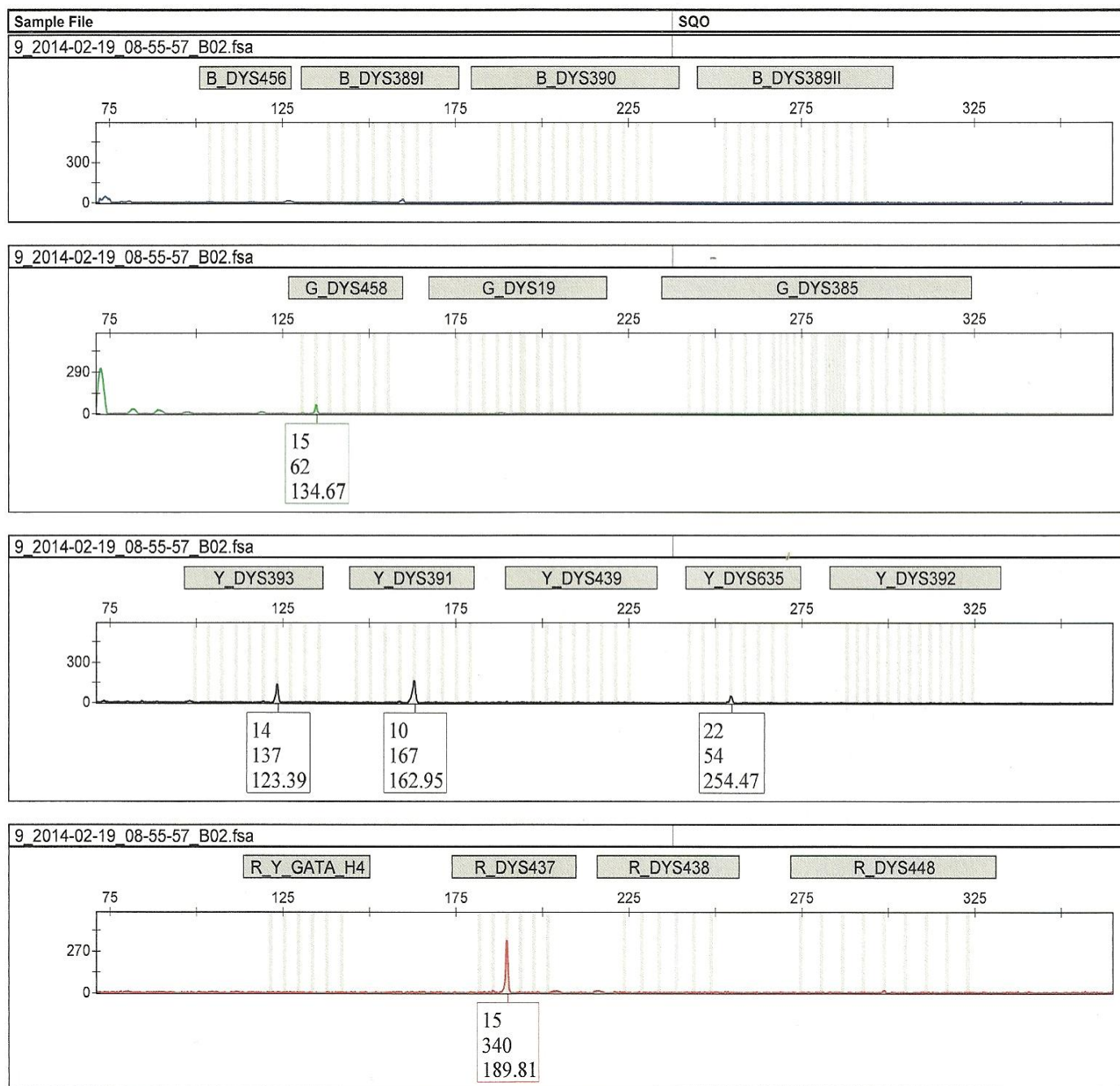


Figura 40 - Eletroferograma, com perfil Y-STR da amostra 216h (9º dia de decomposição), do experimento *in vitro* nos EUA, mostrando a amplificação dos locais DYS458 (15), DYS393 (14), DYS391 (10), DYS635 (22), DYS437 (15).

8. APÊNDICE B – EXPERIMENTO *IN SITU*

Tabela 8: Temperatura, mínima e máxima, e umidade relativa do ar, nos dias de decomposição do experimento *in situ* no Brasil.

TEMPO DE DECOMPOSIÇÃO	TEMPERATURA		UMIDADE	
	MÍNIMA	MÁXIMA	MÍNIMA	MÁXIMA
24 horas (1º dia)	22,8°C	29,8°C	49,0%	86,0%
48 horas (2º dia)	23,4°C	30,2°C	46,0%	77,0%
72 horas (3º dia)	23,8°C	29,8°C	47,0%	87,0%
96 horas (4º dia)	24,2°C	30,6°C	52,0%	80,0%
120 horas (5º dia)	23,9°C	29,6°C	63,0%	82,0%
144 horas (6º dia)	24,2°C	26,3°C	69,0%	83,0%
168 horas (7º dia)	21,2°C	21,8°C	72,0%	89,0%
192 horas (8º dia)	19,4°C	21,6°C	78,0%	91,0%
216 horas (9º dia)	19,2°C	22,4°C	74,0%	89,0%
240 horas (10º dia)	20,6°C	22,6°C	69,0%	82,0%
264 horas (11º dia)	20,4°C	23,2°C	69,0%	86,0%
288 horas (12º dia)	21,2°C	22,6°C	78,0%	82,0%
312 horas (13º dia)	20,7°C	24,2°C	56,0%	80,0%
336 horas (14º dia)	20,2°C	25,4°C	55,0%	80,0%

Tabela 10 - Resultados da quantificação de DNA e valores de absorvância da relação 260/280nm e 260/230, indicando presença de inibidores proteicos e fenólicos, respectivamente, em quase todas as amostras do experimento *in situ* no Brasil, além de uma enorme concentração de DNA.

AMOSTRAS	Relação da absorvância 260/280nm	Relação da absorvância 260/230nm	Concentração de DNA (ng/μL)
96 horas (4° dia)	1,86	1,59	96,40
120 horas (5° dia)	1,51	1,72	159,39
144 horas (6° dia)	1,15	1,14	159,60
168 horas (7° dia)	1,54	1,80	160,16
192 horas (8° dia)	1,13	1,19	161,84
216 horas (9° dia)	1,09	1,13	158,41
240 horas (10° dia)	1,13	1,20	155,40
264 horas (11° dia)	1,12	1,12	154,00
288 horas (12° dia)	1,17	1,12	160,58
312 horas (13° dia)	1,05	1,15	151,97
336 horas (14° dia)	1,16	1,13	152,60

