

LAURA SOFIA RAMOS MENDES CAINÉ

*Entomologia Forense:
Identificação Genética de Espécies
em Portugal*

FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA
2010

Dissertação elaborada para obtenção do Grau de Doutor
em Ciências da Saúde, ramo de Ciências Biomédicas,
apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de Coimbra.

Trabalho realizado no Serviço de Genética Forense da
Delegação do Norte, do Instituto Nacional de Medicina Legal, I.P.
(Presidente: Professor Doutor Duarte Nuno Vieira) sob a
orientação do Professor Doutor Francisco Corte Real e sob a
co-orientação da Professora Doutora Maria de Fátima Pinheiro.

RESUMO

A Entomologia Forense, consiste no estudo da interacção de insectos e outros artrópodes com questões legais. Pode ser dividida em: urbana, referente a produtos alimentares e médico-legal. Em Entomologia Forense a investigação criminal pode beneficiar dos métodos moleculares de genotipagem, como a identificação do cadáver através do conteúdo gástrico larvar ou a identificação genética da espécie, de uma prova entomológica.

Este estudo teve como objectivos: a comparação de diferentes métodos de extracção de DNA, utilizados em Entomologia Forense Molecular, a análise das principais diferenças, relativas à ocorrência de espécies encontradas em distintas condições ambientais e climáticas em cadáveres humanos, em Portugal e a elaboração de uma base de dados entomológicos.

O DNA dos 314 espécimes que fizeram parte deste estudo e dos conteúdos gástricos larvares, foi extraído através de diferentes processos, de modo a possibilitar a comparação entre métodos. Para o estudo de microssatélites humanos, a partir do conteúdo gástrico larvar, foi utilizado um sistema *multiplex*. Na reacção de amplificação para DNA mitocondrial foram utilizados *primers* específicos para as diferentes regiões estudadas (citocromo b e citocromo oxidase I).

Os diferentes métodos de extracção de DNA utilizados não aparentaram revelar diferenças significativas entre si. Contudo, o método de extracção orgânica foi o que demonstrou maior sensibilidade nas amostras utilizadas para análise do conteúdo gástrico larvar (obtenção de DNA humano).

Foram identificadas um total de oito espécies, sendo que a maior diversidade de espécies foi encontrada em cadáveres cujo aparecimento ocorreu durante os meses que apresentavam temperaturas elevadas. Relativamente aos diferentes habitats, foi observada uma maior diversidade de espécies em cadáveres encontrados em espaço aberto.

Este estudo não inclui todas as espécies que poderão ser encontradas num cadáver, mas poderá ser representativo da ocorrência das principais espécies de interesse forense em Portugal, pois constitui o início de uma base dados entomológicos.

ABSTRACT

Forensic entomology consists in the study of the interaction of insects and other arthropods with legal issues. It can be divided into three subcategories – the urban, questions relating to food stuffs, and medico-legal.

In forensic entomology, criminal investigations can benefit from the use of molecular methods of genotyping, such as the identification of cadavers from the larval gastric contents or the genetic identification of species of entomological evidences.

This study's objectives were: to compare different methods of DNA extraction used in the field of molecular forensic entomology; to analyse the principal differences in the occurrence of species encountered in human cadavers in Portugal depending on the environmental and climatic conditions; and to develop a related entomological database.

The DNA of the 314 specimens that made up this study and the larvae gastric contents was extracted using various different processes in such a way as to allow comparison between the different methods. A multiplex system was used for the study of human microsatellites through the gastric larval contents. For the amplification of mitochondrial DNA specific primers were used relating to the different regions studied (cytochrome b e cytochrome oxidase I).

No significant differences were shown between the different methods of DNA extraction used. However, the method of organic extraction was the one that demonstrated greatest sensitivity in the samples used for analyses of larval gastric contents (in terms of the human DNA obtained).

In all, a total of eight species were identified among which the greatest diversity of species were found in cadavers which arose in the months characterised by the highest temperatures. In relation to different habitats, the largest diversity of species was found in cadavers located in open spaces.

This study does not include all the species that can be found in cadavers but it does document the occurrence of the principal species of forensic interest in Portugal and thus can constitute the beginnings of an entomological database.

AGRADECIMENTOS

Ao Senhor Professor Doutor **Francisco Corte Real**, certa de não dispor de palavras suficientes para exprimir a minha gratidão por toda a sua orientação, sensatez e rigor com que sempre me aconselhou.

À Senhora Professora Doutora **Maria de Fátima Pinheiro**, Directora do Serviço de Genética e Biologia Forense da Delegação do Norte do I.N.M.L., I.P., o meu profundo reconhecimento, pelo apoio, disponibilidade e amizade.

Ao Senhor Professor Doutor **Duarte Nuno Vieira**, Presidente do I.N.M.L., I.P. e à Senhora Professora Doutora **Teresa Magalhães**, Directora da Delegação do Norte do I.N.M.L., I.P., pelas facilidades concedidas para realização deste trabalho de investigação.

Aos Senhores Drs. **Bessa Oliveira** e **Pedro Rezende**, pela indispensável colaboração nas colheitas dos exemplares e informação, imprescindíveis para a prossecução deste estudo.

À Senhora Professora Doutora **Marta Saloña**, na qualidade de entomóloga, pela identificação clássica dos exemplares.

À Senhora Dra. **Eduarda Matos**, pela realização da análise estatística.

Aos Senhores Professores Doutores **Marian de Pancorbo** e **Agostinho Santos**, pelo excelente espírito crítico ao longo de todo este trabalho.

À **Gabi**, pela paciência e auxílio técnico e a todos os outros meus colegas, pelo bom ambiente de trabalho que me proporcionaram.

Ao **António**, por estar presente, com toda a sua compreensão, em especial nas horas em que tudo parecia esmorecer e ao **Martim Maria**, simplesmente por existir.

INDÍCE

1. JUSTIFICAÇÃO DO ESTUDO E OBJECTIVOS	2
2. INTRODUÇÃO	4
2.1 BREVE RESUMO HISTÓRICO DA ENTOMOLOGIA FORENSE	4
2.2 FENÓMENOS CADAVERÍCOS PUTREFACTIVOS.....	7
2.3 PRINCIPAIS ESPÉCIES DE INSECTOS DE INTERESSE FORENSE	10
2.3.1 Família Calliphoridae.....	10
2.3.2 Família Sarcophagidae	13
2.4 ESTIMAÇÃO DO INTERVALO POST MORTEM.....	14
2.5 MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO BASEADOS NA ANÁLISE DE DNA.....	16
2.5.1 Identificação genética da espécie.....	17
2.5.2 Análise do conteúdo gástrico larvar.....	20
3. MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 COLHEITA E PRESERVAÇÃO DE AMOSTRAS.....	23
3.2 EXTRACÇÃO DO DNA	28
3.2.1 Amostras utilizadas para identificação da espécie	30
3.2.1.1 Extracção orgânica	31
3.2.1.2 DNeasy® Tissue Kit	32
3.2.1.3 BioRobot® EZ1.....	33
3.2.2 Amostras utilizadas para análise do conteúdo gástrico larvar.....	34
3.2.2.1 Chelex® 100.....	34
3.3 AMPLIFICAÇÃO DO DNA.....	35
3.3.1 Microssatélites - AmpF!STR® Identifier™ PCR Amplification Kit.....	36
3.3.2 DNA Mitocondrial.....	37
3.4 PURIFICAÇÃO DO DNA MITOCONDRIAL.....	39
3.5 SEQUENCIAÇÃO DO DNA MITOCONDRIAL.....	40

3.6 SEPARAÇÃO E DETECÇÃO DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS	41
3.7 DESIGNAÇÃO ALÉLICA (MICROSSATÉLITES)	42
3.8 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS DE DNA MITOCONDRIAL	43
3.8.1 Determinação da espécie.....	43
3.8.2 Análise filogenética	44
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	44
4. RESULTADOS	47
4.1 EXTRACÇÃO DO DNA	47
4.1.1 Identificação da espécie.....	47
4.1.2 Análise do conteúdo gástrico larvar (DNA humano)	49
4.2 IDENTIFICAÇÃO DA ESPÉCIE.....	52
4.2.1 <i>Primers</i> C1-J-2495/C1-N-2800 - TL2-N-3014, C1-J-1687/ TY-J-1460	53
4.2.2 <i>Primers</i> C1-N-2191/C1-J-1718.....	56
4.3 DISTRIBUIÇÃO DA ESPÉCIE	57
4.4 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS.....	60
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	67
5. DISCUSSÃO.....	70
5.1 EXTRACÇÃO DO DNA	70
5.1.1 Identificação da espécie.....	70
5.1.2 Análise do conteúdo gástrico larvar (DNA humano)	71
5.2 IDENTIFICAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DA ESPÉCIE	76
5.3 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS.....	79
5.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	82
5.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	83
6. CONCLUSÕES.....	85
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87

1. JUSTIFICAÇÃO DO ESTUDO E OBJECTIVOS

1. JUSTIFICAÇÃO DO ESTUDO E OBJECTIVOS

A identificação detalhada da entomofauna da área geográfica, onde uma determinada morte ocorreu, é essencial para uma aproximação correcta da estimativa do tempo decorrido após a morte.

Em Portugal, existiu até 2009 uma total ausência de dados entomológicos, sobre as principais espécies de interesse forense que colonizam cadáveres humanos.

Deste modo, este estudo é justificado pela necessidade de elaboração de uma base de dados das referidas espécies.

Os objectivos deste trabalho foram:

- Comparar diferentes métodos de extracção de DNA, utilizados em Entomologia Forense Molecular.

- Analisar e comparar as principais diferenças, relativas à ocorrência de espécies encontradas em diferentes condições climáticas e ambientais.

- Efectuar o estudo da colonização cadavérica (ordem Díptera) em cadáveres humanos, de modo a iniciar uma base de dados entomológicos, em Portugal.

2. INTRODUÇÃO

2. INTRODUÇÃO

A Entomologia Forense consiste no estudo da interacção de insectos e outros artrópodes com questões legais, podendo ser dividida em três áreas principais: a urbana, a referente a produtos alimentares e a médico-legal (Byrd e Castner, 2001). A primeira diz respeito a disputas relativas ao meio ambiente que envolvam insectos e inclui acções de negligência relacionadas com infestações, por exemplo, de enfermarias (hospitais) ou de cadáveres (agências funerárias), com larvas de insectos. A segunda relaciona-se com a presença de artrópodes ou parte deles, em alimentos ou produtos empregues na sua confecção. A Entomologia Médico-Legal visa, nomeadamente, a utilidade dos insectos na resolução de casos criminais (Hall, 2001).

2.1 BREVE RESUMO HISTÓRICO DA ENTOMOLOGIA FORENSE

O primeiro caso de Entomologia Forense documentado encontra-se descrito num manual de Medicina Chinês, do século XIII. O caso descrito refere-se ao homicídio de um agricultor degolado por uma gadanha. Para solucionar o caso foi deliberado que todos os agricultores da região que pudessem estar relacionados com o ocorrido, depositassem os seus instrumentos de trabalho em determinado local, ao ar livre, tendo sido constatado que apenas sobre um deles se acercaram moscas.

Esta constatação levou à identificação do assassino, que acabou por confessar o delito; porquanto, as moscas eram atraídas pelos vestígios de sangue que ficaram aderentes à arma do crime (Benecke, 2001).

Durante muito tempo manteve-se a crença de que as larvas que surgiam no cadáver eram geradas espontaneamente a partir do próprio cadáver. Tal convicção foi mantida até que um naturalista do Renascimento, Francisco Redi, demonstrou que as larvas procediam de insectos, que depositavam os ovos no cadáver. Redi fez experiências com diversos tipos de tecidos musculares e descreveu o observado. Assim, concluiu que os ovos eram depositados nos fragmentos de tecidos, aos quais eram atraídas distintas espécies de insectos que se transformavam em larvas, depois em pupas, de onde saíam os insectos adultos (Magaña, 2001).

Em 1831, Orfila, um médico francês, assistiu a um grande número de exumações, observou que os corpos eram habitados por diversos artrópodes e relatou o importante papel das larvas na decomposição cadavérica.

O primeiro caso de Entomologia Forense moderna que incluiu uma estimativa do intervalo *post mortem* (IPM) é da autoria do médico francês Bergeret, em 1855 (Bergeret, 1855). No entanto, este revela nos seus trabalhos uma ausência de conhecimento relativo à sucessão dos artrópodes nos cadáveres.

Em 1894, Mégnin utilizando os seus quinze anos de experiência médico-legal com cadáveres, publica "*La faune des cadáveres: application de l'entomologie a la médecine légale*", um clássico que dá início à aplicação da Entomologia Forense na resolução de perícias no âmbito médico-legal. Nesta obra, Mégnin refere como estimar o IPM através do estudo das diferentes sucessões de espécies de artrópodes encontradas num cadáver em decomposição.

Muito posteriormente, surge a Entomologia Forense moderna com os trabalhos de vários autores como Leclerq (Leclerq, 1978), Smith (Smith, 1986), Catts e Haskell (Catts e Haskell, 1990), entre outros. Este grande hiato temporal foi devido, provavelmente, ao reduzido número de casos, à falta de entomólogos especializados no estudo da entomofauna cadavérica e à não cooperação entre estes e os peritos em Medicina Legal.

Recentemente, trabalhos experimentais efectuados em corpos carbonizados (Avila e Goff, 1998), sepultados (VanLaerhoven e Anderson, 1999), submersos (Hobischak e Anderson, 2001; Anderson e Hobischak, 2004) e com lesões provocadas por disparo de arma de fogo (Roeterdink, 2004), estabelecem parâmetros, susceptíveis de serem aplicados a situações similares reais. São disso exemplo os estudos realizados em diversas áreas geográficas, como a Austrália (Wallman e Adams, 2001), (Harvey, 2003), Áustria (Grassberger, 2003), Alemanha (Schroeder, 2003_a), Espanha (Arnaldos, 2004), Japão

(Saigusa, 2005), Uruguai (Lyra, 2005), China (Wang, 2008), Portugal (Cainé, 2009).

2.2 FENÓMENOS CADAVERÍCOS PUTREFACTIVOS

Os fenómenos *post mortem* podem ser divididos em abióticos, evidentes após o cessar das funções vitais e transformativos, responsáveis pelas extensas modificações da morfologia e estrutura do cadáver. Estes últimos podem ser destrutivos, originando o decaimento da matéria orgânica (autólise e putrefacção) ou conservadores, causadores das transformações ocorridas no cadáver de acordo com as condições ambientais (saponificação, mumificação e corificação).

A putrefacção, sendo o processo destrutivo que ocorre com maior frequência, consiste num tipo de decomposição fermentativa, de origem bacteriana, no qual ocorre a desintegração das moléculas através de reacções de redução e oxidação.

Os microrganismos responsáveis pela putrefacção produzem enzimas que actuam selectivamente sobre os compostos orgânicos, originando modificações profundas, que conduzem à destruição do cadáver. Os microrganismos existentes no sistema digestivo desempenham as principais acções responsáveis por este processo, que tem início com a actividade das bactérias aeróbias que absorvem o oxigénio.

Esta acção permite, posteriormente, o desenvolvimento de microrganismos aeróbios facultativos e anaeróbios. Estes últimos desempenham a máxima acção de desintegração.

A evolução dos fenómenos putrefactivos pode ser subdividida em quatro períodos: coloração (cromático), produção de gás (enfisematoso), liquefacção e redução esquelética. O estudo destas modificações putrefactivas, conjugado com as influências ambientais (humidade, temperatura e arejamento) e com os factores individuais (idade, estrutura física, causa de morte), podem constituir marcadores orientativos do diagnóstico do tempo de morte. No entanto, convém realçar que as modificações putrefactivas podem variar de cadáver para cadáver, de ambiente para ambiente e até mesmo em distintas regiões corporais do mesmo cadáver.

O período cromático tem início com o aparecimento da mancha verde, que consiste na primeira manifestação objectiva e visível da putrefacção.

A mancha verde é originada pela acção do ácido sulfídrico, produzido pela putrefacção dos tecidos, sobre a hemoglobina na presença de oxigénio (Calabuig e Cañadas, 2003). Esta mancha pode ser observada numa fase inicial na parte inferior do abdómen, frequentemente com início na fossa ilíaca direita, ao nível do cego, onde a flora intestinal é mais abundante, geralmente 24 a 48 horas após a morte ter ocorrido, dependendo das referidas influências ambientais e individuais.

A coloração esverdeada progride de modo gradual para a restante região abdominal e, posteriormente, escurece, tornando-se cinzento-esverdeada.

Durante o período enfisematoso, caracterizado pelo desenvolvimento de grande quantidade de gases, a infiltração gasosa invade o tecido subcutâneo (enfisema putrefactivo). As bactérias responsáveis pela putrefacção colonizam o sistema venoso, originando a hemólise do sangue, tornando, deste modo, evidente a rede venosa superficial, devido à deslocação de sangue cadavérico para a periferia.

No período de liquefacção, a epiderme sofre um desprendimento de restos tecidulares resultantes do destacamento da derme, formando flictenas de dimensões variáveis, contendo líquido soro-hemático. Nesta fase os órgãos apresentam uma consistência muito amolecida e uma coloração vermelho-rosa. A pressão originada no interior do cadáver devida à formação de gases no abdómen, vai sendo libertada através da expulsão dos mesmos, e este vai perdendo o aspecto que apresentava no período enfisematoso. Após várias semanas, o cadáver pode apresentar uma coloração próxima ou até mesmo, negra.