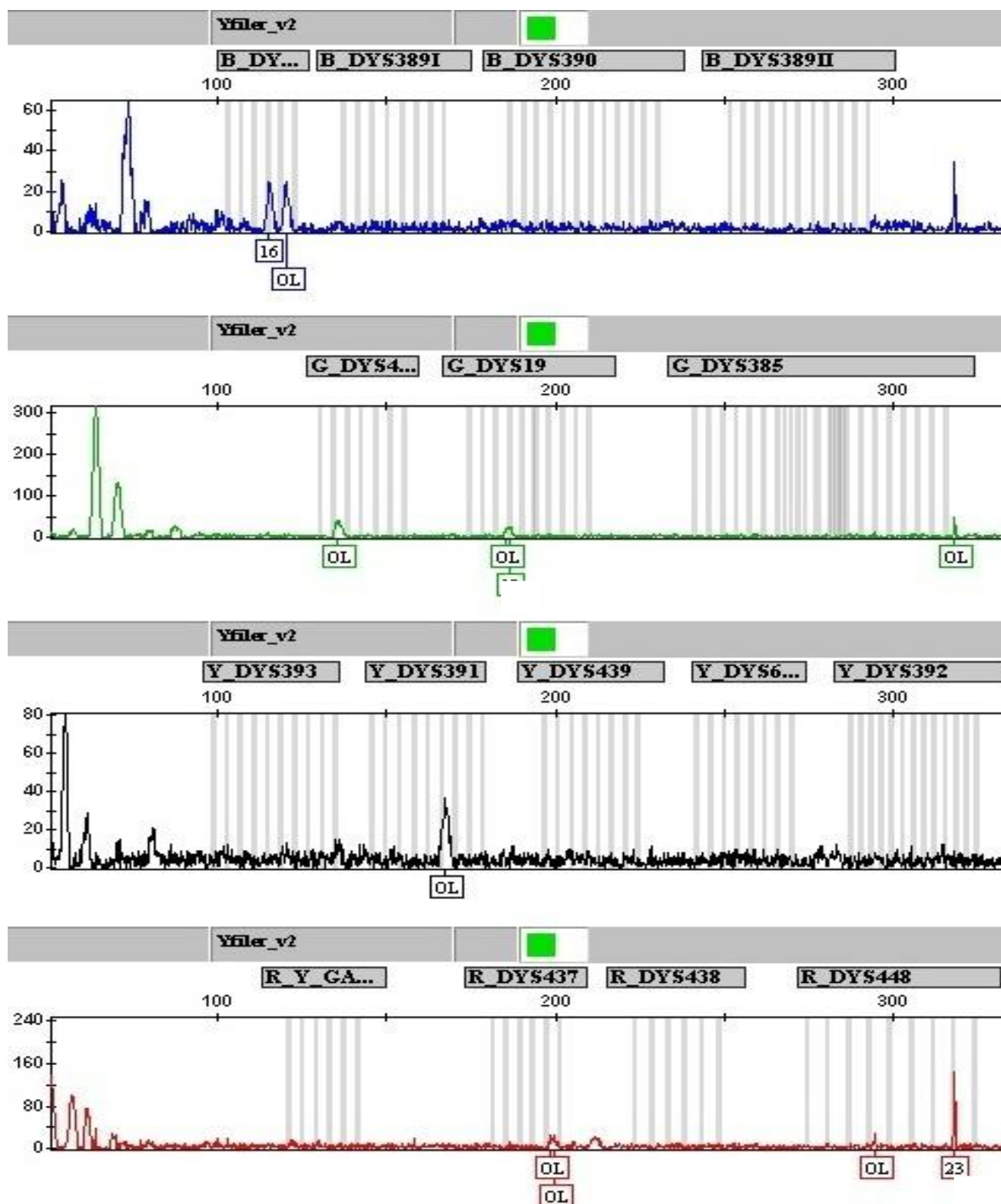


Figura 41 - Eletroferograma, com perfil Y-STR da amostra 144h (6º dia de decomposição), do experimento *in situ* no Brasil, mostrando a amplificação do local DYS456 (16).

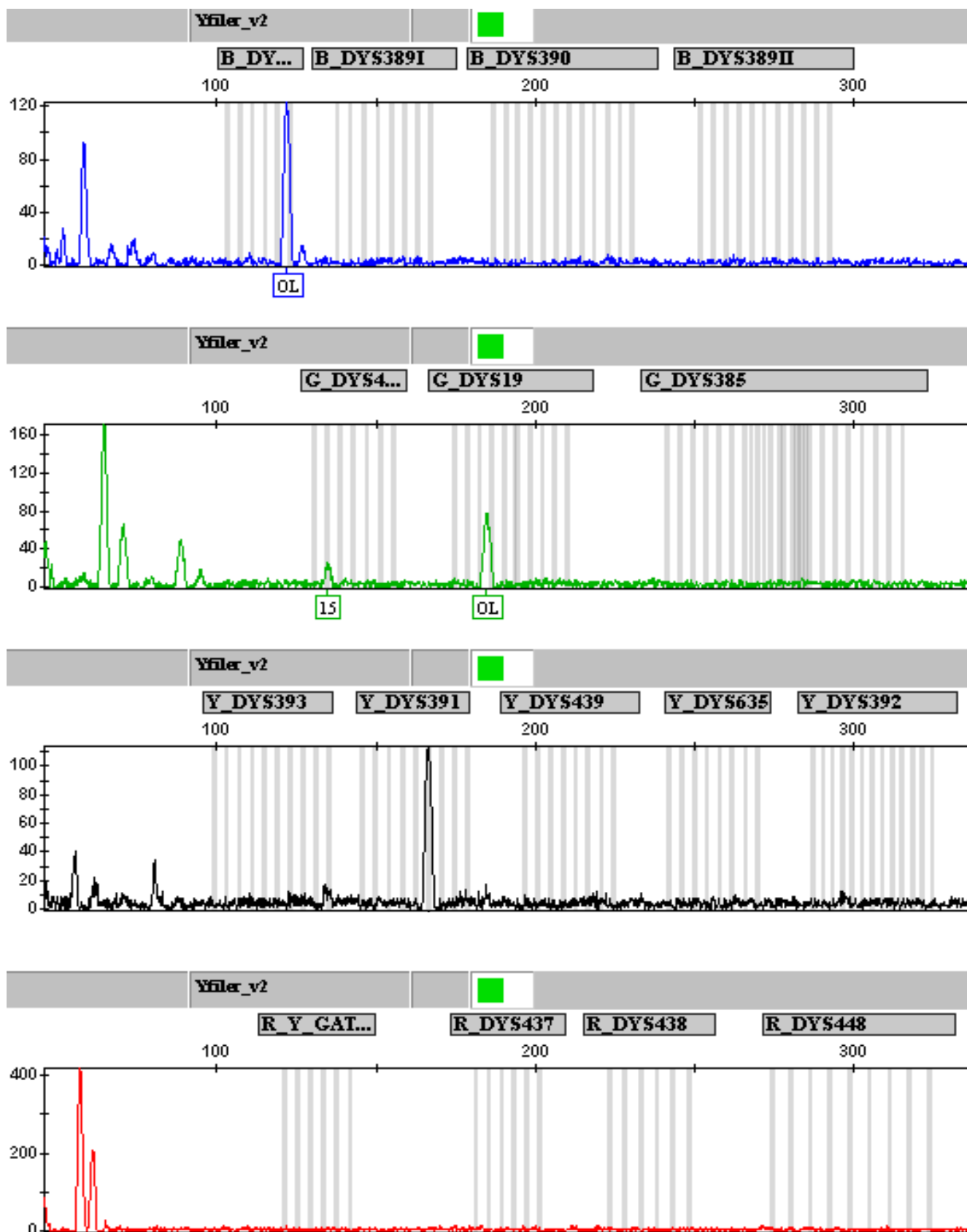


Figura 42 - Eletroferograma, com perfil Y-STR da amostra 144h (6^o dia de decomposição), do experimento *in situ* no Brasil, mostrando a amplificação do local DYS458 (15).

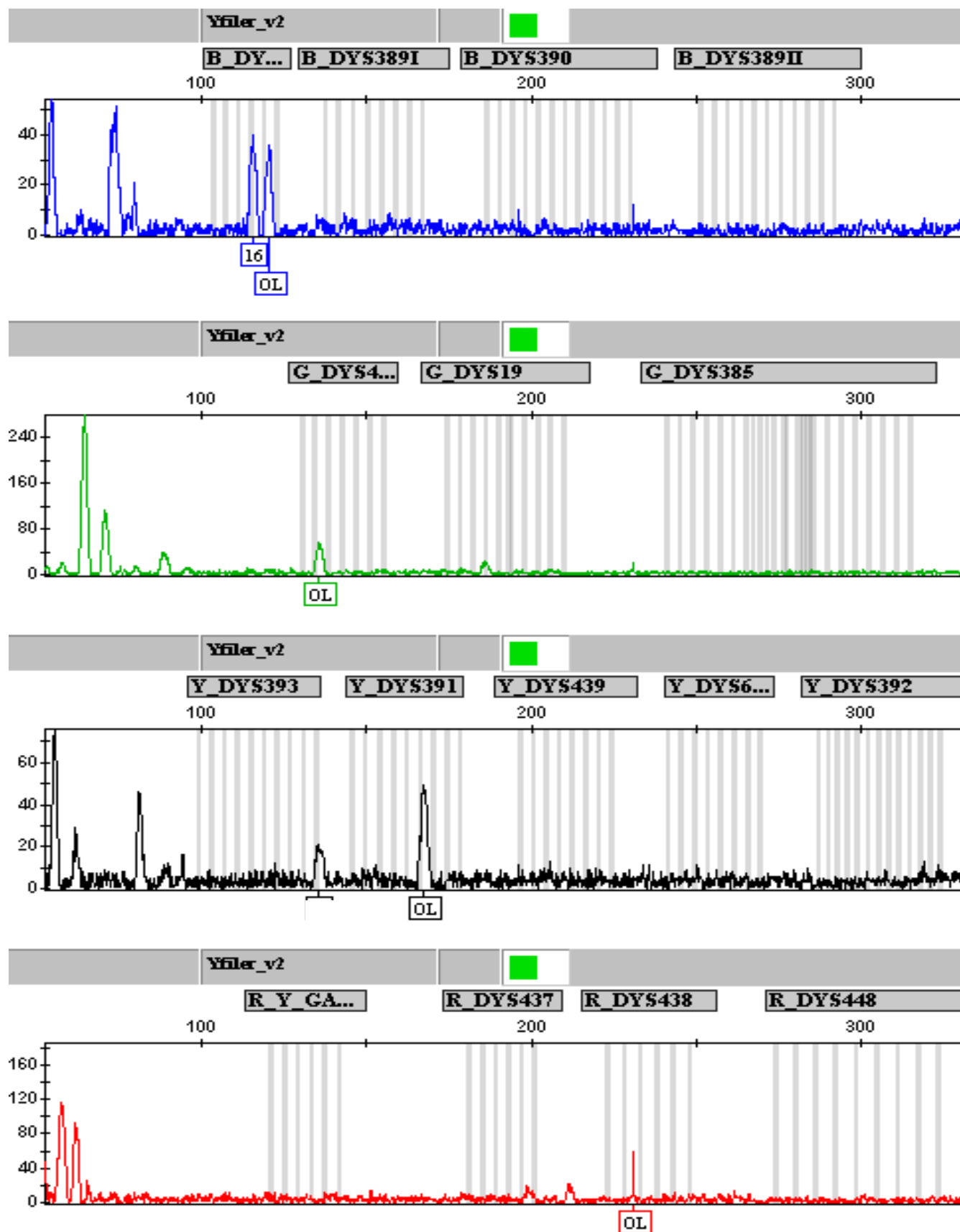


Figura 43 - Eletroferograma, com perfil Y-STR da amostra 168h (7º dia de decomposição), do experimento *in situ* no Brasil, mostrando a amplificação do local DYS456 (16).

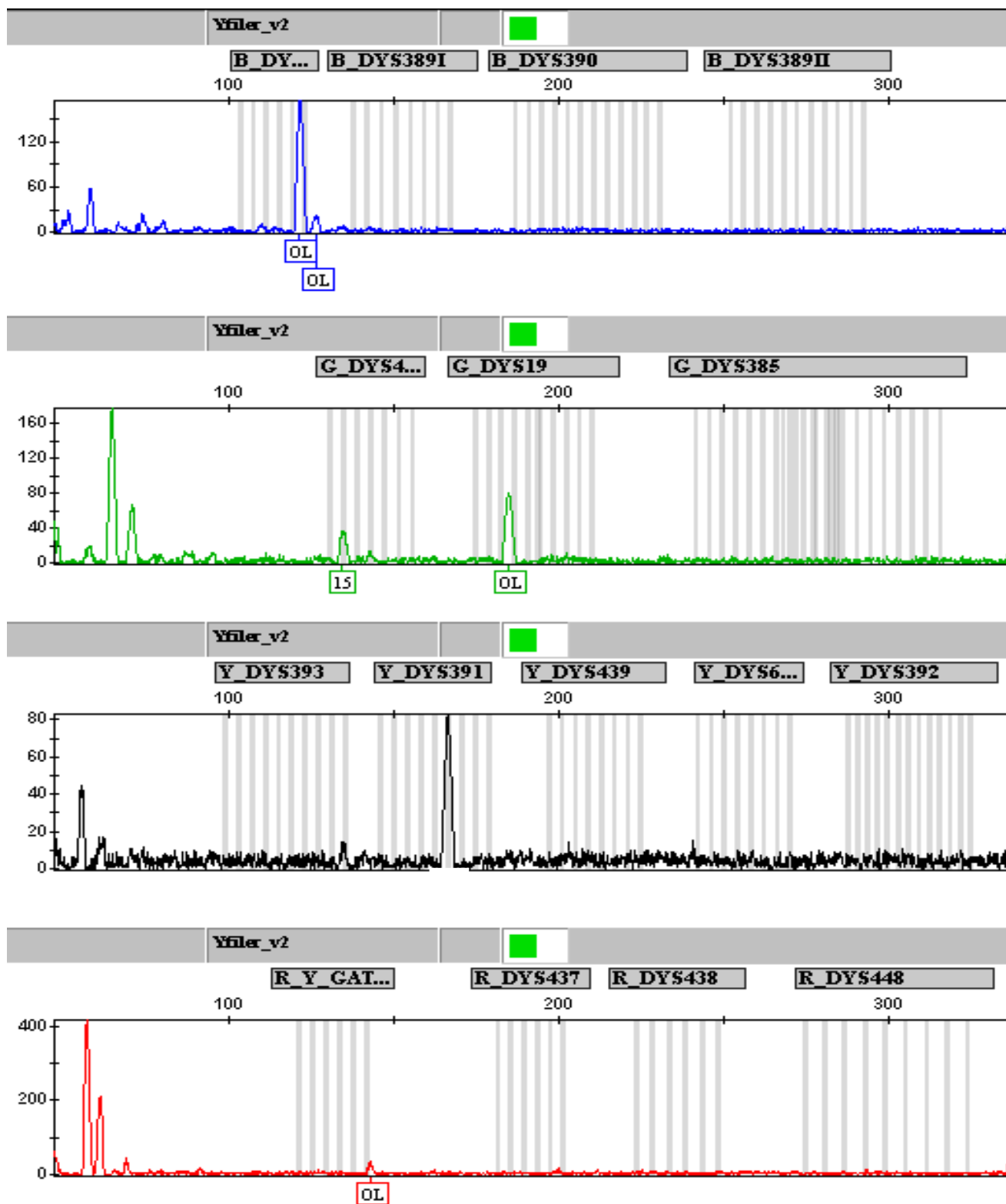


Figura 44 - Eletroferograma, com perfil Y-STR da amostra 168h (7^o dia de decomposição), do experimento *in situ* no Brasil, mostrando a amplificação do local DYS458 (15).