Internamente, a decomposição progride de modo mais lento que na superfície (Knight, 1996).

Paulatinamente, no período de redução esquelética os tecidos moles e órgãos são desintegrados pelo processo de liquefacção, restando os órgãos mais sólidos como o útero, coração e próstata e os elementos mais resistentes tais como tecidos fibrosos, ligamentos e cartilagens (Knight, 1996). Neste período podem, eventualmente, desaparecer todos os tecidos, ficando o cadáver reduzido à esqueletização total.

2.3 PRINCIPAIS ESPÉCIES DE INSECTOS DE INTERESSE FORENSE

A ordem Diptera compreende cerca de 86000 espécies conhecidas (Byrd e Castner, 2001), sendo uma das maiores ordens de insectos. As espécies que fazem parte desta ordem podem ser encontradas em quase todos os habitats.

Sob o ponto de vista morfológico apresentam apenas um par de asas, encontrando-se o segundo par reduzido a halteres, utilizado na estabilização do voo, e um par de olhos compostos.

As larvas dos dípteros possuem corpo de consistência mole, de tonalidade creme e sem membros de locomoção, não se encontrando a cabeça diferenciada.

2.3.1 Família Calliphoridae

A família Calliphoridae contém mais de 1000 espécies (Byrd e Castner, 2001) e compreende as mais importantes espécies

capazes de fornecer informação relativa a uma determinação do IPM. Estas espécies são atraídas por matéria orgânica em decomposição e por excrementos, deste modo constituem os primeiros insectos a localizar e colonizar cadáveres.

As larvas desta família são caracterizadas pela sua capacidade energética e voracidade, pois segregam fluidos digestivos que contêm enzimas proteolíticas que facilitam e aceleram a decomposição dos tecidos.

Os adultos depositam sucessivas e significativas quantidades de massas de ovos que produzem novas gerações de larvas. Esta deposição é efectuada preferencialmente nos orifícios naturais expostos do cadáver e nas possíveis lesões transformativas abertas existentes na superfície corporal. A eventual perda de tecido e a desidratação tornam o cadáver um hospedeiro pouco atractivo para a deposição de ovos e por esta razão, mesmo os estádios avançados de decomposição não apresentam larvas desta família.

A dimensão dos adultos pode variar entre 6 a 14 milímetros (mm) de comprimento e as larvas maduras podem variar entre 8 a 23 mm.

As espécies *Calliphora vicina* (Robineau-Desvoidy) e *Calliphora vomitoria* (Linnaeus), vulgarmente denominadas de moscas azuis, podem atingir dimensões variáveis entre 7 a 14 mm. Estas moscas possuem um abdómen robusto, com pêlos e de tonalidade azul metálico. O tórax possui riscas escuras longitudinais na superfície dorsal da base das asas.

As moscas azuis desempenham um papel fundamental na decomposição da matéria orgânica, uma vez que os adultos são fortemente atraídos por matéria em putrefacção.

De distribuição praticamente mundial, colonizam habitats urbanos e rurais, sendo muito comum a sua presença em cadáveres humanos.

O seu desenvolvimento fica completo entre duas a três semanas.

A distinção morfológica entre as duas espécies de *C. vicina* e *C. vomitoria* é feita com base na tonalidade da parte inferior da cabeça, imediatamente por baixo dos olhos, que na primeira espécie é de tom avermelhado e na segunda é negra.

Os indivíduos do género *Lucilia* (Meigen), comumente denominadas moscas verdes, apresentam uma variação no comprimento entre 6 a 12 mm. O abdómen e o tórax possuem uma tonalidade verde metálica.

Os adultos são atraídos por tecidos animais e humanos frescos e, ocasionalmente, por excrementos. Alguns espécimes vivem de modo parasita sobre ferimentos de animais de sangue quente (Reichholf-Riehm, 1990).

As larvas têm preferência por matéria fecal e em putrefacção (Byrd e Castner, 2001).

A sua distribuição é mais frequente na Europa e Ásia (Sibéria) (Reichholf-Riehm, 1990).

Os indivíduos adultos pertencentes ao género *Chrysomya* apresentam corpos pouco robustos e cabeça de grandes dimensões, com olhos bastantes proeminentes de tom avermelhado. São atraídos não só por matéria orgânica em decomposição e de odor adocicado, mas também por excrementos líquidos e sólidos.

2.3.2 Família Sarcophagidae

Esta família compreende cerca de 2000 espécies (Byrd e Castner, 2001), distribuídas mundialmente pelas regiões tropicais e temperadas.

Os indivíduos desta família são frequentemente observados em habitats interiores ou em condições adversas que impossibilitam o voo a outros insectos. Por esta razão, encontram-se entre os primeiros insectos a localizar restos cadavéricos, logo a seguir aos indivíduos da família Calliphoridae.

Os adultos são atraídos, preferencialmente, por substâncias adocicadas, embora possam também ser encontrados associados aos primeiros e últimos estádios de decomposição. As larvas são fortemente atraídas por matéria em putrefacção.

Os espécimes desta família apresentam uma dimensão média que pode variar entre 2 a 14 mm (Byrd e Castner, 2001). Os adultos possuem olhos de tom avermelhado e o corpo com cerdas. Possuem no tórax, frequentemente, riscas longitudinais, de cor cinza e negro e um padrão em mosaico no abdómen.

Os exemplares desta família são muito semelhantes entre si, quer no estado adulto, quer larvar. Tal facto torna estes espécimes bastante difíceis de identificar ao nível da espécie através dos métodos clássicos.

As fêmeas desta espécie depositam, ao invés das frequentes massas de ovos, o primeiro estágio de desenvolvimento larvar nos restos em decomposição. Por este motivo as massas de ovos habitualmente observadas em cadáveres não poderão ser atribuídas a espécies desta família. O período de tempo necessário ao desenvolvimento dos ovos não deverá ser levado em linha de conta aquando da estimativa do IPM.

2.4 ESTIMATIVA DO INTERVALO POST MORTEM

O conhecimento da sucessão de insectos, aquando da colonização cadavérica, numa determinada área geográfica permite, através da análise da entomofauna do cadáver, fazer uma estimativa do tempo decorrido depois da morte (Anderson, 2001).

A estimativa do IPM é efectuada segundo um de dois métodos.

Um dos métodos, geralmente utilizado nas primeiras fases do processo de decomposição cadavérica, usa informação relativa à estimativa da idade dos estádios imaturos que aproveitam o cadáver como fonte de alimento. Os insectos utilizados para esta estimativa são geralmente dípteros pertencentes às famílias, Calliphoridae e Sarcophagidae.

Uma vez que estes dípteros se consideram como sendo os primeiros a depositar ovos no cadáver alguns minutos após a morte ter ocorrido, a estimativa da idade dos ovos, das larvas ou das pupas mais antigos fornecerá um IPM mínimo (Catts, 1990; Anderson, 1995).

Este método não proporciona dados relativos à estimativa do IPM máximo, dado que existe uma ausência de conhecimento do período decorrido entre a morte e a deposição dos ovos.

O outro método baseia-se na progressiva sucessão de artrópodes encontrados no cadáver (Catts e Goff, 1992) e no facto de cada fase da decomposição cadavérica atrair selectivamente determinadas espécies. A análise desta sucessão poderá, deste modo, fornecer informação sobre o tempo decorrido após a morte, com estimativas dos intervalos mínimos e máximos de IPM.

Para aplicar este método é necessário elaborar uma precisa base de dados da sucessão de insectos que ocorre numa determinada área geográfica. Esta base é geralmente construída através de modelos animais (Wells e LaMotte, 2001) e servirá para posterior comparação.

No entanto, diversas variáveis, tais como os factores ambientais e geográficos, podem influenciar a entomofauna de uma determinada região e consequentemente, afectar a determinação do IPM. Ou seja, estas variáveis quando não consideradas podem ter um efeito pernicioso numa precisa estimativa do IPM.

Apesar da existência de trabalhos publicados sobre a sucessão faunística cadavérica humana em diversos locais geográficos, Portugal, até ao ano de 2009 (Cainé, 2009), apresentava uma total ausência de dados entomológicos.

2.5 MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO BASEADOS NA ANÁLISE DE DNA

Em Entomologia Forense a investigação pode beneficiar de diversos métodos moleculares de genotipagem, sendo o mais comum a identificação genética da espécie.

Outras aplicações podem incluir a identificação do cadáver através do conteúdo gástrico larvar ou a caracterização da estrutura genética populacional de um determinado grupo de insectos com interesse forense.

Nas células superiores o DNA (ácido desoxirribonucleico) constitui o depósito fundamental da informação genética e encontra-se fundamentalmente, no núcleo, fazendo parte dos cromossomas (DNA nuclear). Existe também uma pequena quantidade no citoplasma, dentro das mitocôndrias (DNA mitocondrial).

A maioria das técnicas utilizadas em sistemática molecular animal baseiam-se no estudo da molécula do DNA mitocondrial (DNAm_t). O seu elevado número de cópias por célula, tornam a amplificação mais sensível e a sua configuração circular diminui a propensão à degradação.

2.5.1 Identificação genética da espécie

A identificação precisa da espécie de uma prova entomológica representa um passo crucial na análise forense. Espécies taxonomicamente relacionadas podem divergir substancialmente nas taxas de crescimento, diapausa (estado fisiológico no qual os insectos apresentam uma actividade reduzida) e hábitos ecológicos.

O diagnóstico da espécie baseado nas características morfológicas/anatómicas do espécime pode revelar-se inútil na distinção de estádios imaturos, quer devido a estes, não raras vezes, serem morfológicamente indistinguíveis, quer devido à inexistência de chaves para a sua classificação.

A utilização do DNA na caracterização destes estádios encontra-se amplamente descrita na literatura científica, sendo a equipa Sperling (Sperling, 1994) pioneira no seu uso. Esta descrição pode ser encontrada, não só para insectos adultos e larvas, mas também para pupários vazios (Mazzanti, 2010).

Várias regiões do DNA foram propostas para a supra-mencionada caracterização, tais como os RAPDs (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*) (Benecke, 1998), os AFLPs (*Amplified Fragment Length Polymorphisms*), (Picard, 2010), o gene para a subunidade ribossómica 28S do rRNA (Stevens, 2001), a subunidade 5 da NADH desidrogenase (Zehner, 2004_b), ou a região ITS2 (*internal transcribed spacer 2*) do rRNA (Song, 2008), (Nelson, 2008), não existindo no entanto uniformidade na escolha de um *locus*. Contudo, a selecção de um único *locus* exige precauções adicionais na distinção de espécies geneticamente próximas (Wells, 2007_a).

A identificação da espécie em seres vertebrados poderá ser efectuada com base na região *D-loop* da molécula do DNAm_t, contudo, para a maioria dos animais o gene de eleição é o citocromo b (Parson, 2000), (Branicki, 2003), da referida região.

Embora este gene tenha sido utilizado com sucesso na determinação da espécie de insectos (Simmons e Weller, 2001), (Pancorbo, 2004), a região codificante do DNAm_t, citocromo oxidase I (COI ou cox 1) parece ser a eleita na maioria dos estudos envolvendo a classe Insecta (Malgorn, 1999), (Vincent, 2000), (Wells e Sperling, 2001_b). Este gene apresenta várias vantagens aplicáveis à identificação genética de espécies, tais como, a facilidade com que é isolado, o elevado número de cópias na célula e a sua sequência e estrutura que se mantêm conservadas através dos taxa, o que faz com que seja, frequentemente, analisado pela maioria dos investigadores.

A sua principal limitação reside na incapacidade de, por vezes, distinguir espécies geneticamente próximas como as do género *Calliphora*. No entanto, para as espécies *C. vicina* e *C. vomitoria*, o estudo deste gene seguido de uma digestão com a enzima de restrição *Sfcl*, tornam possível esta diferenciação de modo rápido e fiável (Ames, 2006).

As espécies da família Calliphoridae apresentam variações intra-específicas no haplótipos de DNAm_t, deste modo, a validação de testes moleculares na população de insectos da área geográfica que se pretende estudar é imprescindível (Wells e Williams, 2007_b).

Espécies provenientes de novas localidades podem não coincidir na sua totalidade com as sequências de DNAMt publicadas, o que suscita questões relativas aos níveis aceitáveis, de variação, aquando da identificação genética (Harvey, 2008).

2.5.2 Análise do conteúdo gástrico larvar

Aquando da colheita de larvas utilizadas para estimativa do IPM é frequentemente assumido que estas se alimentaram/desenvolveram no cadáver, uma vez que a colheita é efectuada directamente no cadáver ou num local muito próximo do mesmo. No entanto, a associação larva-cadáver nem sempre é possível de observar. Situações como a remoção do cadáver da cena do crime, ou a presença de uma fonte alternativa de alimento, podem exigir a comprovação da referida associação (Wells, 2001_a).

A obtenção de DNA humano a partir de insectos pode ser utilizada para diversas finalidades, tais como a identificação de um suspeito numa agressão sexual (Lord, 1998), ou a genotipagem de indivíduos a partir de mosquitos (Kreike, 1999).

Para identificação de DNA humano no conteúdo gástrico larvar e posterior comparação com uma amostra de referência do cadáver, poderá ser estudado o DNA nuclear (microssatélites)

(Zehner, 2004_a) ou, na impossibilidade da sua análise, o estudo do DNAmT (Linville, 2004).

Os microssatélites, também designados de STR (*short tandem repeats*) foram pela primeira vez utilizados como marcadores polimórficos em 1989 (Litt e Luty, 1989).

Podem ser definidos como pequenas sequências de DNA, de 2 a 7 pares de bases (pb) de tamanho, repetidas em tandem e dispersas pelo genoma, com uma frequência estimada de aproximadamente um STR por cada 300-500 kilobases (Edwards, 1992).

Como o tamanho dos alelos dos *loci* STR é relativamente pequeno, menor do que 350 pb (Brinkmann, 1996), a sua análise é bastante sensível e rápida, podendo ser estudados a partir de amostras com quantidades muito pequenas de DNA.

No entanto, em amostras muito degradadas, como as provenientes do conteúdo gástrico larvar, o estudo dos STR não permite a obtenção de resultados, o que conduz ao estudo das regiões hipervariáveis (HVI e HVII) da região controlo (*displacement loop*, *D-loop*) da molécula do DNAmT. Esta região não codificante, é responsável pela regulação da replicação e da transcrição de todo o DNAmT e apresenta alta variabilidade devido, não só à ausência de histonas protectoras e de um sistema de reparação do DNA, mas também à elevada sensibilidade ao stress oxidativo causado pelos radicais livres, com efeito mutagénico.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 COLHEITA E PRESERVAÇÃO DE AMOSTRAS

Os 314 espécimes que fizeram parte deste estudo foram colhidos em 42 cadáveres, no Instituto Nacional de Medicina Legal, aquando da realização das autópsias médico-legais, no período de Junho de 2003 até Janeiro de 2009.

Fizeram parte deste estudo, não só larvas em diferentes estádios de desenvolvimento quando observados durante a colheita, mas também, insectos adultos identificados através dos métodos clássicos (morfológicos). Os insectos adultos colhidos não foram utilizados para o estudo molecular. Estes serviram para posterior comparação da espécie obtida, através dos métodos moleculares.

As amostras foram colhidas com pinças descartáveis, acondicionadas em tubos individuais, identificadas e preservadas em etanol absoluto, a -80°C .

Quanto ao tipo de amostras de referência colhidas aos cadáveres, estas dependeram do estado de decomposição cadavérica. Preferencialmente procedeu-se à realização de mancha de sangue. Esta foi efectuada directamente sobre cartão (Whatman®) próprio para o efeito, identificadas e secas à temperatura ambiente.

Na impossibilidade da realização de mancha de sangue foi colhida uma das seguintes amostras: fragmento de osso longo (preferencialmente fêmur), dente ou unha.

Todas as amostras de referência depois de colhidas foram preservadas a -80°C e, quando necessário, foram processadas e utilizadas para comparação com o conteúdo gástrico larvar.

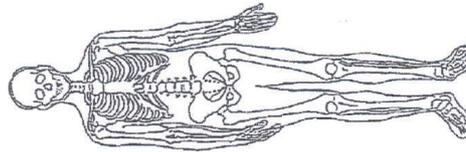
Por cada processo foi preenchida uma ficha de colheita (Figura 1) não só com dados relativos ao cadáver como à autópsia médico-legal (Tabela I), mas também dados referentes aos espécimes obtidos e ao exame de local.

Ficha de Colheita – Entomologia Forense

Processo nº: Caso nº:
 Data: / / Hora: Localidade:

Cadáver

Idade Provável: Sexo: Observações:
 Fase de Decomposição:
 Exposição: Fluidos Orgânicos:
 Vestuário:
 Lesões Traumáticas:



Local

Meteorologia:
 Rural: Urbano: Aquático:
 Vegetação: Solo:
 Observações:

Nº exemplares

Ovos: Larvas: Pupas: Casulos: Adulto:
 Outras espécies:

Autópsia

Lesões Traumáticas:

 Possível Causa:
 Amostras recolhidas:
 Armazenamento:
 Informação social:

Figura 1 – Ficha de colheita utilizada na recolha de dados.

Tabela I – Dados referentes aos 42 cadáveres e exemplares colhidos.

CASO	S	I	LOC	MÊS	CPM	EXEMPLARES COLHIDOS
1	M	88	CS - Coimbra	08	IDT	LII
2	---	---	--- - Leiria	08	---	LIII
3	M	64	CM - Porto	01	AVC	LIII
4	M	72	CS - Porto	02	Natural	LIII
5	M	58	CS - Porto	03	Natural	LIII + IA
6	M	50	CS - Porto	03	AVC	LIII
7	M	62	CM - Guarda	03	IDT	LIII
8	M	59	CM - Porto	05	IDT	LIII
9	M	22	CM - Porto	06	TCE	LIII
10	M	38	CS - Porto	07	IDT	LIII
11	M	32	CS - Porto	08	IDT	LIII
12	M	69	CM - Porto	10	TCE	LIII
13	M	59	CS - Porto	12	IDT	LIII
14	M	71	CM - Porto	12	IDT	LIII
15	M	48	CS - Porto	05	IDT	LIII
16	M	55	CS - Porto	06	IDT	LIII
17	M	F	CM - Porto	07	---	LIII
18	M	35	CM - Porto	07	IDT	LIII
19	M	43	CS - Porto	08	IDT	LIII
20	M	35	CS - Porto	08	ASF	LIII

S – sexo; I – idade; LOC – local de aparecimento do cadáver; CPM – causa provável de morte; CS – casa; CM – campo; LII – estágio larvar II; LIII – estágio larvar III; IA – insecto adulto; AVC – acidente vascular cerebral; IDT – indeterminada; TCE – traumatismo crânio encefálico; F - feto; ASF – asfixia.

Tabela I (cont.) – Dados referentes aos 42 cadáveres e exemplares colhidos.

CASO	S	I	LOC	MÊS	CPM	EXEMPLARES COLHIDOS
21	M	41	CS - Porto	08	IDT	LIII + IA
22	M	66	CM - Porto	08	IDT	LIII
23	M	66	CS - Porto	08	ASF	LIII
24	F	66	CS - Porto	08	IDT	LIII
25	---	---	--- - Porto	10	---	LIII
26	M	54	CS - Porto	04	IDT	LIII
27	M	55	CS - Porto	05	IDT	LIII
28	M	40	CS - Porto	05	IDT	LIII
29	M	51	CM - Porto	05	IDT	LIII
30	M	74	CS - Porto	01	Natural	LIII
31	M	56	CS - Porto	02	IDT	LII + IA
32	M	23	CM - Porto	03	TCE	LIII
33	F	69	CS - Porto	03	Natural	LIII
34	M	70	CS - Porto	04	Natural	LIII
35	M	51	CM - Porto	07	IDT	LIII + IA
36	M	51	CS - Porto	10	Natural	LIII
37	M	63	--- - Porto	12	IDT	LIII
38	F	36	CM - Porto	12	IDT	LIII + IA
39	F	77	CS - Porto	03	IDT	LIII
40	M	43	CS - Porto	03	IDT	LIII
41	M	37	CS - Porto	03	IDT	LIII
42	F	47	CS - Porto	03	IM	LIII

S – sexo; I – idade; LOC – local de aparecimento do cadáver; CPM – causa provável de morte; CS – casa; CM – campo; LII – estágio larvar II; LIII – estágio larvar III; IA – insecto adulto; AVC – acidente vascular cerebral; IDT – indeterminada; TCE – traumatismo crânio encefálico; F - feto; ASF – asfixia; IM – intoxicação medicamentosa.

3.2 EXTRACÇÃO DO DNA

Todas as larvas foram retiradas dos contentores onde tinham sido depositadas aquando da colheita e colocadas numa solução de lixívia a 20%, de modo a eliminar potenciais contaminantes externos, tal como o DNA do cadáver, de acordo com Linville (Linville, 2002).

Cada espécime submetido a estudo foi colocado sobre uma placa de Petri descartável e estéril e seccionado com uma lâmina de bisturi descartável através de uma incisão ventral. Foi utilizado o terço inferior da larva, sendo o restante preservado a -80°C.

A partir dos exemplares colhidos em cinco cadáveres, foram seleccionadas larvas no estágio II, às quais foi removido o saco gástrico (Figura 2), sendo este depois utilizado para obtenção de DNA humano.

Quanto à selecção das larvas estudadas, foram unicamente analisadas larvas em estágio II, cujo saco gástrico media cerca de 1mm, uma vez que em larvas muito jovens a dissecção e a remoção deste foram procedimentos que, por vezes, se revelaram impossíveis de realizar, dada a dificuldade de retirar intacto o saco gástrico.

Em relação às larvas mais maduras, um dos motivos para a sua não selecção, foi o facto do processamento de alimento ter tendência a cessar em estádios mais avançados, encontrando-se muitas vezes o saco gástrico vazio.

Outro dos motivos, é o facto de estas larvas possuírem, geralmente, grandes concentrações de lípidos (Campobasso, 2005) o que, posteriormente, pode afectar a amplificação de DNA.

A escolha desta peça anatómica interior deveu-se por um lado, ao facto de o conteúdo do saco gástrico, provavelmente, não se encontrar totalmente digerido, como o do estômago ou do intestino e, por outro, à diminuição da probabilidade de contaminação do exterior da larva com o material cadavérico. O remanescente larvar foi preservado a -80°C.

Nos insectos adultos apenas foi utilizado o abdómen, sendo as restantes partes anatómicas preservadas para posterior identificação morfológica da espécie.

Nos cadáveres em que foram colhidas larvas para posterior obtenção de DNA humano foi, também, colhida uma amostra de referência do cadáver.

O DNA foi extraído através de diferentes processos, de modo a possibilitar a comparação entre métodos.

Todos os procedimentos de extracção realizados foram efectuados na sala de extracção e incluíram um controlo negativo.



Figura 2 – Visualização do saco gástrico na larva.

3.2.1 Amostras utilizadas para identificação da espécie

A identificação da espécie da larva foi realizada em 314 amostras que foram submetidas a um dos seguintes métodos de extracção: com solventes orgânicos, através da utilização do kit *DNeasy® Tissue Kit* (Qiagen) e usando o aparelho *BioRobot® EZ1* (Qiagen).

A identificação genética da espécie foi confirmada, sempre que a remoção do saco gástrico não impediu a identificação morfológica, por métodos clássicos, tarefa que foi efectuada por um entomólogo, recorrendo a chaves dicotómicas e guias entomológicos (Smith, 1986; Chinery, 1986; González-Mora e Peris, 1988; Peris e González-Mora, 1991), conforme o defendido por diversos autores.

3.2.1.1 Extracção orgânica

Este método facilita a remoção de proteínas dos ácidos nucleicos, utilizando solventes orgânicos, seguida de uma precipitação com etanol absoluto.

No final deste tipo de extracção é possível obter DNA de alto peso molecular, com elevado grau de pureza e de longa duração.

O protocolo de extracção orgânica utilizado neste estudo foi modificado a partir do protocolo proposto por Maniatis, 1982, que utiliza os solventes fenol e clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). As principais alterações ao referido protocolo consistiram em:

- Adicionar ao conteúdo do saco gástrico 470 microlitros (μ l) de tampão de extracção:
 - 10 milimolar (mM) trishidroximetilaminometano hidrocloreto (Tris-HCl) a pH 8.0, 2 mM EDTA (ácido etilenodiaminotetracético);
 - 10 mM NaCl (cloreto de sódio), 1% SDS (sódio dodecil sulfato);
 - 10 mg/ml DTT (ditiotretol), 0.5 mg/ml de proteinase K.
- Colocar as amostras em banho a 56°C, durante cerca de 3 horas (h), agitar durante 5 segundos (s) e centrifugar (Eppendorf Centrifuge 5415 C) por 3 minutos (m) a 14000 rotações por minuto (rpm);

- Retirar o sobrenadante, transferi-lo para um novo tubo e adicionar 400µl de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) (USB Corporation);
- Agitar durante 30s, centrifugar 5m a 14000 rpm e depois retirar a fase superior para novo tubo (rejeitar o precipitado);
- Adicionar 600µl de etanol absoluto frio e inverter suavemente (esta precipitação vai permitir a concentração do DNA), de seguida colocar as amostras a -20°C durante 30m;
- Centrifugar por 15m a 14 000 rpm e no final decantar o etanol. Secar durante 1h no *DNA Speed Vac*[®] (Savant);
- Adicionar 25µl de água desionizada (dH₂O) autoclavada;
- Congelar o DNA extraído a -80°C, até posterior utilização.

3.2.1.2 DNeasy[®] Tissue Kit

A extracção utilizando o *kit DNeasy[®] Tissue Kit* permite uma lise celular directa, seguida de uma ligação selectiva do DNA a uma membrana de sílica-gel, sem recorrer à extracção orgânica ou à precipitação através do etanol. A extracção foi efectuada de acordo com as instruções do manual *DNeasy[®] Tissue Handbook* (Qiagen, 2003_a), referentes ao protocolo de purificação de DNA a partir de tecidos animais.

3.2.1.3 BioRobot® EZ1

Este aparelho efectua de modo automático a extracção e purificação de ácidos nucleicos. A sua tecnologia envolve o uso de cartuchos isolados, que contêm, entre outros componentes, partículas magnéticas de sílica, às quais os referidos ácidos se ligam. Estas partículas, são depois separadas por uma fonte magnética, que posteriormente sofrem um processo de lavagem. Numa fase final, o DNA é eluído numa solução de baixa força iónica.

A extracção foi realizada de acordo com as indicações do manual *EZ1 DNA Handbook* (Qiagen, 2004), referentes ao protocolo de purificação do DNA genómico a partir de tecidos, utilizando o cartão pré-programado *EZ1 DNA Forensic Card* e seleccionando o volume final de eluição de 50µl.

Nos estudos publicados por Montpetit, 2005 e Anslinger, 2005 são descritas as reduzidas possibilidades de contaminação entre amostras utilizando o *BioRobot® EZ1*. Por esse motivo, neste procedimento de extracção não foram incluídos controlos negativos.

3.2.2 Amostras utilizadas para análise do conteúdo gástrico larvar (DNA humano)

O saco gástrico foi removido, efectuando uma incisão ventral na larva (em estágio II), tendo o seu conteúdo sido utilizado para obter DNA humano (microsatélites e DNAm).

Os métodos efectuados para a extracção do DNA foram: extracção orgânica (descrito em 3.2.1.1), utilização do aparelho *BioRobot® EZ1* (descrito em 3.2.1.3) e *Chelex® 100*.

Cada método foi efectuado em duplicado, para cada um dos cinco cadáveres.

3.2.2.1 *Chelex® 100*

O *Chelex® 100* é uma resina quelante com grande afinidade para iões polivalentes que, por este motivo, previne a degradação do DNA em presença de iões metálicos a altas temperaturas e em condições de baixa força iónica.

Segundo o protocolo de Walsh, 1991, o DNA obtido através desta metodologia é de curta duração e de cadeia simples.

Uma vez retirado o saco gástrico larvar foi efectuado sobre ele uma incisão de modo a permitir a libertação de todo o seu conteúdo, o qual foi depois submetido ao seguinte procedimento:

- Efectuar uma mancha, em cartão Whatman®, a partir do conteúdo gástrico larvar e deixar secar à temperatura ambiente;
- Cortar um fragmento de aproximadamente 3mm² dessa mancha, adicionar 1ml de dH₂O autoclavada e deixar repousar 30m. No final, centrifugar por 3m a 14000 rpm;
- Eliminar o sobrenadante, exceptuando apenas cerca de 30µl, onde permanecerá a mancha. Adicionar 170µl de Chelex®100 a 5% e, de seguida, colocar em banho a 56°C durante 30m;
- Agitar durante 5s e incubar 8m em água a ferver;
- Furar as tampas dos tubos com uma agulha estéril;
- Agitar durante 5s, centrifugar durante 3m a 14000 rpm, e congelar o DNA extraído a -80°C, até posterior utilização.

3.3 AMPLIFICAÇÃO DO DNA

A amplificação enzimática *in vitro* de sequências específicas de DNA, foi efectuada pelo método de reacção em cadeia da polimerase, *Polymerase Chain Reaction* (PCR) (Mullis, 1986).

Todas as reacções de amplificação incluíram um controlo negativo, decorreram num termociclador *GeneAmp® PCR System 9700* (Applied Biosystems) e foram realizadas na sala de pré-PCR.

Todos os controlos negativos incluídos nos procedimentos de extracção e de amplificação foram sujeitos à PCR.

3.3.1 Microssatélites - AmpF \mathbb{L} STR \mathbb{R} Identifier \mathbb{T} M PCR Amplification Kit

Para o estudo de microssatélites humanos a partir do conteúdo gástrico das larvas, foi utilizado um sistema *multiplex* para amplificar quinze *loci* e um fragmento do gene da amelogenina. A amplificação deste fragmento gera produtos de diferentes tamanhos dos cromossomas X e Y, sendo, por isso, utilizada para diferenciar sexos.

Os *loci* amplificados no sistema AmpF \mathbb{L} STR \mathbb{R} Identifier \mathbb{T} M PCR Amplification Kit (*Applied Biosystems*) foram: D8S1179 (Oldroyd, 1995), D3S1358 (Li, 1993), vWA (von Willebrand) (Kimpton, 1992), D21S11 (Sharma e Litt, 1992), D16S539 (Cooperative Human Linkage Center), D18S51 (Urquhart, 1995), D5S818 e D13S317 (Hudson, 1995), D7S820 (Green, 1991), TH01 (tirosina hidroxilase) (Edwards, 1992), TPOX (tiróide peroxidase) (Anker, 1992), CSF1PO (c-fms proto-oncogene para o receptor CSF-1) (Hammond, 1994), FGA (alfa-fibrinogénio, FIBRA) (Mills, 1992), D2S1338 (Watson, 1998), D19S433 (Lareu, 1998) e amelogenina (Sullivan, 1993).

Foram utilizados *primers*, marcados com moléculas fluorescentes, que permitiram a posterior detecção e observação dos vários fragmentos nos sequenciadores automáticos ABI PRISM \mathbb{R} 310 e ABI PRISM \mathbb{R} 3100 Genetic Analyzer (*Applied Biosystems*).

A co-amplificação do fragmento do gene da amelogenina e dos 15 *loci* foi realizada de acordo com o protocolo referido no manual *AmpFlSTR® Identifier™ PCR Amplification Kit User's Manual* (Applied Biosystems, 2001).

3.3.2 DNA Mitocondrial

Foi utilizado para amplificação de uma região do gene do citocromo b para posterior identificação da espécie humana, o par de *primers* L14816 (5'-CCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA-3') e H17173 (5'-CCCCTCAGAATGATATTGTCCTCA-3') (Eurogentec). A metodologia foi realizada de acordo com o referido em Parson, 2000.

As sequências nucleotídicas deste gene, localizado no genoma mitocondrial, são específicas de cada espécie e, como tal, podem ser utilizadas para efectuar a identificação da espécie humana.

Foram utilizados para amplificação de uma região do gene da citocromo oxidase subunidade I (COI), para posterior identificação da espécie, os seguintes pares de *primers*: C1-J-2495 (5'-CAGCTACTTTATGAGCTTTAGG-3') e C1-N-2800 (5'-CATTCAAGCTGTGTAAGCATC-3') ou C1-J-2495 e TL2-N-3014 (5'-TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA-3') ou C1-J-1687 (5'-CAATTCCAAA TCCTCCAATTAT-3') e TY-J-1460 (5'-TACAATTTATCGCCTAAACTT CAGCC-3') (Operon Technologies).

O procedimento foi efectuado de acordo com o descrito nos trabalhos de Wells e Sperling, 1999, 2001_b. Estes dois trabalhos, permitiram também efectuar a selecção dos *primers* utilizados neste estudo, uma vez que possibilitam a identificação de várias espécies.

O par de *primers* C1-J-2495/C1-N-2800 foi o utilizado na totalidade das larvas. Nas sequências em que foram obtidos resultados não satisfatórios, foram efectuadas novas amplificações com outro dos pares de *primers*.

Na reacção de amplificação para DNAm foram utilizados *primers* específicos, de acordo com a região em estudo.

O volume final de 25µl consistiu em: 2.5µl tampão GeneAmp® 10X PCR Buffer (Applied Biosystems), 1.5µl MgCl₂ (solução 25 Mm) (Applied Biosystems), 0.6µl dNTPs (desoxinucleótidos) GeneAmp® 10 mM dNTP Mix (Applied Biosystems), 0.4µl AmpliTaq Gold® DNA polimerase 5U (Applied Biosystems), 0.5µl *primer forward*, 0.5µl *primer reverse*, 1µl BSA 9.8mg/ml (Bovine Serum Albuminase) (Amersham Biosciences), 17µl dH₂O e autoclavada e 1µl DNA.

Após as reacções de amplificação o sucesso das mesmas foi comprovado em gel de agarose a 1.5% (SeaKen®GTG®, FMC BioProducts), ao qual foram adicionados 2ml brometo de etídio (Sigma). Seguidamente, o gel foi colocado sobre um transiluminador (LKB, Bromma) e visualizado sobre luz ultravioleta.