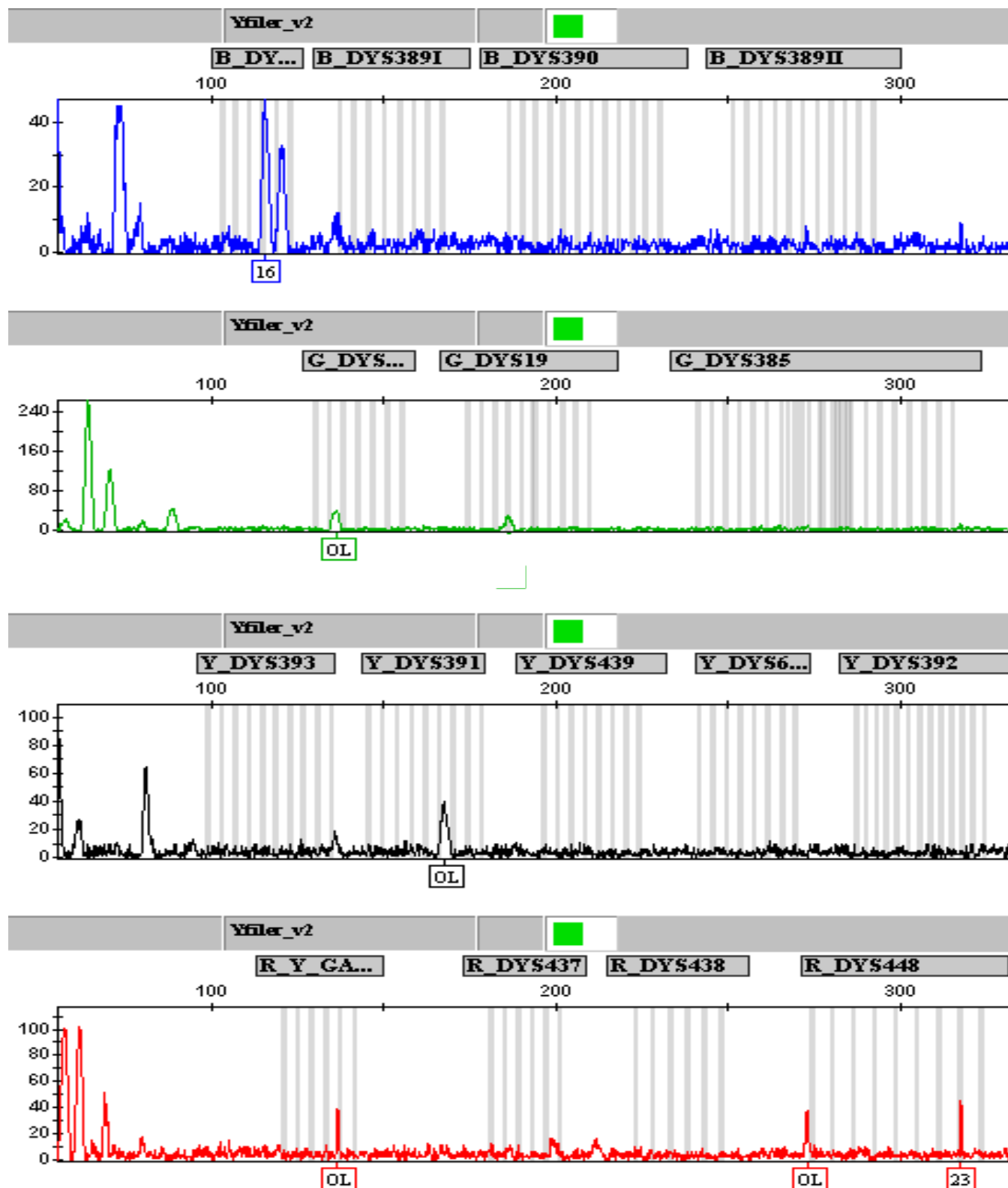


Figura 45 - Eletroferograma, com perfil Y-STR da amostra 192h (8º dia de decomposição), do experimento *in situ* no Brasil, mostrando a amplificação do local DYS456 (16).