Para tal, a cada 3ml de produto amplificado foi adicionado 3ml de azul de bromofenol (Amresco). Foi utilizado um marcador de peso molecular de 123 pb (Invitrogen).

Para efectuar a diferenciação das espécies *Calliphora vicina* e *Calliphora vomitoria*, após a amplificação utilizando os *primers* C1-N-2191 (5'-CCCGGTAAAATATAAACTTC-3') e C1-J-1718 (5'-GGAGGATTGGAAATTGATTAGTTCC-3') (Operon Technologies), efectuou-se a digestão dos produtos amplificados com a enzima de restrição *Sfci* (*Streptococcus faecium*) (New England Biolabs) e a sua posterior incubação durante 1h, a 37°C.

As amostras foram depois submetidas a electroforese em gel de agarose a 2% com brometo de etídio, tendo os fragmentos obtidos sido corados com azul de bromofenol, visualizados num transiluminador, e comparados com um marcador de peso molecular de 123 pb.

O procedimento foi realizado de acordo com o descrito em Ames, 2006.

3.4 PURIFICAÇÃO DO DNA MITOCONDRIAL

Após a amplificação, os produtos de reacção foram directamente purificados utilizando *MinElute™ PCR Purification Kit* (Qiagen). Este *kit*, específico para isolar fragmentos de DNA (através de uma ligação selectiva a uma membrana), permite a remoção de contaminantes por lavagem, com recuperação de DNA numa percentagem de cerca de 80% (eluição).

O procedimento foi realizado de acordo com o manual *MinElute® Handbook* (Qiagen, 2003_b), e com o protocolo referente à utilização de microcentrifuga.

3.5 SEQUENCIAÇÃO DO DNA MITOCONDRIAL

Na sequenciação pelo método enzimático directo, os didesoxinucleótidos (ddNTPs) (terminadores) impedem a continuação do alongamento da cadeia de DNA. Estes são moléculas semelhantes aos dNTPs, aos quais falta o grupo OH no carbono 3' da desoxirribose, impedindo, deste modo, a ligação de outro dNTP. Tal facto, impossibilita o alongamento da nova cadeia de DNA sintetizada. O método utiliza uma polimerase, dNTPs, ddNTPs marcados com fluorescência e um único *primer* (*forward* ou *reverse*), que permite a cópia de apenas uma das cadeias de DNA.

No final são produzidas várias cadeias simples de DNA com terminadores incorporados, com diferentes tamanhos e que constituem a sequência alvo.

Deste modo, procedeu-se à sequenciação directa com *ABI PRISM® BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit*, de acordo com o protocolo do fabricante (Applied Biosystems, 2002).

O volume final de 10ml consistiu em: 5.75ml dH₂O e autoclavada, 1.5ml *Reaction Mix*, 0.75ml tampão de sequenciação 5X, 1ml *primer*, 1ml produto amplificado purificado.

A reacção de sequenciação foi efectuada para ambas as cadeias, *forward* e *reverse* e foram utilizados, separadamente, os mesmos *primers* da PCR.

Os terminadores não incorporados e os excessos de *primer* e tampão foram directamente removidos da reacção de sequenciação com *DyeEx™ 2.0 Spin Kit* (Qiagen). Esta remoção foi efectuada através de um gel de filtração, uma resina pré-hidratada que separa as moléculas de acordo com o seu peso molecular.

O procedimento foi realizado de acordo com o manual de utilização *DyeEx™ Handbook* (Qiagen, 2002) e com o protocolo referente a *DyeE 2.0 Spin Protocol*.

3.6 SEPARAÇÃO E DETECÇÃO DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS

Durante a electroforese capilar com detecção automática por fluorescência, após uma excitação com um laser de árgon, cada um dos fluorocromos emite o seu máximo de fluorescência a um comprimento de onda (λ) diferente, detectado depois pelo sequenciador automático. Durante a recolha de dados, os sinais fluorescentes são separados por difracção de acordo com o comprimento de onda.

A separação dos produtos amplificados e a sua detecção decorreu num dos sequenciadores automáticos *ABI PRISM® 310/ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems) de acordo com os manuais do fabricante.

Os dados obtidos foram automaticamente recolhidos pelo *ABI PRISM® Data Collection Software v.3.0.0*.

Em relação aos microssatélites, a determinação do tamanho dos fragmentos foi automática, tendo-se utilizado o *ABI PRISM® GeneScan Software Analysis v.3.7.1*, método *Local Southern* (Elder e Southern, 1987).

Na sequenciação a análise foi efectuada de forma automática através do *ABI PRISM® DNA Sequencing Analysis Software v.3.7*.

3.7 DESIGNAÇÃO ALÉLICA (MICROSSATÉLITES)

A designação alélica foi feita automaticamente com *Genotyper® Software v.3.7* por comparação com o *ladder* alélico incluído no *kit* e em concordância com as recomendações da Comissão de DNA da Sociedade Internacional de Genética Forense (DNA Commission of the ISFH, 1997).

3.8 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS DE DNA MITOCONDRIAL

3.8.1 Determinação da espécie

Depois da análise automática das sequências, os electroforetogramas obtidos foram confirmados. Sempre que necessário, foram corrigidos e os respectivos ficheiros em formato FASTA (utilizado para representar sequências) alinhados manualmente, para permitir a posterior identificação da espécie.

Para identificação da espécie, o formato FASTA da sequência a analisar foi submetido à base de dados genéticos (GenBank) disponível *online* do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), utilizando o motor de busca BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*).

Este sistema compara a sequência que é submetida com as que constam na base de dados (sequências das diversas espécies já identificadas), de modo a estabelecer homologias.

No final, os resultados são apresentados em valores percentuais, por ordem decrescente de grau de similaridade, *Maximum Scoring Segment Pair* (MSP), das sequências existentes com a sequência submetida. Ou seja, o máximo valor de MSP (100%) será obtido para a espécie mais homóloga com a sequência submetida.

3.8.2 Análise filogenética

A análise filogenética permite determinar as relações evolutivas entre espécies.

As sequências das espécies estudadas foram alinhadas utilizando o *software* SeaView (Galtier, 1996), através do programa MUSCLE, que permite alinhar e comparar múltiplas sequências em formato FASTA (menu *Alignement*).

As sequências com igual tamanho foram ajustadas para posterior obtenção da sequência consenso de cada espécie, utilizando a opção *Consensus sequence* (menu *Edit*).

As sequências consenso das espécies estudadas foram alinhadas e comparadas com o *software* ClustalX (Thompson, 1997).

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi efectuada através do *software* PASW (ex SPSS) Statistics Base 17.

Para a comparação das proporções espécie-mês de ocorrência e espécie-ambiente foi calculado o valor do teste de Qui-quadrado (X^2) de Pearson, que avalia a associação existente entre duas variáveis categóricas não emparelhadas. Foi considerado um nível de significância de 0.05.

Nos casos em que as células apresentavam uma frequência de indivíduos inferior a 5 em mais de 20%, as espécies foram agrupadas em três grupos: as espécies *Calliphora vicina* e *Calliphora vomitoria*, foram reunidas no grupo referente ao gênero *Calliphora* e as espécies *Lucilia sericata*, *Lucilia illustris*, *Lucilia caesar* e *Lucilia ampullacea*, no grupo referente ao gênero *Lucilia*. No que diz respeito a *Chrysomya albiceps*, uma vez que não existia nenhuma outra espécie que com ela pudesse ser agrupada, esta foi colocada isoladamente no grupo referente ao gênero *Chrysomya*. Em relação a *Sarcophaga* sp., uma vez que existiam apenas três exemplares, a sua existência não foi considerada na realização dos cálculos, por não permitir qualquer interpretação estatística.

No que diz respeito aos diferentes meios de aparecimento dos cadáveres, foram criados dois grupos: o referente a cadáveres encontrados no campo (ar livre), e o relativo a cadáveres cujo aparecimento se verificou dentro de casa.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 EXTRACÇÃO DO DNA

Os diferentes métodos de extracção foram comparados nas amostras utilizadas para identificação da espécie (resultados referentes à obtenção de sequências de DNAm) (Tabela II e Figuras 3-5) e nas amostras utilizadas para análise do conteúdo gástrico larvar. Nestas últimas, os resultados são respeitantes quer à obtenção de sequências de DNAm (Tabela III e Figura 6), quer à obtenção de perfis de microssatélites (Tabela IV e Figuras 8 e 9). Na Figura 7 é possível visualizar o perfil obtido para a amostra de referência do cadáver.

4.1.1 Identificação da espécie

Tabela II – Resultados obtidos (sequência de DNAm) segundo os diferentes métodos de extracção efectuados (n= 314).

MÉTODO DE EXTRACÇÃO	LARVAS ESTUDADAS (n)	OBTENÇÃO DE DNAm
Orgânica	24	Sim
<i>DNeasy® Tissue Kit</i>	50	Sim
<i>BioRobot® EZ1</i>	240	Sim

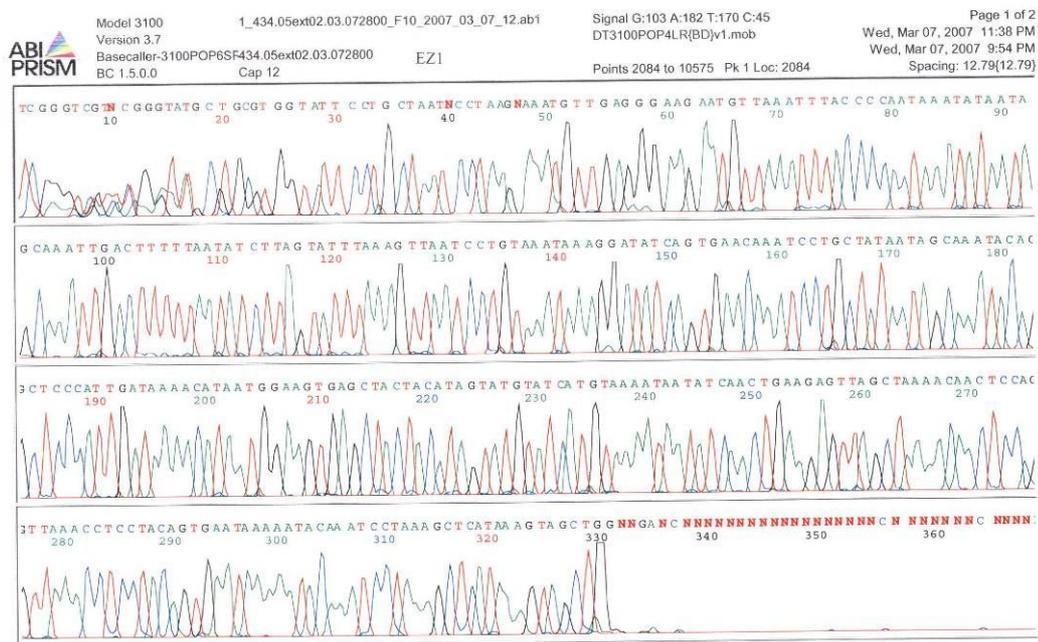


Figura 5 – Uma das seqüências obtidas utilizando o aparelho BioRobot® EZ1.

4.1.2 Análise do conteúdo gástrico larvar (DNA humano)

Tabela III – Sequências de DNAm (citocromo b), obtidas utilizando diferentes métodos de extracção. A percentagem obtida é referente ao grau de similaridade encontrada para a espécie *Homo sapiens*.

MÉTODO DE EXTRACÇÃO	DNAm (Citocromo b) – MSP
Chelex (n=10)	97%
Orgânica (n=10)	100%
BioRobot® EZ1 (n=10)	100%

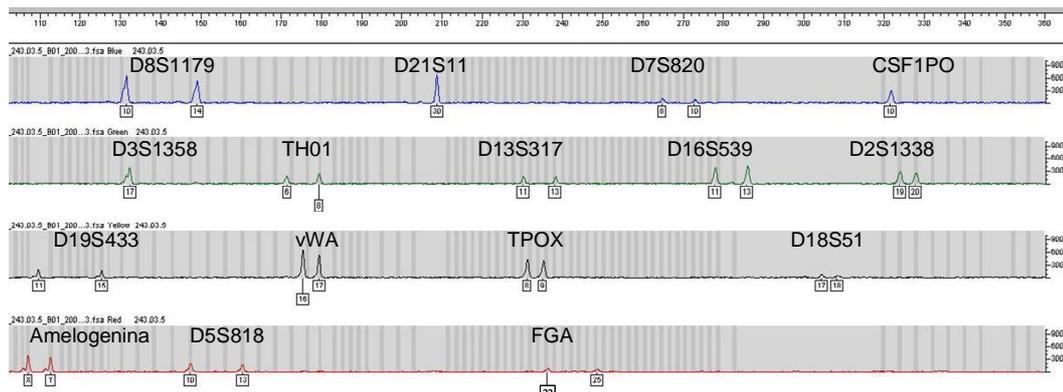


Figura 7 - Loci amplificados com o kit Identifiler® a partir da amostra de referência do cadáver, utilizando a extracção orgânica.

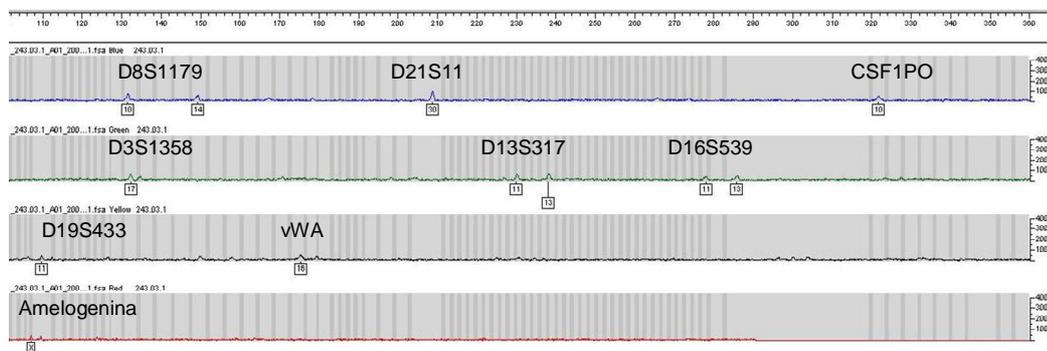


Figura 8 - Loci amplificados (Identifiler®) a partir da amostra do conteúdo gástrico larvar, utilizando a extracção orgânica, analisada no GeneScan com o valor de 50 para o parâmetro de limite de detecção.

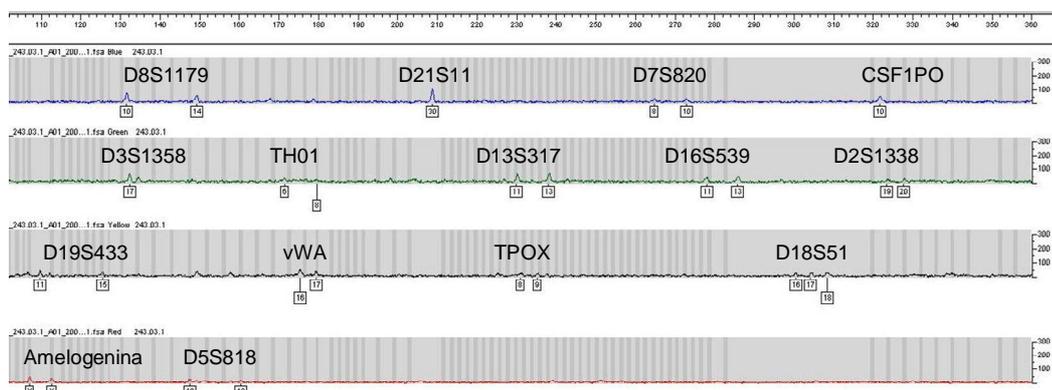


Figura 9 - Loci amplificados com o kit Identifiler® a partir da amostra do conteúdo gástrico larvar, utilizando a extracção orgânica, analisada no GeneScan com o valor de 30 para o parâmetro de limite de detecção.

4.2 IDENTIFICAÇÃO DA ESPÉCIE

Na identificação da espécie foram utilizados diversos pares de *primers* a partir dos quais foram identificadas oito espécies de insectos, ou seja, a partir das 314 larvas estudadas foram obtidas sequências de DNAm, que foram posteriormente, inseridas na base de dados do BLAST e comparadas, tendo sido obtido um valor de MSP de 100% (Tabela V).

4.2.1 Primers C1-J-2495/C1-N-2800 - TL2-N-3014, C1-J-1687/ TY-J-1460

Tabela V – Resultados obtidos para as 314 larvas, após submissão das sequências de no BLAST e posterior obtenção de um valor de MSP de 100%.

CASO	DNAmt (COI) – MSP	LARVAS ESTUDADAS (n)
1	<i>Chrysomya albiceps</i>	7
2	<i>Chrysomya albiceps</i>	2
3	<i>Calliphora vomitoria</i>	9
4	<i>Calliphora vicina</i>	6
	<i>Calliphora vomitoria</i>	1
5	<i>Calliphora vicina</i>	8
6	<i>Calliphora vicina</i>	6
7	<i>Calliphora vomitoria</i>	7
8	<i>Calliphora vomitoria</i>	6
	<i>Calliphora vicina</i>	1
9	<i>Calliphora vomitoria</i>	8
10	<i>Chrysomya albiceps</i>	8
11	<i>Chrysomya albiceps</i>	10
12	<i>Lucilia illustris</i>	2
	<i>Lucilia caesar</i>	7
	<i>Calliphora vomitoria</i>	1
13	<i>Calliphora vicina</i>	12
14	<i>Calliphora vicina</i>	7
	<i>Calliphora vomitoria</i>	2

Tabela V (cont.) – Resultados obtidos para as 314 larvas, após submissão das sequências no BLAST e posterior obtenção de um valor de MSP de 100%.