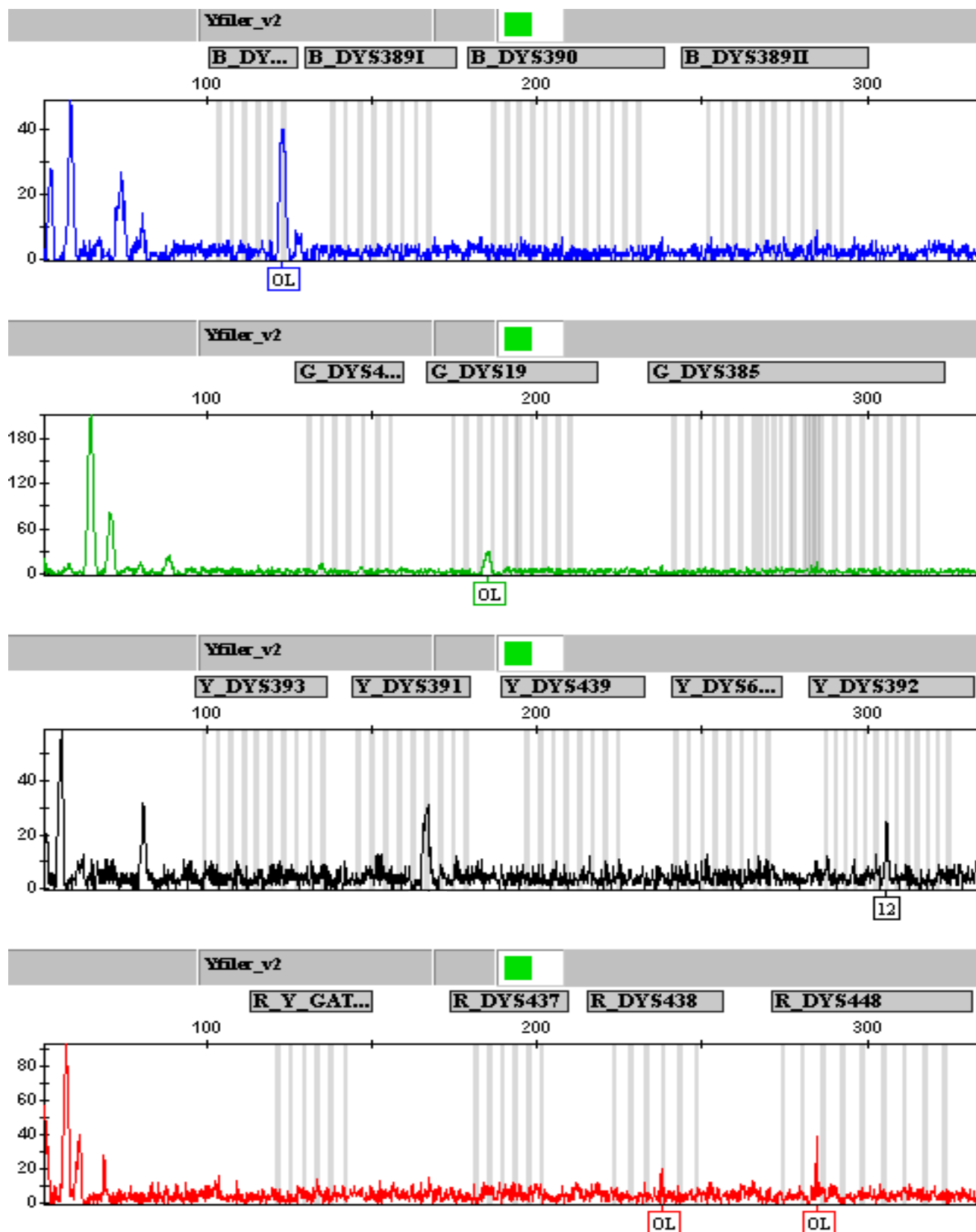


Figura 46 - Eletroferograma, com perfil Y-STR da amostra 192h (8º dia de decomposição), do experimento *in situ* no Brasil, mostrando a amplificação do local DYS392 (12).

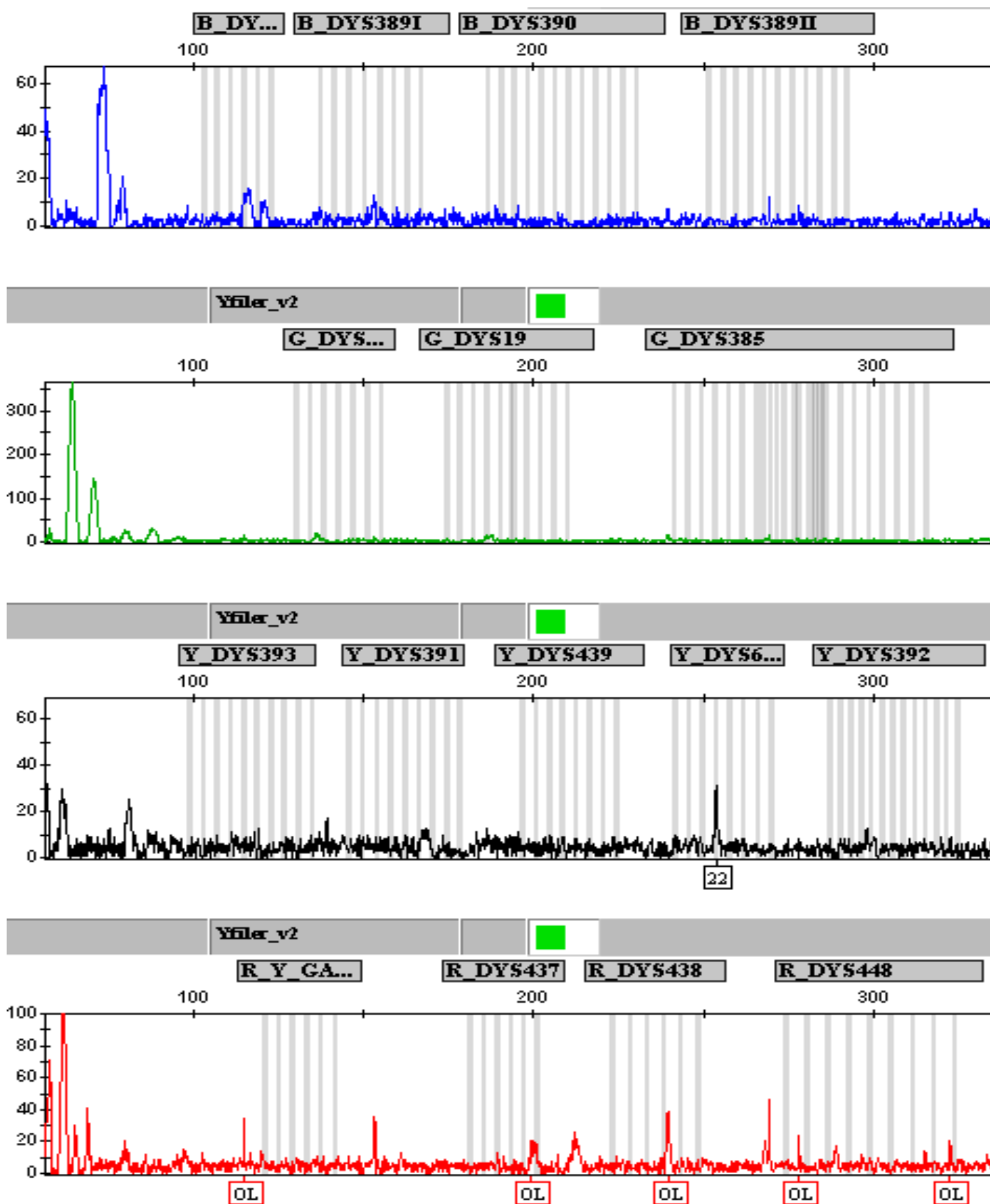


Figura 47 - Eletroferograma, com perfil Y-STR da amostra 216h (9º dia de decomposição), do experimento *in situ* no Brasil, mostrando a amplificação do local DYS635 (22).