CASO	DNAmt (COI) – MSP	LARVAS ESTUDADAS (n)
15	<i>Sarcophaga argyrostoma</i>	3
	<i>Lucilia sericata</i>	8
	<i>Calliphora vomitoria</i>	1
16	<i>Lucilia sericata</i>	5
	<i>Calliphora vicina</i>	2
17	<i>Lucilia sericata</i>	2
	<i>Lucilia illustris</i>	1
	<i>Lucilia caesar</i>	3
18	<i>Lucilia sericata</i>	1
	<i>Lucilia caesar</i>	1
	<i>Chrysomya albiceps</i>	5
19	<i>Chrysomya albiceps</i>	10
	<i>Lucilia sericata</i>	1
20	<i>Calliphora vicina</i>	1
	<i>Lucilia illustris</i>	1
	<i>Lucilia ampullacea</i>	9
21	<i>Lucilia sericata</i>	10
22	<i>Chrysomya albiceps</i>	7
23	<i>Lucilia sericata</i>	8
24	<i>Chrysomya albiceps</i>	8
25	<i>Calliphora vicina</i>	2
	<i>Lucilia sericata</i>	4

Tabela V (cont.) – Resultados obtidos para as 314 larvas, após submissão das sequências no BLAST e posterior obtenção de um valor de MSP de 100%.

CASO	DNAmt (COI) – MSP	LARVAS ESTUDADAS (n)
26	<i>Calliphora vicina</i>	6
	<i>Calliphora vomitoria</i>	1
27	<i>Calliphora vomitoria</i>	4
28	<i>Calliphora vicina</i>	7
29	<i>Calliphora vomitoria</i>	9
30	<i>Calliphora vicina</i>	6
	<i>Calliphora vomitoria</i>	1
31	<i>Calliphora vicina</i>	7
32	<i>Calliphora vomitoria</i>	6
33	<i>Calliphora vicina</i>	7
34	<i>Chrysomya albiceps</i>	6
35	<i>Chrysomya albiceps</i>	7
36	<i>Calliphora vicina</i>	6
37	<i>Calliphora vicina</i>	7
38	<i>Calliphora vomitoria</i>	7
39	<i>Calliphora vicina</i>	3
	<i>Calliphora vomitoria</i>	2
40	<i>Calliphora vomitoria</i>	6
41	<i>Calliphora vicina</i>	6
42	<i>Calliphora vicina</i>	6
Total		314

4.2.2 Primers C1-N-2191/C1-J-1718

A amplificação da região do gene da COI utilizando os primers C1-N-2191/C1-J-1718, produziu um fragmento de 523 pb para as 178 amostras estudadas (Figura 10).

As 106 amostras de *Calliphora vicina*, depois de digeridas com a enzima de restrição *Sfcl*, produziram três fragmentos de 63, 239 e 273 pb (Figura 10, colunas 2 e 3).

As 72 amostras de *Calliphora vomitoria*, depois de digeridas com a enzima de restrição *Sfcl*, produziram dois fragmentos de 250 e 273 pb (Figura 10, colunas 4 e 5).

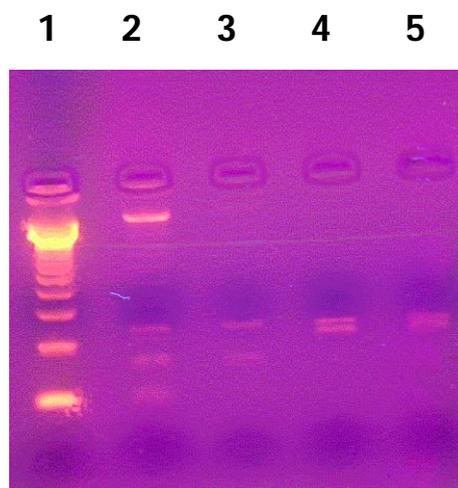


Figura 10 – Fotografia do gel dos produtos amplificados: 1 - ladder de 123 pb; 2 e 3 - fragmentos digeridos, de *Calliphora vicina*; 4 e 5 – fragmentos digeridos, de *Calliphora vomitoria*.

4.3 DISTRIBUIÇÃO DA ESPÉCIE

As oito espécies identificadas (Gráfico 1) foram posteriormente analisadas relativamente à frequência de aparecimento ao longo dos diferentes meses do ano (Gráficos 2-4) e diversos locais de aparecimento dos cadáveres (Gráfico 5).

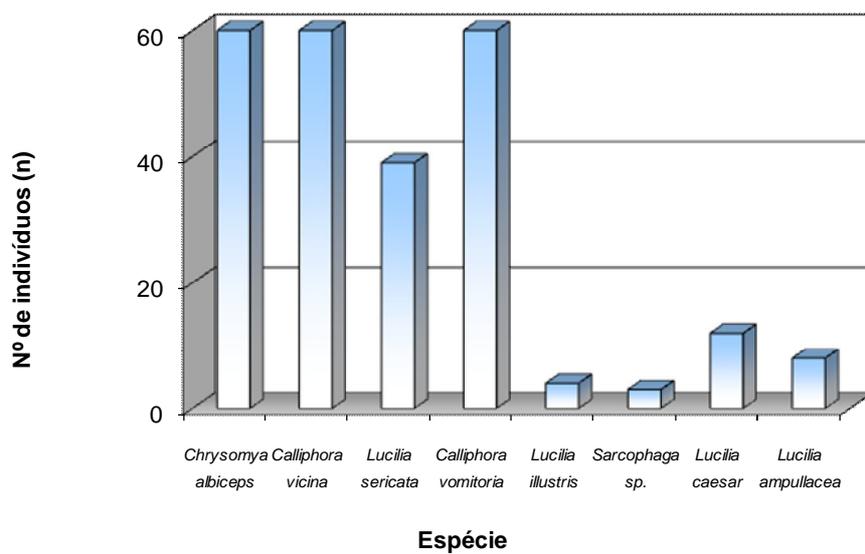


Gráfico 1 – Distribuição da frequência de indivíduos identificados por espécie.

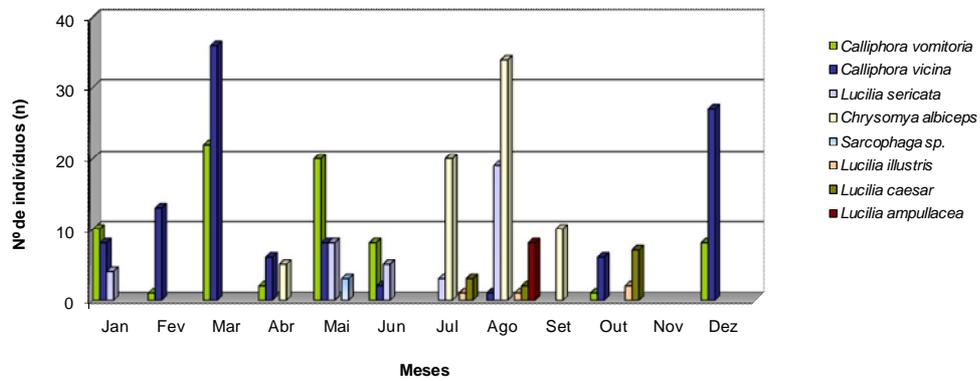


Gráfico 2 – Distribuição da espécie pelos diferentes meses do ano.

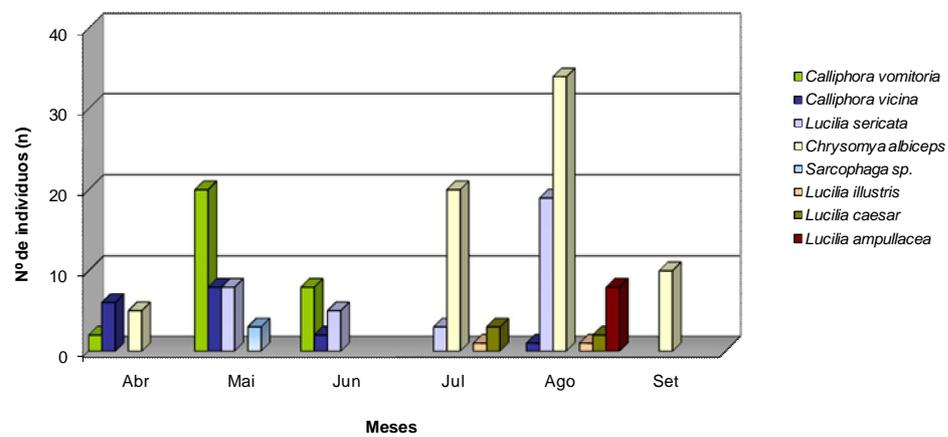


Gráfico 3 – Distribuição da espécie pelos meses que apresentam temperaturas mais elevadas.

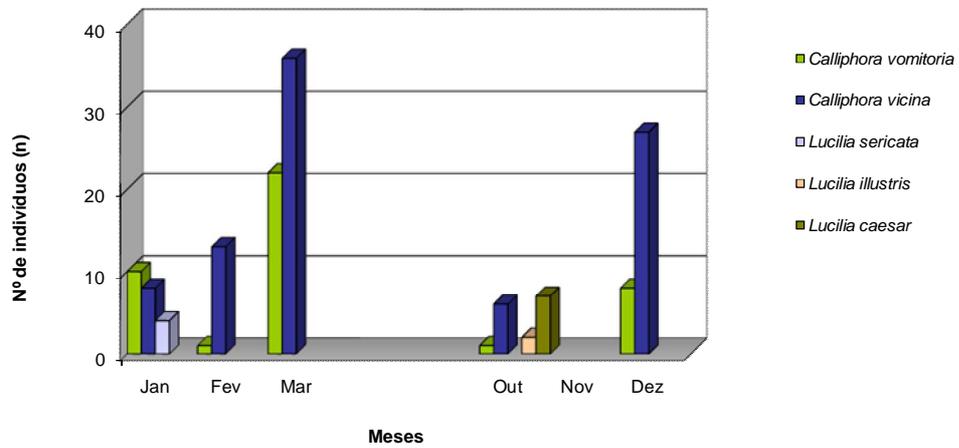


Gráfico 4 – Distribuição da espécie pelos meses que apresentam temperaturas mais reduzidas.

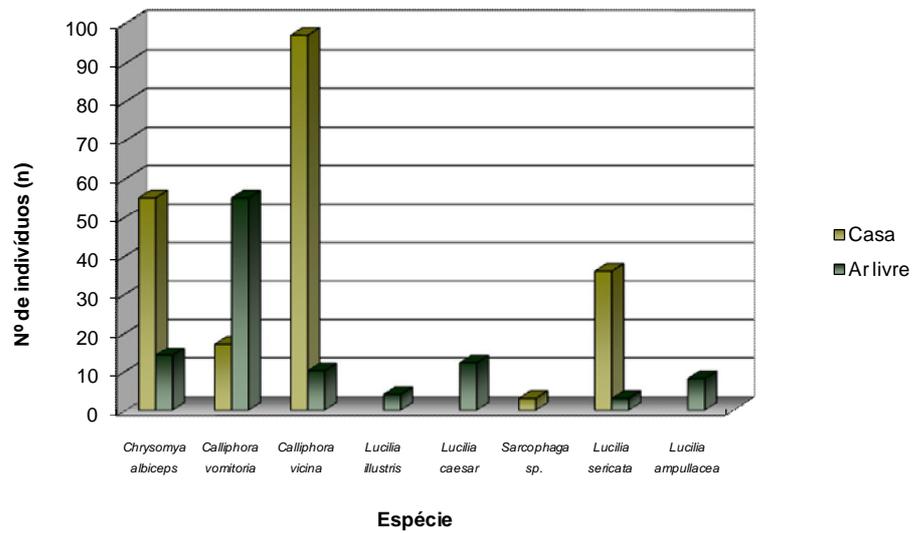


Gráfico 5 – Distribuição da espécie pelos diferentes meios de aparecimento dos cadáveres.

4.4 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS

O estudo foi realizado a partir das sequências obtidas (200 pb) após a utilização do par de *primers* C1-J-2495/C1-N-2800. Este par permitiu a identificação de seis espécies (MSP de 100%) e o par C1-J-1687/TY-J-1460 possibilitou a identificação de cinco espécies. Dado os melhores resultados que foram conseguidos com o par C1-J-2495/C1-N-2800, este foi o escolhido para a realização do estudo comparativo.

Deste modo, as espécies comparadas foram *Chrysomya albiceps*, *Calliphora vicina* e *Calliphora vomitória*, *Lucilia sericata*, *Lucilia illustris* e *Sarcophaga*.

O par C1-J-2495/ TL2-N-3014 foi apenas utilizado na confirmação de alguns resultados.

As sequências consenso obtidas para as seis espécies estudadas, após utilização do *software* SeaView, foram:

```
>C_C_Calbiceps_2800_consensus_70_a_276_en_original
CATCTATTGATATTATTTTACATGATACATATTATGTAGTAGCTCA
CTTCCATTATGTTCTTTCAATAGGAGCTGTATTCGCTATTATAGCA
GGATTCGTTTCATTGATTCCCATTATTTACTGGATTAACTCTAAATA
ATAAAATACTAAAAAGTCAATTTGCTATTATATTTATTGGAGTAAA
TTTAACATTCTTCCCT
```

```
>C_Cvicina
CTTCAGTAGACATTATTCTTCATGATACATATTATGTAGTTGCCCA
TTTCCATTATGTATTATCTATAGGAGCTGTATTCGCTATTATAGCA
GGATTCGTTCACTGATACCCTTTATTTACAGGATTAACCTTAAATG
GTAAAATATTTAAAAAGTCAATTTACTATTATATTTATTGGGGTTAA
TATTACATTCTTCCCT
```

```
>C_Cvomitoria
CTTCAGTAGACATTATTCTTCATGATACATATTATGTAGTTGCTCA
TTTCCATTATGTATTATCTATAGGAGCTGTATTTGCTATTATAGCA
GGATTTGTACACTGATACCCTTTATTTACAGGATTAACCTTAAACG
GTAAAATGCTAAAAAGTCAATTTACTATTATATTTATTGGAGTAAA
TATTACATTCTTCCCT
```

```
>C_C_Lillustris_2800_51_a_278_en_original
CTTCAGTTGATATTATTTTACATGACACATATTATGTAGTAGCTCA
CTTTCATTATGTATTATCAATAGGAGCTGTATTTGCTATTATAGCA
GGGTTTCGTTTCATTGATACCCTCTATTTACAGGACTAACTTTAAATG
CAAAGATGTTAAAGAGTCAATTTACTATTATATTTATTGGAGTAAA
TTTAACTTTCTTCCCT
```

```
>C_Lsericata_2800_consensus_47_a_268
CTTCAGTTGATATTATTTTACATGATACATACTATGTAGTAGCTCA
CTTCCATTATGTTTTATCAATGGGAGCTGTATTTGCTATTATAGCA
GGATTTGTTCACTGATATCCTTTATTTACAGGATTAACCTTAAATA
CTAAGATATTTAAAAAGTCAATTTGCTATTATATTTATTGGGGTAAA
TTTAACATTCTTCCCT
```

```
>C_Sarcophaga_2800_consensus_00_a_253
CATCAATTGATATTATTTTACATGATACATATTATGTAGTAGCTCA
TTTCCATTACGTACTATCAATAGGAGCTGTATTTGCTATTATAGCA
GGATTTGTTTCATTGATATCCCCTATTCCTGGATTAACATTAATA
CAAAAATATTTAAAAAGTCAATTTACTATTATATTTATAGGAGTAAA
CTTAACTTTCTTCCCT
```

Estas sequências consenso foram alinhadas e comparadas através do software ClustalX (Figura 11).