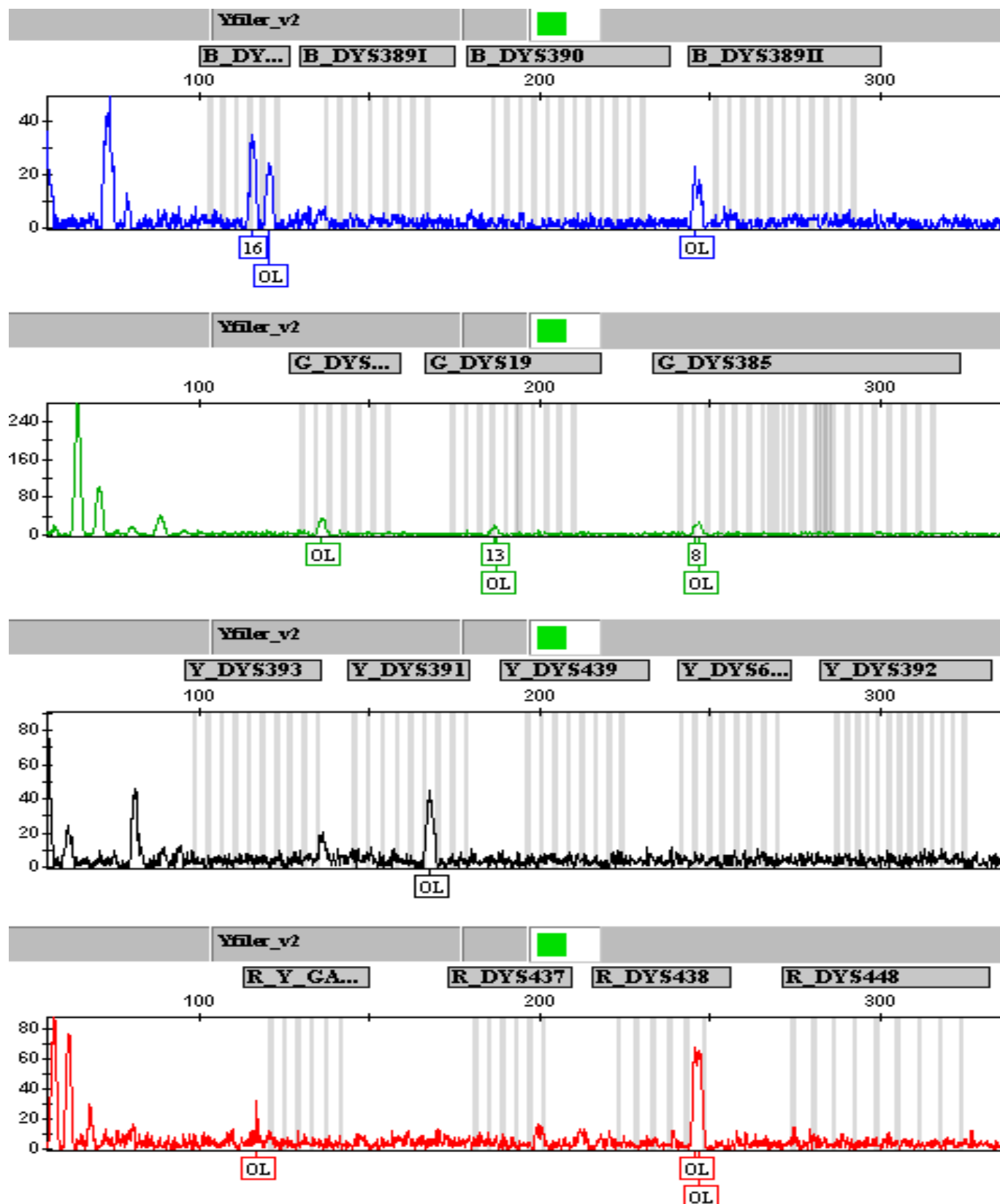


Figura 48 - Eletroferograma, com perfil Y-STR da amostra 240h (10^o dia de decomposição), do experimento *in situ* no Brasil, mostrando a amplificação do local DYS456 (16).

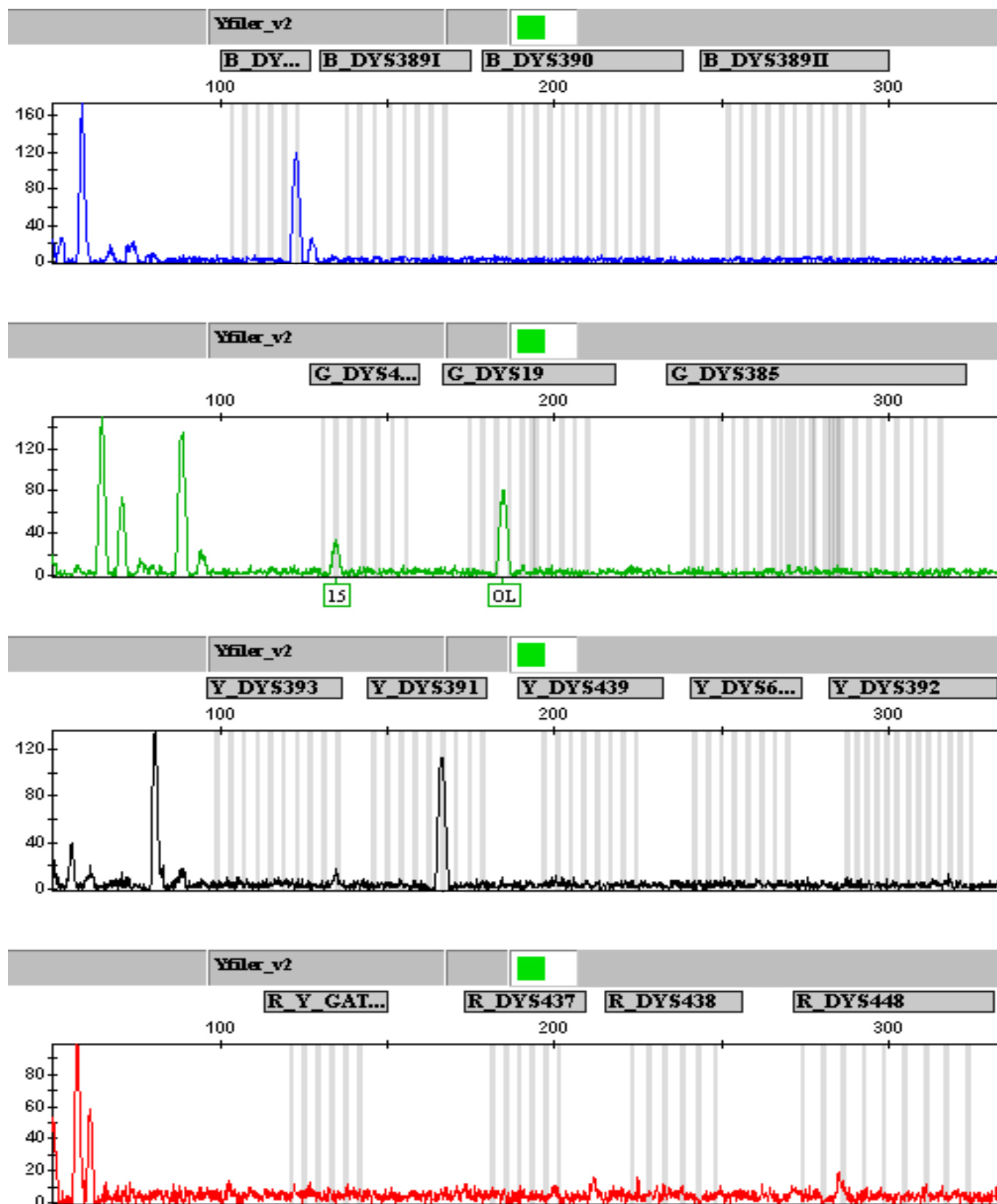


Figura 49 - Eletroferograma, com perfil Y-STR da amostra 240h (10^o dia de decomposição), do experimento *in situ* no Brasil, mostrando a amplificação do local DYS458 (15).

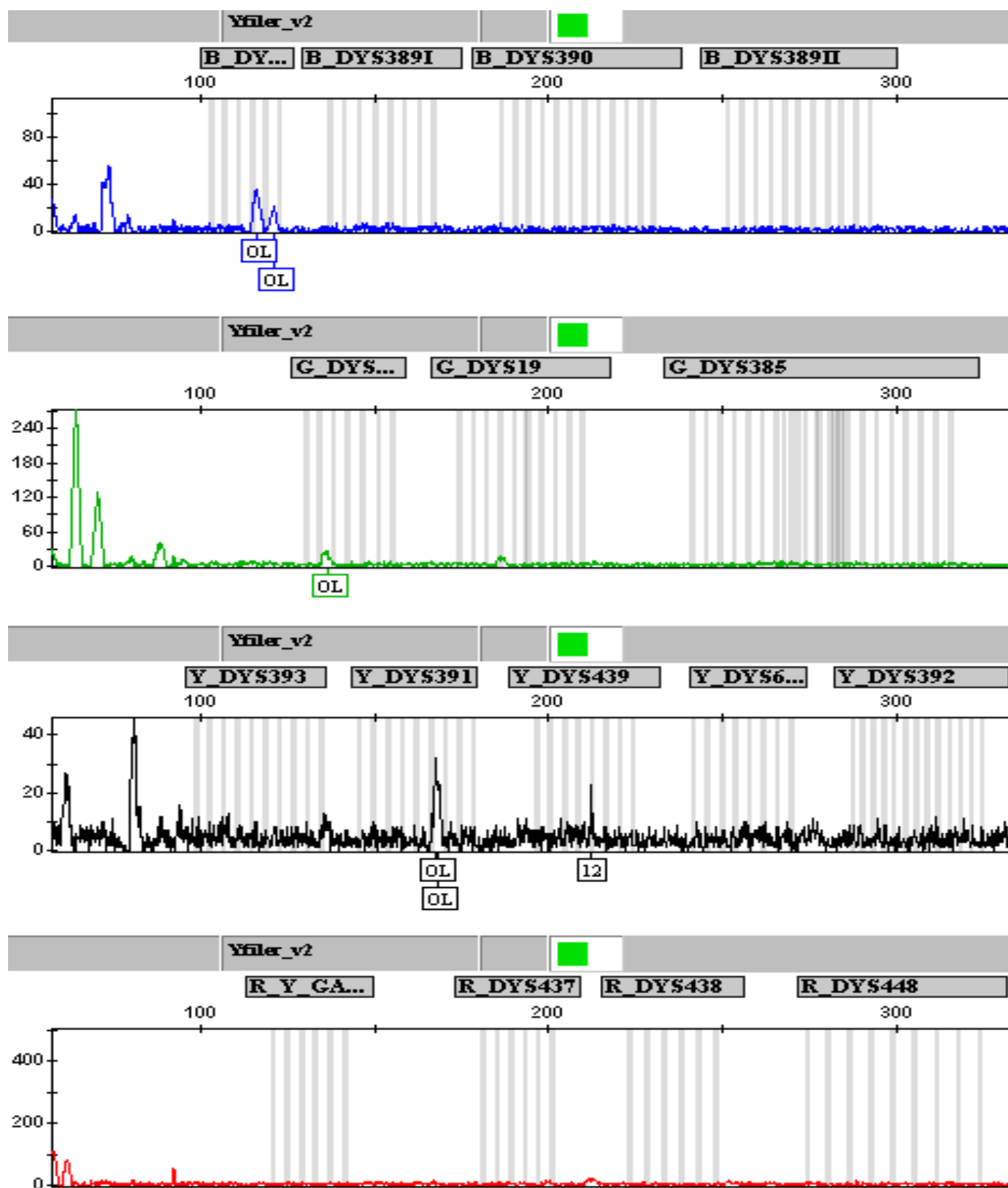


Figura 50 - Eletroferograma, com perfil Y-STR da amostra 240h (10^o dia de decomposição), do experimento *in situ* no Brasil, mostrando a amplificação do local DYS439 (12).

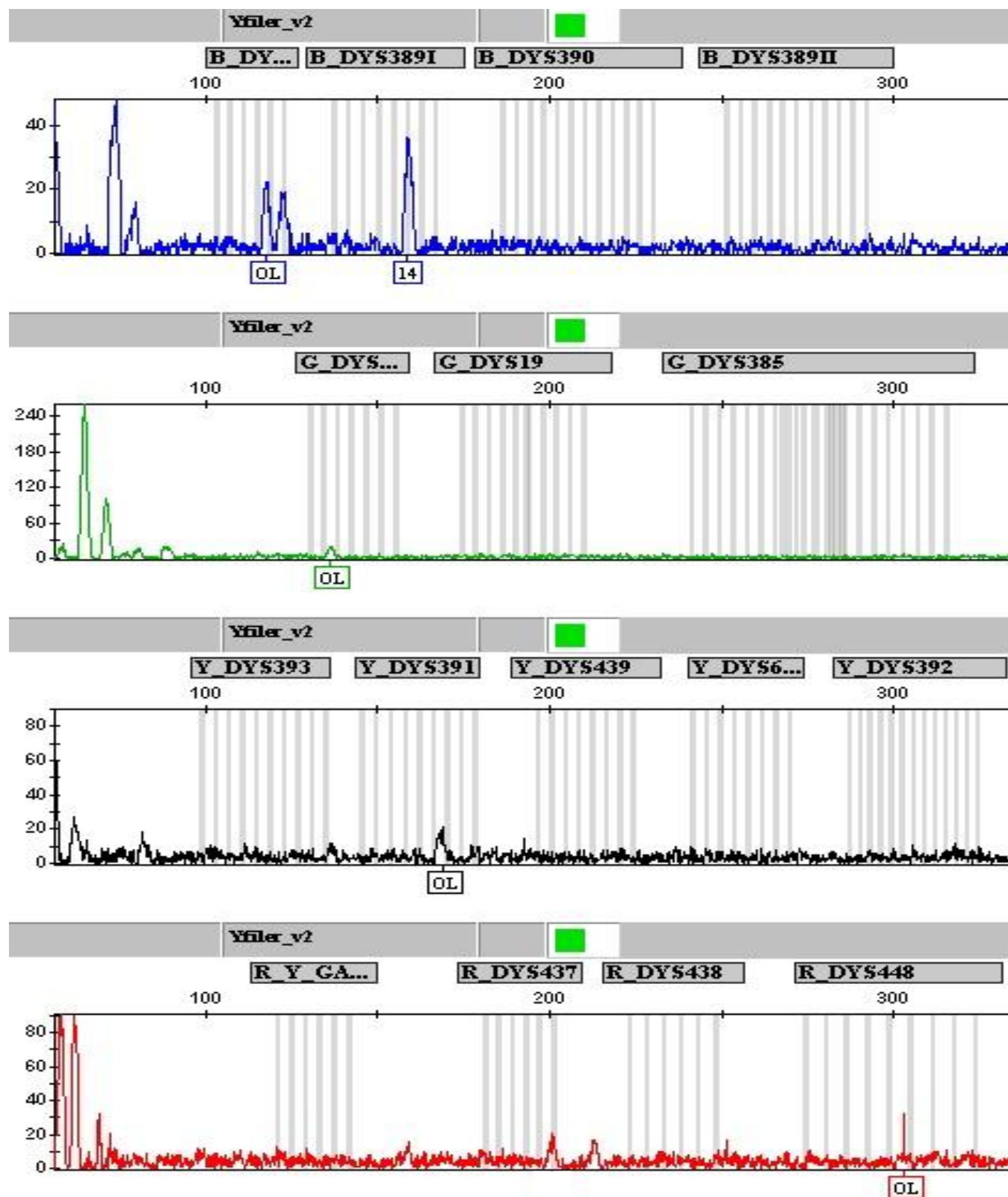


Figura 51 - Eletroferograma, com perfil Y-STR da amostra 288h (12º dia de decomposição), do experimento *in situ* no Brasil, mostrando a amplificação do local DYS389I (14).