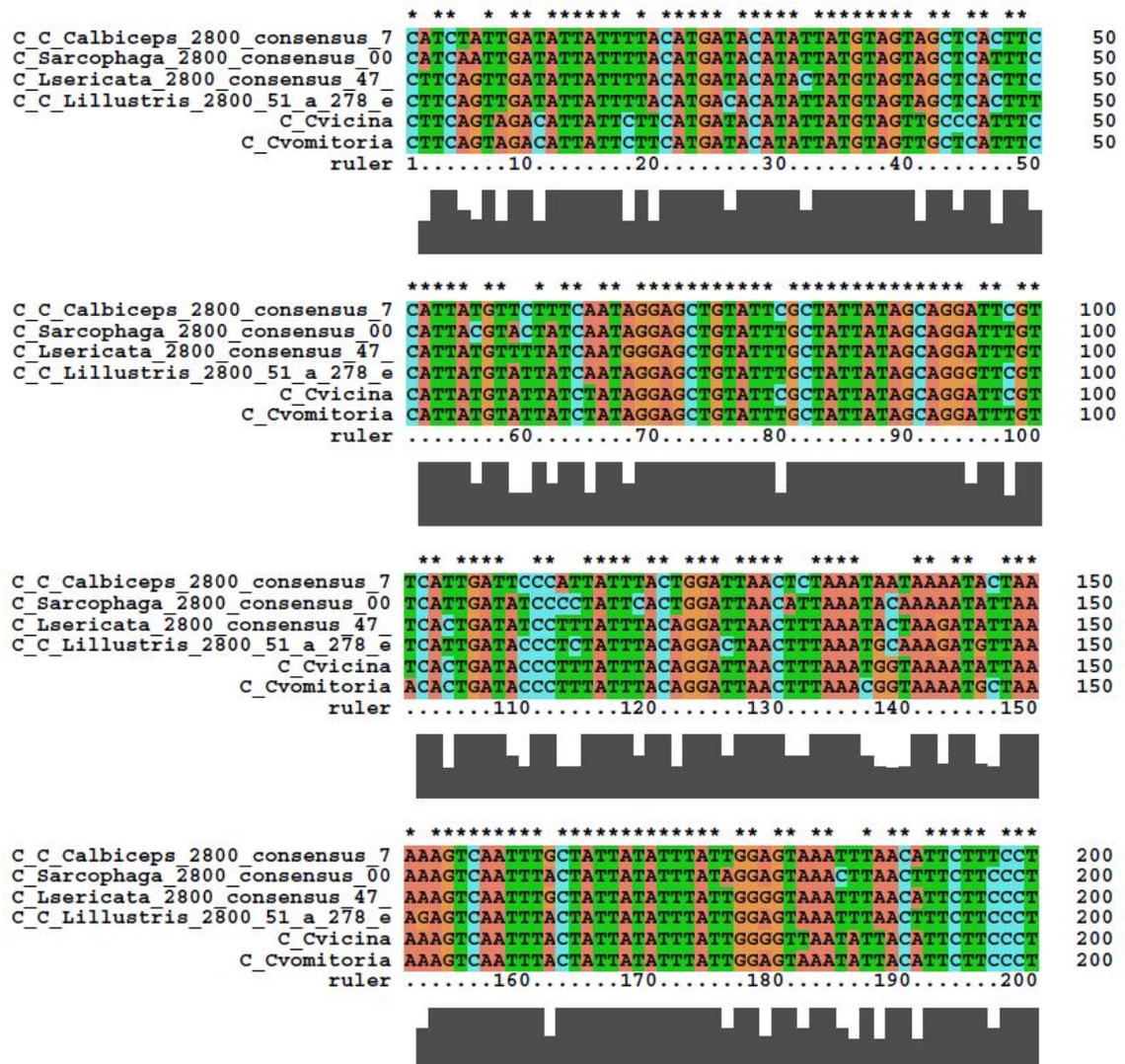


Figura 11 – Sequências consenso alinhadas de cada uma das seis espécies estudadas. Os Gráficos situados na base (castanho) facilitam a detecção das variações nucleotídicas entre espécies.

Posteriormente, para os diferentes pares de espécies, foram criadas tabelas não só com as variações encontradas (Tabela VI), nas bases nucleotídicas das sequências, mas também com a sua localização (Tabelas VII e VIII).

Tabela VI – Número de variações, nas bases nucleotídicas das sequências, entre os diferentes pares de espécies.

	TRANSIÇÕES (n)	TRANSVERSÕES (n)	TOTAL (n)
<i>L. sericata</i> / <i>L. illustris</i>	16	2	18
<i>C. vicina</i> / <i>C. vomitoria</i> .	7	2	9
<i>L. illustris</i> / <i>C. vomitoria</i>	14	10	24
<i>L. illustris</i> / <i>C. vicina</i>	15	10	25
<i>L. sericata</i> / <i>C. vomitoria</i>	13	9	22
<i>L. sericata</i> / <i>C. vicina</i>	12	9	21
<i>Sarcophaga sp.</i> / <i>C. vomitoria</i>	15	14	29
<i>Sarcophaga sp.</i> / <i>C. vicina</i>	16	14	30
<i>Sarcophaga sp.</i> / <i>L. illustris</i>	17	4	21
<i>Sarcophaga sp.</i> / <i>L. sericata</i>	14	7	21
<i>C. albiceps</i> / <i>C. vomitoria</i>	15	14	29
<i>C. albiceps</i> / <i>C. vicina</i>	15	14	29
<i>C. albiceps</i> / <i>L. illustris</i>	15	10	25
<i>C. albiceps</i> / <i>L. sericata</i>	13	7	20
<i>C. albiceps</i> / <i>Sarcophaga sp.</i>	13	11	24

O supra-mencionado software permitiu também a construção de dendogramas, não só das sequências obtidas para as seis espécies identificadas (Figura 12), mas também destas em relação às sequências (COI) depositadas no GenBank (Figura 13). Nestes dendogramas, o valor de *bootstrap* foi de 10000 iterações e a espécie *Caenorhabditis elegans* foi a eleita como *outgroup*.

Tabela VII – Transições existentes entre as bases nucleotídicas das sequências e sua localização (número da posição), entre os diferentes pares de espécies.

	6	11	18	26	32	44	47	50	56	60	68	80	95	98	104	109	110	113	
L. sericata/L. illustris				1	1			1			1		1	1	1			1	
C. vicina/C. vomitoria						1						1		1					
L. illustris/C. vomitoria		1	1	1			1	1					1	1	1				
L. illustris/C. vicina		1	1	1		1	1	1				1	1		1				
L. sericata/C. vomitoria		1	1		1		1				1							1	
L. sericata/C. vicina		1	1		1	1	1				1	1		1				1	
Sarcophaga/C. vomitoria	1	1	1						1	1						1		1	1
Sarcophaga/C. vicina	1	1	1			1			1	1		1		1	1	1		1	1
Sarcophaga/L.illustris	1			1			1	1	1	1			1	1				1	1
Sarcophaga/L.sericata	1				1		1	1	1	1						1			1
C. albiceps/C. vomitoria	1	1	1				1			1		1		1	1				
C. albiceps/C. vicina	1	1	1			1	1			1			1		1				
C. albiceps/L.illustris	1			1				1	1	1									
C. albiceps/L.sericata	1				1					1	1	1		1	1			1	
C. albiceps/Sarcophaga							1	1			1	1				1	1		
Total	8	8	8	5	5	5	9	5	5	8	5	8	5	9	9	1	8	4	

Tabela VII (cont.) – Transições existentes entre as bases nucleotídicas das sequências e sua localização, entre os diferentes pares de espécies.

	114	119	126	132	137	138	139	140	143	146	147	152	162	179	185	197
L. sericata/L. illustris	1		1			1		1		1		1	1	1		
C. vicina/C. vomitoria					1					1	1				1	
L. illustris/C. vomitoria	1		1		1				1		1	1				
L. illustris/C. vicina	1		1						1	1		1			1	
L. sericata/C. vomitoria					1	1			1	1	1			1	1	
L. sericata/C. vicina						1			1					1		
Sarcophaga/C. vomitoria	1	1			1	1				1	1					1
Sarcophaga/C. vicina	1	1				1									1	1
Sarcophaga/L.illustris		1	1			1			1	1		1				1
Sarcophaga/L.sericata	1	1							1					1	1	1
C. albiceps/C. vomitoria					1	1	1			1				1		1
C. albiceps/C. vicina					1		1					1		1	1	1
C. albiceps/L.illustris	1		1	1		1			1	1	1	1	1	1		1
C. albiceps/L.sericata					1				1		1				1	1
C. albiceps/Sarcophaga	1	1		1								1		1		1
Total	8	5	5	5	5	9	2	1	8	8	8	8	5	8	8	5

Tabela VIII – Transversões existentes entre as bases nucleotídicas das sequências e sua localização (número da posição), entre os diferentes pares de espécies.

	2	5	8	20	41	59	62	65	101	109
L. sericata/L. illustris						1				
C. vicina/C. vomitoria									1	
L. illustris/C. vomitoria			1	1	1			1	1	
L. illustris/C. vicina			1	1	1			1		
L. sericata/C. vomitoria			1	1	1	1		1	1	
L. sericata/C. vicina			1	1	1	1		1		
Sarcophaga/C. vomitoria	1		1	1	1			1	1	
Sarcophaga/C. vicina	1		1	1	1			1		
Sarcophaga/L.illustris	1									
Sarcophaga/L.sericata	1					1				
C. albiceps/C. vomitoria	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
C. albiceps/C. vicina	1	1	1	1	1	1	1	1		1
C. albiceps/L.illustris	1	1				1	1			1
C. albiceps/L.sericata	1	1					1			1
C. albiceps/Sarcophaga		1				1	1			
Total	8	5	8	8	8	8	5	8	5	4

Tabela VIII (cont.) – Transversões existentes entre as bases nucleotídicas das sequências e sua localização (número da posição), entre os diferentes pares de espécies.

	113	122	131	139	140	176	182	186	188	191
L. sericata/L. illustris										1
C. vicina/C. vomitoria								1		
L. illustris/C. vomitoria				1	1			1	1	1
L. illustris/C. vicina				1	1		1	1	1	1
L. sericata/C. vomitoria				1				1	1	
L. sericata/C. vicina				1			1	1	1	
Sarcophaga/C. vomitoria	1	1	1	1	1	1				1
Sarcophaga/C. vicina	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Sarcophaga/L.illustris	1	1				1				
Sarcophaga/L.sericata	1	1			1	1				1
C. albiceps/C. vomitoria	1	1						1	1	
C. albiceps/C. vicina	1	1					1	1	1	
C. albiceps/L.illustris	1	1		1	1					1
C. albiceps/L.sericata	1	1		1						
C. albiceps/Sarcophaga	1		1	1	1	1		1	1	1
Total	5	8	5	9	7	5	5	8	8	8

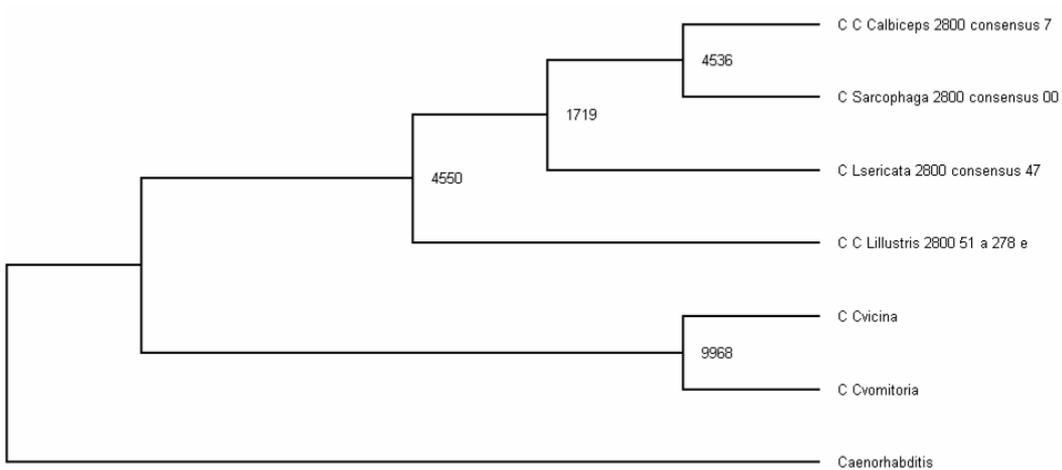


Figura 12 – Dendograma das sequências obtidas para as seis espécies estudadas.

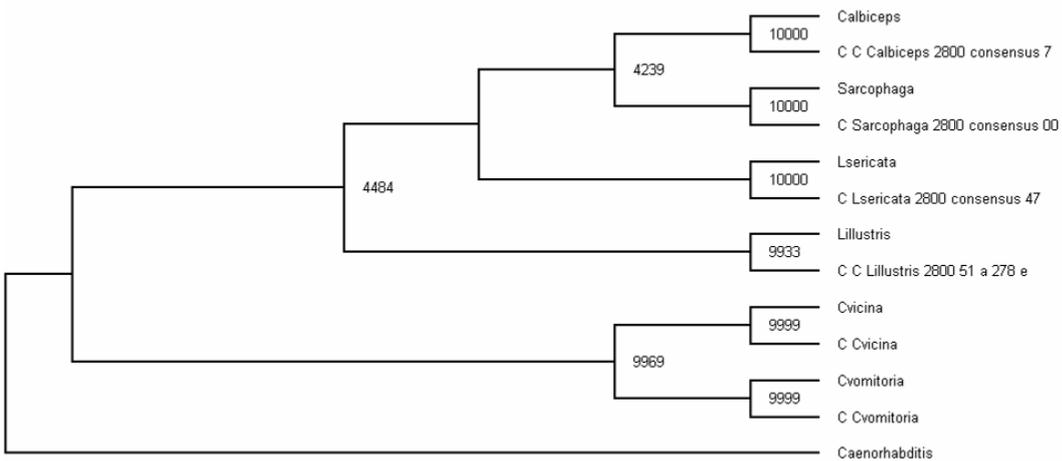


Figura 13 – Dendograma das sequências obtidas para as seis espécies estudadas em relação com as sequências das mesmas espécies, depositadas no GenBank.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Nos Gráficos 6 e 7 é possível observar quer a distribuição dos géneros pelos diferentes meses e locais de aparecimento dos cadáveres, quer o resultado obtido para o valor de X^2 para estas duas variáveis.

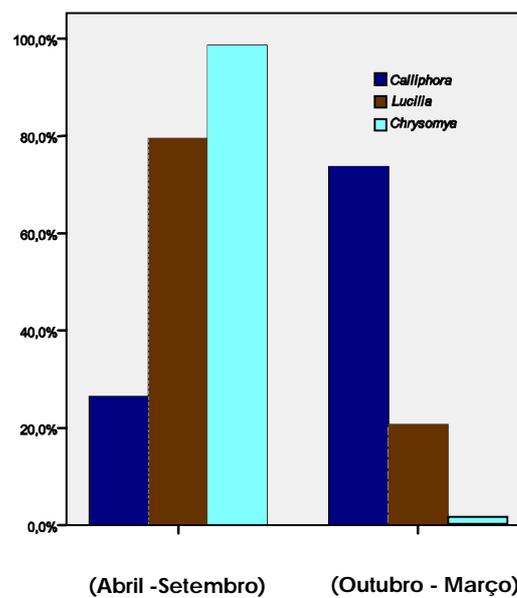


Gráfico 6 – Distribuição do género pelos diferentes meses (teste de Qui-quadrado de Pearson, $X^2=126,6$; graus de liberdade=2; $p<0,001$).

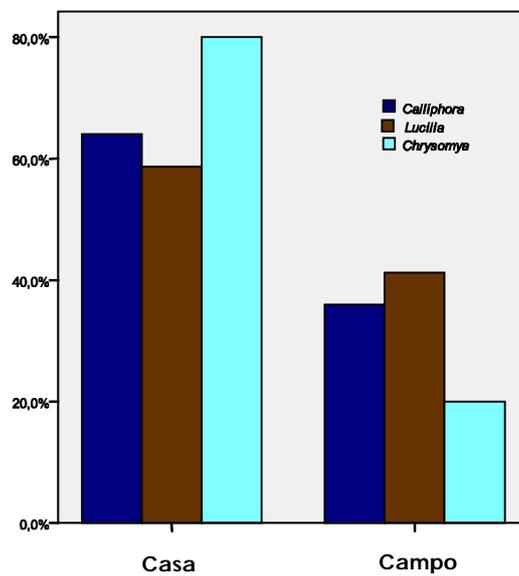


Gráfico 7 - Distribuição do género pelos diferentes locais de aparecimento dos cadáveres ($X^2=7,922$; graus de liberdade=2; $p<0.019$).

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

5.1 EXTRACÇÃO DO DNA

5.1.1 Identificação da espécie

Os diferentes métodos de extracção de DNA utilizados (orgânica, *DNeasy® Tissue Kit* e *BioRobot® EZ1*), não aparentaram revelar diferenças significativas entre si no que respeita à identificação das espécies (como se pode constatar nos exemplos das Figuras 3, 4 e 5), ou seja, nos 314 espécimes estudados, para qualquer um dos métodos utilizados, foi possível a obtenção não só de sequências de DNAm (Tabela II), mas também a obtenção do valor de MSP de 100% (Tabela V).

No entanto, o método escolhido para a maioria das amostras (n=240), foi o que utiliza o aparelho *BioRobot® EZ1*. Esta escolha foi devida não só à boa qualidade do DNA obtido, mas também ao baixo risco de contaminação que o aparelho apresenta, uma vez que os cartuchos que contêm os reagentes são isolados e selados, logo reduzem ao máximo esse risco.

5.1.2 Análise do conteúdo gástrico larvar (DNA humano)

A comprovação da existência de DNA humano, nas amostras obtidas a partir do conteúdo gástrico larvar, foi efectuada, após amplificação com o par de *primers* L14816/H17173, através da visualização de um fragmento de 358 pb do gene do citocromo b.

A posterior sequenciação do referido fragmento proporcionou resultados em todas as amostras analisadas.

Utilizando o método de extracção orgânico e com o aparelho *BioRobot® EZ1* foram obtidos valores, após submissão das sequências no BLAST, de 100% de MSP (Tabela III) para a espécie *Homo sapiens* (Figura 6).

O elevado sucesso obtido nestas amostras confirma a eficiência destas duas metodologias de extracção do DNA, na análise de sequências de DNAm.

No que diz respeito ao procedimento que emprega a resina quelante Chelex (Tabela III), foi verificado um decréscimo da qualidade das sequências obtidas, conseqüentemente, foi observada uma diminuição dos valores de MSP (97%). Tal poderá ser devido ao facto de o DNA obtido a partir desta metodologia não apresentar, geralmente, um tão elevado grau de pureza quanto o obtido com o procedimento anterior.

Foram efectuadas as amplificações de STR autossómicos, utilizando o *kit* Identifiler®, em trinta amostras, com a finalidade de obter DNA humano, relativamente às quais se obtiveram valores de 100% de MSP (gene do citocromo b) para a espécie humana.

Relativamente aos diferentes métodos de extracção empregues nas amostras colhidas aos cinco cadáveres, para estudo do conteúdo gástrico larvar, nenhum dos três se revelou totalmente eficaz (Tabela IV). No entanto o que apresentou melhores resultados foi a extracção orgânica.

A ineficácia dos métodos foi demonstrada pela ausência de perfis completos (16 loci) e inexistência de perfis em muitas das amostras.

As metodologias referentes à utilização de Chelex e ao *BioRobot® EZ1* produziram resultados não satisfatórios (Tabela IV). Tais resultados podem ser justificados devido à grande quantidade de inibidores à reacção de PCR existentes nas amostras estudadas, uma vez que todas as larvas foram colhidas de cadáveres em avançado estado de putrefacção (Figura 14) ou podem ter resultado da exígua quantidade de DNA obtido após a extracção com os métodos anteriormente mencionados.



Figura 14 – Fotografia de um dos cadáveres do estudo, exemplificativa do avançado estado de putrefacção.

A partir da amostra que proporcionou melhores resultados, após a comparação com uma amostra de referência (Figura 7) do cadáver, foi possível a obtenção de um perfil parcial completo (Tabela IV) para 6 (D8S1179, D21S11, CSF1PO, D3S1358, D13S317, D16S539) dos 16 *loci*.

Este perfil foi obtido após análise no GeneScan com o valor de 50 *Relative Fluorescent Units* (RFU) para o parâmetro de limite de detecção (*peak amplitude threshold*) (Figura 8). No entanto, se este valor for alterado para 30 RFU, é possível observar um acréscimo no número de *loci* completos, de 6 para 14 (D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D21338, D19S433, vWA, TPOX, D5S818 e amelogenina) (Figura 9).

Relativamente ao *locus* D18S51, este não foi considerado, porque foram obtidos três picos, sendo que dois deles são coincidentes com o genótipo do cadáver.

Apesar do aumento do número de *loci* completos que se conseguiu ao reduzir o valor do parâmetro de limite de detecção de 50 para 30, este procedimento não foi considerado por se entender que 50 RFU é o valor mínimo aceitável para a validação de um perfil em amostras degradadas.

O sucesso obtido nesta amostra poderá ser devido não só à utilização do método de extracção orgânico, que geralmente produz uma maior quantidade final de DNA e com elevado grau de pureza, mas também, ao facto de o cadáver se apresentar num estado de decomposição menos avançado do que os restantes (Figura 15).



Figura 15 – Fotografia do cadáver, cuja análise do conteúdo gástrico larvar proporcionou melhores resultados.

As amostras colhidas em cadáveres num estado mais avançado de putrefacção apresentam várias características desfavoráveis, que poderão ser responsáveis pelo insucesso da genotipagem, tais como a inibição da reacção de PCR, a degradação do DNA e as alterações bioquímicas do DNA.

Relativamente a estas alterações bioquímicas, produzidas geralmente durante a digestão larvar, por enzimas proteolíticas que quebram as ligações peptídicas entre os aminoácidos, convém referir que estas não são segregadas directamente para o saco gástrico. Porém, as enzimas presentes na saliva, que têm um papel fundamental na digestão pré-oral, são posteriormente incorporadas no saco gástrico, o que poderá explicar alguma da degradação do DNA durante a digestão larvar.

Em trinta das amostras estudadas foram, posteriormente, realizados diversos procedimentos recomendados em Jarreta, 1999 e em Butler, 2005 para amostras "difíceis" com a finalidade de reduzir o insucesso da genotipagem e promover a optimização dos resultados. Assim, a diluição das amostras, o aumento do número de ciclos de 28 para 32, a amplificação com o AmpF Φ STR[®] MiniFiler[™] PCR Amplification Kit, o aumento da quantidade de DNA polimerase e a adição de albumina sérica bovina à reacção de PCR foram executados na totalidade das trinta amostras e em duplicado. No entanto, estes procedimentos não produziram qualquer aumento na quantidade e qualidade de resultados, não sendo por este motivo apresentados.

5.2 IDENTIFICAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DA ESPÉCIE

Nos 42 cadáveres estudados, foram identificadas um total de oito espécies (Tabela V). Todas, excepto *Sarcophaga* sp., pertencentes à família Calliphoridae: *Chrysomya albiceps* (Wiedemann), *Calliphora vicina* (Robineau-Desvoidy), *Calliphora vomitoria* (L.), *Lucilia sericata* (Meigen), *Lucilia illustris* (Meigen), *Lucilia caesar* (L.) and *Lucilia ampullacea* (Villeneuve).

Estas espécies foram encontradas em estudos de entomofauna cadavérica humana, em Itália (Vanin, 2008) e em modelos animais (Prado e Castro, 2005), em Portugal.

No presente estudo as espécies *Chrysomya albiceps*, *Calliphora vicina* e *Calliphora vomitoria* foram as mais constantes (Gráfico 1).

O par de primers C1-J-2495/C1-N-2800 foi utilizado na totalidade das larvas. No entanto nas espécies *Chrysomya albiceps*, *Calliphora vicina*, *Calliphora vomitoria*, *Lucilia sericata* e *Lucilia caesar* os resultados foram confirmados com os primers C1-J-2495/TL2-N-3014.

Na diferenciação das espécies *Calliphora vicina* e *Calliphora vomitoria*, utilizando os pares de primers supra-mencionados, por vezes, não foi possível a obtenção de um valor de MSP de 100%. Nestes casos foram utilizados em alternativa os primers C1-N-2191/C1-J-1718 (Figura 10).

Com o par de *primers* C1-J-1687/TY-J-1460 foi possível obter um valor de MSP de 100% para as espécies *Chrysomya albiceps*, *Calliphora vicina*, *Lucilia caesar*, *Lucilia sericata* e *Lucilia ampullacea*.

Tal como descrito noutros estudos (Schroeder, 2003_b; Arnaldos, 2004), a maior diversidade de espécies foi encontrada em cadáveres cujo aparecimento ocorreu durante os meses que apresentam temperaturas elevadas (Gráfico 2). Durante o período de Abril a Setembro, as oito espécies identificadas neste estudo puderam ser observadas na sua totalidade (Gráfico 3), sendo a espécie *Chrysomya albiceps* a mais constante.

A espécie *Lucilia sericata* foi a segunda mais frequente nos meses que apresentam temperaturas mais elevadas, o que está em conformidade com o descrito por Schroeder, 2003_b. No entanto, foi possível observar esta mesma espécie no mês de Janeiro (Gráfico 4). Tal pode ser devido à fenologia exibida por esta espécie, uma vez que existem registos da sua existência na época de Verão, em Itália (Raffone, 2005) e, paralelamente, a sua colheita em cadáveres humanos no Inverno, em Espanha (Arnaldos, 2005).

Deste modo, a colheita de evidências entomológicas pertencentes a esta espécie não deverá ser utilizada durante os meses que apresentam temperaturas mais elevadas, uma vez que esta espécie também se encontra activa durante os meses considerados mais frios.

A semelhança das espécies encontradas em zonas com proximidade geográfica, como Portugal e Espanha, durante os mesmos meses, sugere que poderão ser tidos em conta os dados entomológicos para comparação de ambos os países, tendo em consideração as espécies anteriormente referidas.

Em cadáveres encontrados durante os meses que exibem baixas temperaturas, apenas cinco, das oito espécies identificadas, foram observadas, sendo a espécie *Calliphora vicina* a mais frequente (Gráfico 4).

As espécies *Lucilia ampullacea*, *Sarcophaga* sp. e *Chrysomya albiceps* não foram possíveis de observar durante este período. No entanto, de modo diferente do que aconteceu neste estudo, a espécie *Chrysomya albiceps* foi observada com frequência, durante os meses que apresentam temperaturas mais reduzidas em Espanha (Arnaldos, 2005).

Neste estudo, em relação aos diferentes locais de aparecimento dos cadáveres, foi observada uma maior diversidade de espécies em cadáveres encontrados no campo (ao ar livre) (Gráfico 5). Neste habitat, predominantemente rural, a espécie *Calliphora vomitoria* foi a mais observada e as espécies *Lucilia illustris*, *Lucilia caesar* e *Lucilia ampullacea* foram exclusivas deste meio ambiente.

A espécie *Calliphora vicina* foi a predominante em cadáveres encontrados dentro de casa.

Estes dados são consistentes com os obtidos no estudo de Anderson, 1995.

Espécies sinantrópicas como *Calliphora vicina* e *Lucilia sericata* foram maioritariamente identificadas no estudo de Vanin, 2008, em cadáveres que se encontravam dentro de casa.

A colheita de outras espécies sinantrópicas como *Lucilia caesar* e *Lucilia illustris* em cadáveres encontrados ao ar livre, foi também verificada no estudo do referido autor. Este autor explica que tal pode ser devido à grande densidade populacional das zonas rurais onde os cadáveres foram encontrados. Explicação análoga pode ser considerada para Portugal e para este estudo.

Estas observações conferem grandes implicações de interpretação dos dados entomológicos colhidos em regiões rurais com características urbanas, uma vez que estes dados não poderão ser utilizados para confirmar ou infirmar o transporte e/ou a mudança de um local para outro de um determinado cadáver, dentro de uma mesma área geográfica.

5.3 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS

A comparação das sequências consenso das seis espécies estudadas pode ser visualizada na Figura 11 e o número de variações nucleotídicas existentes em cada par de espécies, na Tabela VI.

Da análise da Figura 11 e da Tabela VI é possível observar que o par composto pelas espécies *Calliphora vicina* e *Calliphora vomitoria* apresenta nove variações, sendo que sete delas correspondem a transições e duas delas a transversões.

As transições podem ser visualizadas nas posições 44, 80, 98, 137, 146, 147, 179 e as transversões nas posições 101 e 182 (Tabelas VII e VIII).

O par *Lucilia sericata* e *Lucilia illustris* exhibe dezoito variações formadas por dezasseis transições localizadas nas posições 26, 32, 50, 68, 95, 98, 104, 110, 114, 126, 138, 140, 146, 152, 162, 179 e duas transversões nas posições 59 e 191 (Tabelas VII e VIII).

Em relação ao par *Chrysomya albiceps* e *Sarcophaga* sp. é possível observar vinte e quatro variações compostas por treze transições observadas nas posições 47, 56, 80, 98, 109, 110, 114, 119, 132, 147, 162, 185, 197 e onze transversões, nas posições 5, 59, 62, 113, 131, 139, 140, 176, 186, 188 e 191. O maior número de variações existente neste par em relação aos pares anteriores poderá ser explicado pelas diferenças morfológicas e genéticas existentes entre estas duas espécies.

Após a visualização das Tabelas VII e VIII é possível verificar que o número de transições é superior ao de transversões e que nas posições 109, 113, 139 e 140 podem ser observados ambos os tipos de variações.

O valor de *bootstrap* permite confirmar o significado dos resultados da análise filogenética.

Assim, após visualização do dendograma (Figura 12) é possível observar que a força dos grupos é reduzida, excepto no nó referente às espécies *Calliphora vicina* e *Calliphora vomitoria*, no qual foi obtido um valor de 9968.

As espécies irmãs *Lucilia sericata* e *Lucilia illustris*, apesar de morfologicamente semelhantes, encontram-se distantes entre si.

Uma vez que cada uma das espécies contém variações próprias, é possível considerar que as sequências consenso obtidas neste estudo são específicas da espécie em questão. Esta especificidade possui um elevado valor em Genética Forense, uma vez que as sequências podem ser utilizadas como sequências de referência para a identificação de qualquer espécime cuja identificação não tenha sido possível de realizar, mediante os métodos clássicos,

No dendograma onde é possível visualizar a comparação das sequências obtidas neste estudo, com as sequências das mesmas espécies incluídas no GenBank (Figura 13), podemos constatar que os valores de *bootstrap* obtidos entre os pares homólogos foram muito elevados. Sendo que, nas espécies *Chrysomya albiceps*, *Lucilia sericata* e *Sarcophaga* sp. atingiu o valor máximo de 10000. Para as espécies *Calliphora vicina* e *Calliphora vomitoria*, este valor foi de 9999 e para a espécie *Lucilia illustris* de 9933. Estes valores são fortes indicadores de que as sequências do gene da COI se encontram altamente conservadas e, como tal, são adequadas para a identificação de espécies entomológicas.

As sequências dos exemplares contidos na base de dados do GenBank, possuem diferentes procedências geográficas.

Deste modo, o elevado valor de coincidência entre as sequências consenso das espécies submetidas no GenBank e as espécies que fizeram parte deste estudo, realça as escassas diferenças que existem entre populações com origens geográficas distintas.

5.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Verificou-se a existência de diferenças significativas do género de acordo com o mês ($X^2=126,6$; graus de liberdade (g.l.)=2; $p<0.001$). Os géneros *Lucilia* (79,4%) e *Chrysomya* (98,6%) ocorrem, maioritariamente, nos meses que apresentam temperaturas mais elevadas e o género *Calliphora* (73,6%) pode ser encontrado mais facilmente nos meses considerados mais frios. Nos meses que exibem temperaturas mais altas este género apenas ocorre 26,4% (Gráfico 6). Nos meses que apresentam temperaturas reduzidas, os géneros *Lucilia* (20,6%) e *Chrysomya* (1,4%) são menos frequentes.

Em relação à variável meio de aparecimento do cadáver, foi observada a existência de diferenças significativas dos géneros, de acordo com o local ($X^2=7,922$; g. l.=2; $p<0.019$). Assim, nos cadáveres encontrados dentro de casa o género *Chrysomya* foi o encontrado com maior frequência (80%), seguido dos géneros *Calliphora* (64%) e *Lucilia* (58,7%) (Gráfico 7).

5.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo não inclui todas as espécies que poderão ser encontradas durante a realização da autópsia médico-legal, mas poderá ser representativo da ocorrência das principais espécies de interesse forense em Portugal.

Deverão ser efectuadas colheitas adicionais, de modo a aumentar o conhecimento sobre as espécies existentes nesta área geográfica, de modo a que possam ser utilizadas para a estimativa do IPM.

Os métodos filogenéticos e de genotipagem encontram-se profusamente descritos e são com frequência utilizados por geneticistas moleculares e peritos forenses em DNAm, na resolução de perícias (Wells, 2007_b). No entanto, a colaboração de entomólogos forenses nas perícias que envolvam evidências entomológicas deverá ser constante e privilegiada.

Este trabalho poderá servir como estrutura inicial de uma base de sequências de DNAm das principais espécies com interesse forense em Portugal.

Estes dados entomológicos poderão ser utilizados em perícias forenses, de modo a otimizar a sua celeridade, uma vez que os métodos clássicos pressupõem um período mais prolongado de tempo, de estudo e, conseqüentemente, um conhecimento dos resultados mais demorado.

6. CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

1ª Os diferentes métodos de extracção de DNA utilizados com a finalidade de identificar a espécie não revelaram diferenças significativas entre si. Todavia, o método de extracção orgânica foi o que demonstrou maior sensibilidade nas amostras utilizadas para análise do conteúdo gástrico larvar (DNA humano).

2ª A diversidade e especificidade de espécies colhidas nos cadáveres encontrados durante os meses que apresentam temperaturas mais elevadas são significativas relativamente aos cadáveres encontrados durante os meses mais frios.

3ª Os cadáveres encontrados em espaço aberto apresentaram espécies específicas e mais diversificadas, em relação aos cadáveres encontrados dentro de casa.

4ª Este estudo estabeleceu uma base de dados entomológicos de sequências de DNAMt das principais espécies de Dípteros, que colonizam cadáveres humanos em Portugal.

5ª Este trabalho permite acrescentar dados entomológicos relevantes ao conhecimento da entomofauna em Portugal e poderá ser utilizado em perícias forenses.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ames C, Turner B, Daniel B. The use of mitochondrial cytochrome oxidase I gene (COI) to differentiate two UK blowfly species – *Calliphora vicina* e *Calliphora vomitoria*. *Forensic Sci Int*; 2006; 164:179-182.

Anderson G. The use of insects in death investigations: an analysis of cases in British Columbia over a five year period. *Canadian Society of Forensic Science Journal*; 1995; 28:277-292.

Anderson G. Insect succession on carrion and its relationship to determining time of death. In: Byrd JH, Castner JL. editors, *Forensic Entomology. The Utility of Arthropods in Legal Investigations*, Boca Raton: CRC Press; 2001. p. 143-175.

Anderson G. e Hobischak, N. Decomposition of carrion in the marine environment in British Columbia, Canada. *Int J Leg Med*; 2004; 118(4):206-209.

Anker R, Steinbrueck T, Donis-Keller H. Tetranucleotide repeat polymorphism at the human thyroid peroxidase (hTPO) locus. *Hum Mol Genet*; 1992; 1:137.