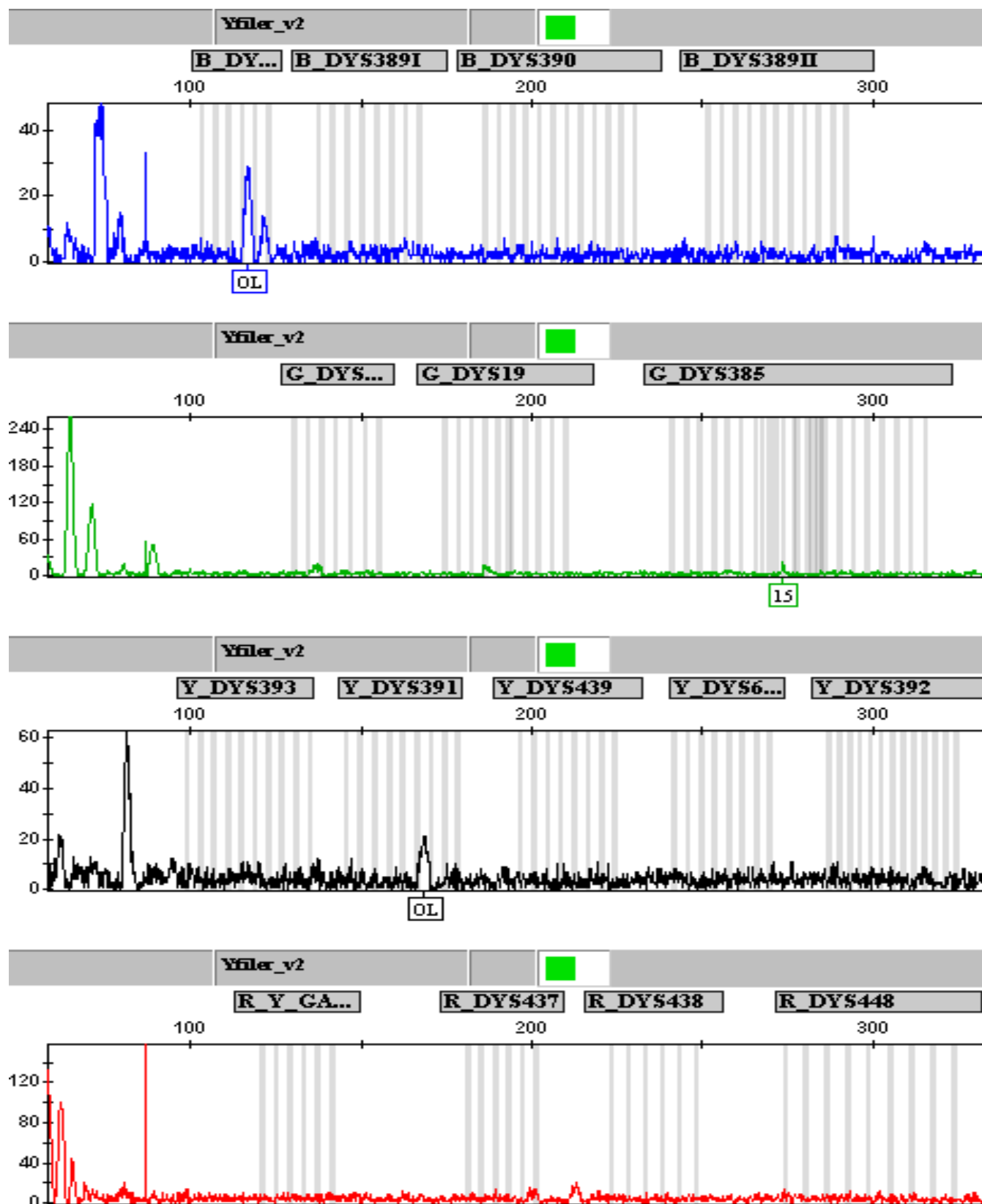


Figura 52 - Eletroferograma, com perfil Y-STR da amostra 312h (13º dia de decomposição), do experimento *in situ* no Brasil, mostrando a amplificação do local DYS385 (15).

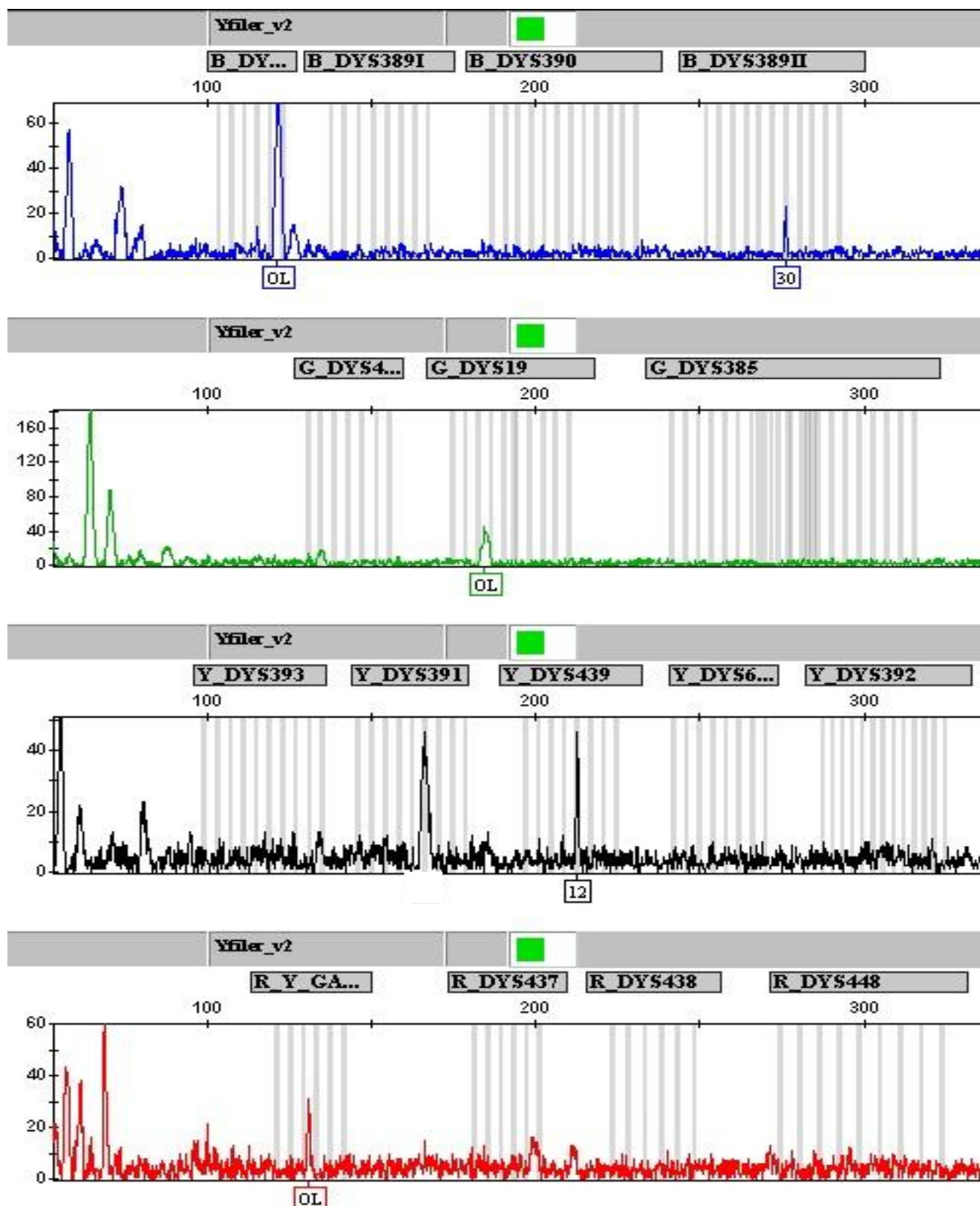


Figura 53 - Eletroferograma, com perfil Y-STR da amostra 336h (14° dia de decomposição), do experimento *in situ* no Brasil, mostrando a amplificação do local DYS389 II (30) e DY439 (12).