Anslinger K, Bayer B, Rolf B, Keil W, Eisenmenger W. Application of the BioRobot EZ1 in a forensic laboratory. *Legal Medicine*; 2005; 7:164-168.

Applied Biosystems, AmpF ℓ STR $^{\circledR}$ Identifier PCR Amplification Kit User's Manual, 2001.

Applied Biosystems, BigDye $^{\circledR}$ Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit Protocol, 2002.

Arnaldos M, Romera E, Presa J, Luna A, García M. Studies on seasonal arthropod succession on carrion in the southeastern Iberian Peninsula. *Int J Legal Med*; 2004; 118:197-205.

Arnaldos M, García M, Romera E, Presa J, Luna A. Estimation of postmortem interval in real cases based on experimentally obtained entomological evidence. *Forensic Sci Int*; 2005; 149:57-65.

Avila F. e Goff M. Arthropod Succession Patterns onto Burnt Carrion in Two Contrasting Habitats in the Hawaiian Islands. *J Forensic Sci*; 1998; 43(3):581-586.

Benecke M. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) typing of necrophageous insects (diptera, coleoptera) in criminal forensic studies: validation and use in practice. *Forensic Sci Int*; 1998; 98:157-168.

Benecke M. A brief history of forensic entomology. *Forensic Sci Int*; 2001; 120:2-14.

Bergeret M. Infanticide. Momification naturelle du cadavre. Découverte du cadavre d'un enfant nouveau-né dans une cheminée où il s'était momifié. Détermination de l'époque de la naissance par la présence de nymphes et de larves d'insectes dans le cadavre, et par l'étude de leurs métamorphoses. *Ann Hyg Méd Lég*; 1855;4:442-452.

Branicki W, Kupiec T, Pawlowski R. Validation of Cytochrome b Sequence Analysis as a Method of Species Identification. *J Forensic Sci*; 2003; 48(1):83-87.

Brinkmann B. The STR approach. *Adv Forensic Haemogenetics*; 1996; 6: 41-51.

Butler, JM., Forensic DNA Typing, Biology, Technology, and genetics of STR Markers, 2nd ed. USA: Elsevier Academic Press, 2005.

Byrd J. e Castner L. Insects of Forensic Importance. In: Byrd JH, Castner JL. editors, Forensic Entomology. The Utility of Arthropods in Legal Investigations, Boca Raton: CRC Press; 2001. p. 43-79.

Cainé L, Corte Real F, Saloña-Bordas M, Pancorbo M, Lima G, et al. DNA typing of Diptera collected from human corpses in Portugal, *Forensic Sci Int*; 2009; 184 (1-3):e21-e23.

Calabuig Gisbert J. e Cañadas V. Procesos destructores del cadáver. In: Calabuig Gisbert JA. Medicina Legal y Toxicología. 5^a ed. Barcelona: Masson; 2003. p. 172-185.

Campobasso C, Linville J, Wells J, Introna F. Forensic Genetic Analysis of Insect Gut Contents. *American Journal Forensic Medicine Pathology*; 2005; 26:161-165.

Cañadas V, Carro L, Peñaranda J. Problemas tanatológicos médico-legal. In: Calabuig Gisbert JA. Medicina Legal y Toxicología. 5^a ed. Barcelona: Masson; 2003. p. 194-218.

Catts E, Analyzing Entomological Data. In: Catts E. and Haskell N. Editors, Entomology and Death: A Procedural Guide, South Carolina: Joyce's Print Shop; 1990. p. 124-137.

Catts E. e Haskell N. Editors, Entomology and Death: A Procedural Guide, South Carolina: Joyce's Print Shop; 1990. 182 pp.

Catts E. e Goff M. Forensic Entomology in Criminal Investigations. *Annual Review of Entomology*; 1992; 37:253-272.

Chinery M. Collins Pocket Guide, Insects of Britain & Western Europe. London: Harper Collins Publishers, 1986.

Cooperative Human Linkage Center: D16S539 accession number 715. GenBank accession number G07925.

DNA Commission of the ISFH. DNA recommendations. Further report of the DNA Commission of the ISFH regarding the use of short tandem repeat systems. *Int J Legal Med*; 1997; 110:175-176.

Edwards A., Hammond H., Jin L., Caskey C., Chakraborty R. Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. *Genomics*; 1992; 12:241-253.

Elder J. e Southern E. Nucleic Acid and Protein Sequence Analysis – A practical approach. IRL Press, 1987.

Galtier N., Gouy M., Gautier, C. SeaView and Phylo_win, two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Compu. Applic Biosci*; 1996; 12:543-548.

González-Mora D. e Peris S. Los Calliphoridae de España: 1: Rhiniinae y Chrysomyinae. *Revista Española de Entomología*; 1988; 64: 91-139.

Grassberger M, Friedrich E, Reiter C. The blowfly *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera: *Calliphoridae*) as a new forensic indicator in Central Europe. *Int J Legal Med*; 2003; 117:75-81.

Green E, Mohr R, Idol J, Jones M, Buckingham J, et al. Systematic generation of sequence-tagged sites for physical mapping of human chromosomes: application to the mapping of human chromosome 7 using yeast artificial chromosomes. *Genomics*; 1991; 11:548-564.

Hall R. Introduction: Perceptions and Status of Forensic Entomology. In: Byrd JH, Castner JL. editors, *Forensic Entomology. The Utility of Arthropods in Legal Investigations*, Boca Raton: CRC Press; 2001. p. 1-15.

Hammond H, Jin L, Zhong Y, Caskey C, Chakraborty R. Evaluation of 13 short tandem repeat loci for use in personal identification applications. *Am J Hum Genet*; 1994; 55:175-189.

Harvey M, Dadour I, Gaudieri S. Mitochondrial DNA cytochrome oxidase I gene: potential for distinction between immature stages of some forensically important fly species (Diptera) in western Australia. *Forensic Sci Int*; 2003; 131:134-139.

Harvey M, Gaudieri S, Villet M, Dadour I. A global study of forensically significant calliphorids: implications for identification. *Forensic Sci Int*; 2008; 177:66-76.

Hobischak N. e Anderson G. Time of submergence using aquatic invertebrate succession and decomposition changes. *J Forensic Sci*; 2001; 47(1):142-151.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST>

Hudson T, Stein L, Junli Ma S, Castle A, Silva J, et al. An STS-based map of the human genome. *Science*; 1995; 270:1945-1954.

Jarreta MB, *La prueba del ADN en medicina forense*. Barcelona: Masson; 1999. Barcelona.

Kimpton C, Walton A, Gill P. A further tetranucleotide repeat polymorphism in the vWF gene. *Hum Mol Genet*; 1992; 1:287.

Knight B. Forensic Pathology. 2nd ed. New York: Oxford University Press; 1996.

Kreike J, Kampfer S. Isolation and characterization of human DNA from mosquitoes (Culicidae). *Int J Legal Med*; 1999; 112:380-382.

Lareu M, Barral S, Salas A, Rodriguez M, Pestoni C. Further exploration of new STRs of interest for forensic genetic analysis. 17th International Congress of the ISFH; 1997; Oslo, Norway. Amsterdam: Elsevier; 1998.

Leclercq M. Entomologie et Médecine Légale. Datation de la mort, Masson, Paris; 1978. 100 pp.

Li H, Schmidt L, Wei M-H, Hustad T, Lerman I, et al. Three tetranucleotide polymorphisms for loci: D3S1352, D3S1358, D3S1359. *Hum Mol Genet*; 1993; 2:1327.

Linville J, Wells J. Surface Sterilization of a Maggot Using Bleach Does Not Interfere with Mitochondrial DNA Analysis of Crop Contents. *J Forensic Sci*; 2002; 47 (5):1055-1059.

Linville J, Hayes J, Wells J. Mitochondrial DNA and STR Analyses of Maggot Crop Contents: Effect of Specimen Preservation Technique. *J Forensic Sci*; 2004; 49 (2):341-344.

Litt M. e Luty J. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am J Hum Gen*; 1989; 44:397-401.

Lord W, DiZinno J, Wilson M, Budowle B, Taplin D, et al. Isolation, Amplification, and Sequencing of Human Mitochondrial DNA Obtained from Human Crab Louse, *Pthirus pubis* (L.), Blood Meals. *J Forensic Sci*; 1998; 43 (5):1097-1100.

Lyra M, Fresia P, Gama S, Cristina J, Klaczko L, et al. Analysis of mitochondrial DNA variability and genetic structure in populations of New World screwworm flies (Diptera: Calliphoridae) from Uruguay. *J Med Entomo*; 2005; 42 (4):589-595.

Magaña C. La entomología y su aplicación a la medicina legal. Data de la muerte. *Boletín de la Soc Entomologica Aragonesa*; 2001; 28:49-57.

Malgorn Y, Coquoz R. DNA typing for identification of some species of Calliphoridae: an interest in forensic entomology. *Forensic Sci Int*; 1999; 102:111-119.

Maniatis T, Fritsch E, Sambrook J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Vol 2 New York: Cold Spring Harbor Laboratory Publication; 1982.

Mazzanti M, Alessandrini F, Tagliabracci A, Wells J, Campobasso C. DNA degradation and genetic analysis of empty puparia: Genetic identification limits in forensic entomology. *Forensic Sci Int*; 2010; 195:99-102.

Mills K, Even D, Murray J. Tetranucleotide repeat polymorphism at the human alpha fibrinogen locus (FGA). *Hum Mol Genet*; 1992; 1(9):779-779.

Montpetit S, Fitch I, O'Donnell P. A Simple Automated Instrument for DNA Extraction in Forensic Casework. *J Forensic Sci*; 2005; 50 (3):55-563.

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, et al. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*; 1986; 51:263-273.

Nelson L, Wallman J, Dowton M. Identification of forensically important *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) species using the second ribosomal internal transcribed spacer (ITS2). *Forensic Sci Int*; 2008; 177:238-247.

Oldroyd J, Urquhart J, Kimpton P, Millican S, Watson K, et al. A highly discriminating octoplex short tandem repeat polymerase chain reaction system suitable for human individual identification. *Electrophoresis*; 1995; 16:334-337.

Pancorbo M, Castro A, Fernández-Fernández I, Cuevas N, Castillo M, et al. Molecular identification of arthropods by cytochrome b gene analysis. *Int Congress Series*; 2004; 1261:398-400.

Parson W, Pegoraro K, Niederstätter H, Föger M, Steinlechner M. Species identification by means of the cytochrome b gene. *Int J Legal Med*; 2000; 114:23-28.

Peris S. e González-Mora D. Los Calliphoridae de España, III Luciliini (Diptera). *Bol R Soc Esp Hist Nat*; 1991; 87:187-207.

Picard C. e Wells J. The population genetic structure of North American *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae), and the utility of genetic assignment methods for reconstruction of postmortem corpse relocation. *Forensic Sci Int*; 2010; 195:63-67.

Prado e Castro, C. Studies on Sarcosaprophagous Diptera (Insecta) in Central Portugal: Application to Forensic Entomology. Tese de Mestrado, Departamento de Zoologia, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra. 2005;97 pp.

Qiagen, DyeEx™ Handbook, 2002.

Qiagen, DNeasy® Tissue Handbook, 2003_a.

Qiagen, MinElute™ Handbook, 2003_b.

Qiagen, EZ1 DNA Handbook, 2004.

Raffone G. Catalogo dei ditteri della Laguna di Venezia. II. Acroceridae, Opomyzidae, Calliphoridae, Sarcophagidae (Insecta, Diptera Brachycera). *Boll Mus Civ St Nat Venezia*. 2005; 56:103–111.

Reichholf-Riehm H, Guías de Naturaleza Blume, Insectos y Arácnidos, Barcelona: Blume; 1990.

Roeterdink E, Dadour I, Watling R. Extraction of gunshot residues from the larvae of the forensically important blowfly *Calliphora dubia* (Macquart) (Diptera: Calliphoridae). *Int J Legal Med*; 2004; 118:63-70.

Saigusa K, Takamiya M, Aoki Y. Species identification of the forensically important flies in Iwate prefecture, Japan based on mitochondrial cytochrome oxidase gene subunit I (COI) sequences. *Legal Medicine*; 2005; 7:175-178.

Schroeder H, Klotzbach H, Elias S, Augustin C, Pueschel K. Use of PCR-RFLP for differentiation of calliphorid larvae (Diptera: Calliphoridae) on human corpses. *Forensic Sci Int*; 2003_a; 132:76-81.

Schroeder H, Klotzbach H, Elias S, Pueschel K. Insects colonization of human corpses in warm and cold season. *Legal Medicine*; 2003_b; 5:372-374.

Sharma V. e Litt M. Tetranucleotide repeat polymorphism at the D21S11 locus. *Hum Mol Genet*; 1992; 1(1):67.

Simmons R. e Weller S. Utility and Evolution of Cytochrome b in Insects. *Mol Phylogenet Evol*; 2001; 20(2):196-210.

Smith K. A Manual of Forensic Entomology. The Trustees of the British Museum (Natural History), London; 1986.

Song Z, Wang X, Liang G. Species identification of some common negrophagous flies in Guangdong province, southern China based on the rRNA internal transcribed spacer 2 (ITS2). *Forensic Sci Int*; 2008; 175:17-22.

Sperling F, Anderson G, Hickey D. A DNA-based approach to the identification of insect species used for post-mortem interval estimation. *J. Forensic Sci*; 1994; 39:418-427.

Stevens J, Wall R. Genetic relationships between blowflies (Calliphoridae) of forensic importance. *Forensic Sci Int*; 2001; 120:116-123.

Sullivan K, Mannucci A, Kimpton C, Gill P. A rapid and quantitative DNA sex test: fluorescence-based PCR analysis of X-Y homologous gene amelogenin. *Biotechniques*; 1993; 15:636-641.

Thompson J, Gibson T, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins D. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*; 1997; 25:4876-4882.

Urquhart A, Oldroyd J, Kimpton P, Gill P. Highly discriminating heptaplex short tandem repeat PCR system for forensic identification. *BioTechniques*; 1995; 18:116-121.

Vanin S, Tasinato P, Ducolin C, Terranova C, Zancaner S. et al., Use of *Lucilia* species for forensic investigations in Southern Europe. *Forensic Sci Int*; 2008; 177:37-41.

VanLaerhoven S. e Anderson G. Insect succession on buried carrion in two biogeoclimatic zones of British Columbia. *J Forensic Sci*; 1999; 44(1):32-43.

Vincent S, Vian J, Carlotti M. Partial Sequencing of the Cytochrome Oxidase b Subunit Gene I: A Tool for the Identification of European Species of Blow Flies for Postmortem Interval Estimation. *J Forensic Sci*; 2000; 45(4):820-823.

Wallman J e Adams M. The Forensic Application of Allozyme Electrophoresis to the Identification of Blowfly Larvae (Diptera: Calliphoridae) in Southern Australia. *J Forensic Sci*; 2001; 46(3):681-684.

Walsh P, Metzger D, Higuchi R. Chelex®100 as a Medium for Simple Extraction of DNA for PCR-Based Typing from Forensic Material. *BioTechniques* 1991; 10(4):506-513.

Wang J, Zhigang L, Yuchuan C, Qiangsheng C, Xiaohong Y. The succession and development of insects on pig carcasses and their significances in estimating PMI in south China. *Forensic Sci Int*; 2008; 179:11-18.

Watson S, Kelsey Z, Webb R, Evans J, Gill P. The development of a third generation STR multiplex system (TGM). Proceedings of the 17th International Congress of the ISFH; 1997 Sep 2-6; Oslo. Norway. Amsterdam: Elsevier; 1998.

Wells J e Sperling F. Molecular Phylogeny of *Chrysomya albiceps* and *C. rufifacies* (Diptera: Calliphoridae). *J Med Entomol*; 1999; 36 (3):222-226.

Wells J e LaMotte L. Estimating the Postmortem Interval. In: Byrd JH, Castner JL. editors, Forensic Entomology. The Utility of Arthropods in Legal Investigations, Boca Raton: CRC Press; 2001. p. 263-285.

Wells J, Introna F, Di Vella G, Campobasso C, Hayes J, Sperling F. Human and Insect Mitochondrial DNA Analysis from Maggots. *J Forensic Sci*; 2001a; 46 (3):685-687.

Wells J. e Sperling F. DNA-based identification of forensically important Chrysomyinae (Diptera: Calliphoridae). *Forensic Sci Int*; 2001_b; 120:110-115.

Wells J, Wall R, Stevens JR. Phylogenetic analysis of forensically important *Lucilia* flies based on cytochrome oxidase 1: a cautionary tale for forensic species determination. *Int J Leg Med*; 2007_a; 121:229–233.

Wells J. e Williams D. Validation of a DNA-based method for identifying Chrysomyinae (Diptera: Calliphoridae) used in a death investigation. *Int J Leg Med*; 2007_b; 121:1–8.

Zehner R, Amendt J, Krettek R. STR Typing of Human DNA from Fly Larvae Fed on Decomposing Bodies. *J Forensic Sci*; 2004_a; 49(2):337-340.

Zehner R, Amendt J, Schütt S, Sauer J, Krettek R, Povolný S. Genetic identification of forensically important flesh flies (Diptera: Sarcophagidae). *Int J Legal Med*; 2004_b; 118:245-247.