

Eixo Temático ET-01-003 - Áreas de Atuação do Biólogo

## A ERA MOLECULAR NA CIÊNCIA FORENSE: UMA ABORDAGEM ENTOMOLÓGICA

Yorran Hardman Araújo Montenegro<sup>1</sup>, Geilza Carla de Lima Silva<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Graduando em Ciências Biológicas, Universidade Estadual da Paraíba (UEPB). E-mail: yorran\_montenegro@icloud.com.

<sup>2</sup>Bióloga, Mestre em Biologia Aplicada à Saúde, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). E-mail: geilza\_55@yahoo.com.br.

### RESUMO

A ciência forense é uma área interdisciplinar, que estabelece relações intrínsecas entre os âmbitos da física, da biologia, da química, da matemática e ciências de oportunidade forense, objetivando prestar suporte às investigações criminais e à justiça civil. Uma das vertentes da ciência forense é a Entomologia Forense, área na qual há aplicação do estudo de insetos, ácaros e outros artrópodes, visto que suas fases de desenvolvimento estão associadas aos estágios de progressão de um corpo em decomposição. Nesse contexto, o presente trabalho tem como objetivo elucidar os avanços da implementação de técnicas moleculares na identificação de espécies com importância forense. A pesquisa dos artigos foi realizada durante o período de 01 a 15 de Fevereiro de 2018, por meio das bases de dados SCIENCE DIRECT, NCBI e SCIENTIFIC ELECTRONIC LIBRARY ONLINE (SCIELO). Foram selecionados os artigos publicados entre os anos de 2005-2018. Pôde-se observar a importância das técnicas moleculares para a rápida e eficiente identificação de espécies de interesse forense se comparado a outros métodos que não envolvem as técnicas mencionadas.

**Palavras-chave:** Entomologia forense; COI-I; Marcadores moleculares; Intervalo post-mortem.

### INTRODUÇÃO

A ciência forense é uma área interdisciplinar, que estabelece relações intrínsecas entre os âmbitos da física, biologia, química, matemática e ciências de oportunidade forense, objetivando prestar suporte às investigações criminais e à justiça civil. Em resumo, esta ciência proporciona os princípios e técnicas que facilitam a investigação do delito, visando a identificação, recuperação, reconstrução e análise da evidência durante uma investigação criminal (SHARMA et al., 2013).

A Entomologia Forense é uma área na qual há aplicação do estudo de insetos, ácaros e outros artrópodes, na elucidação de questões judiciais e evidência criminal. Dentre os insetos mais comuns em investigações forense, encontram-se os da ordem Diptera, que são classificados em duas subordens: Nematocera e Brachycera. Estes organismos estão associadas aos estágios de progressão de um corpo em decomposição. A partir de suas fases de desenvolvimento, é possível determinar a data da morte e, se possível, as circunstâncias atenuantes do fato antes ou após a morte. É a tendência natural das moscas sarcosaprófagas encontrar e colonizar em uma fonte de alimento como um cadáver um meio natural de sobrevivência (SHARMA et al., 2013).

As técnicas moleculares hoje podem ser usadas em diversos contextos, e dentre estes, encontram-se as aplicações forenses. A utilização dessas técnicas moleculares visa à utilização do material genético não apenas para a identificação de um indivíduo através do seu próprio DNA, mas também a identificação de diversos fatores evolucionários, filogenéticos e populacionais. Na entomologia forense, a utilização das técnicas moleculares visa a precisão na determinação de diversos aspectos quanto ao IPM e à classificação filogenética da espécie em questão (TSANG; 2014). Nesse contexto, o presente trabalho tem como objetivo elucidar os

avanços da implementação de técnicas moleculares na identificação de espécies com importância forense.

## **METODOLOGIA**

A revisão bibliográfica é uma forma de pesquisa, que utiliza a literatura como fontes de dados sobre um tema, auxiliando na integração de informações em um conjunto de estudos realizados separadamente, que podem apresentar resultados conflitante e/ou coincidentes para auxílio de investigações futuras (SAMPAIO; MANCINI, 2007).

A pesquisa dos artigos foi realizada durante o período de 01 a 15 de Fevereiro de 2018, buscando compreender os avanços da entomologia forense como ciência criminal. As bases de dados utilizadas na presente revisão sistemática foram: SCIENCE DIRECT, NCBI e SCIENTIFIC ELECTRONIC LIBRARY ONLINE (SCIELO), sendo esta escolha justificada pelo grande número de periódicos encontrados nas mesmas, nas áreas de entomologia, sistemática, técnicas e biologia molecular aplicadas ao âmbito forense. Para a busca dos artigos, foram utilizadas algumas combinações de palavras chave, sendo estas: “*Entomology Forensic*”, “*Decomposing Bodies*”, “*Human Cadaver Insects*”, “*Keys Identification Insects*”. Nesse contexto, optou-se por selecionar trabalhos nos idiomas inglês e português, com delineamento experimental e resultados satisfatórios, publicados entre 2005 até a atualidade.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **ENTOMOLOGIA FORENSE E TÉCNICAS MOLECULARES**

Os marcadores moleculares para a prática forense surgem como alternativa para estudos mais específicos quanto à identificação de espécie-espécie e variabilidade genética. Devido aos problemas envolvendo a criação da entomofauna em laboratório, bem como a complexidade de reconhecimento de espécies por caracteres morfológicos. Nesse âmbito, a identificação molecular surge como ferramenta confiável, visto que são métodos eficazes quanto à identificação de indivíduos em qualquer estágio da vida, incluindo estágios imaturos e em qualquer condição de preservação (ALVES et al., 2014).

**Citocromo C Oxidase Subunidade I (COI-I).** Estudos datados desde 1997 procuram identificar de forma mais precisa uma região específica para este tipo de estudo em eucariotos, denominada DNA BARCODE, localizada no Citocromo C Oxidase Subunidade I (COI-I). A principal característica desta localização é a capacidade de recuperar sequências gênicas de amostras em estados avançados de decomposição ou preservação inadequada (HEBERT; GREGORY, 2005).

Na Europa, por exemplo, a decomposição de cadáveres atrai aproximadamente 30 espécies da família Faniidea, especialmente em ambientes florestais ou em habitats próximo aos trópicos (MADRA et al., 2015). A principal dificuldade encontrada nessa família nas investigações médico-legais é a identificação das fêmeas no que concerne as suas características morfológicas (SZPILA et al., 2015).

Para solucionar a problemática acima exposta, Grzymarck et al. (2017) investigaram três linhas para identificação espécie-espécie da família Faniidea. Estas foram: (i) investigações intra e interespecíficas de diversidades gênicas para identificação de *barcoding gap* com auxílio de *databases*; (ii) identificação de espécies através das mini-regiões do COI-I; (iii) obtenção de sequências que apresentem características monofiléticas em análises filogenéticas. 27 espécies foram identificadas, incluindo 13 inéditas em sequenciamento COI-I. Sua principal constatação foi a de que os bancos de dados não forneciam informação das espécies de interesse forense, em contrapartida, seus dados inéditos auxiliaram na ampliação de informação para a identificação entomológica europeia.

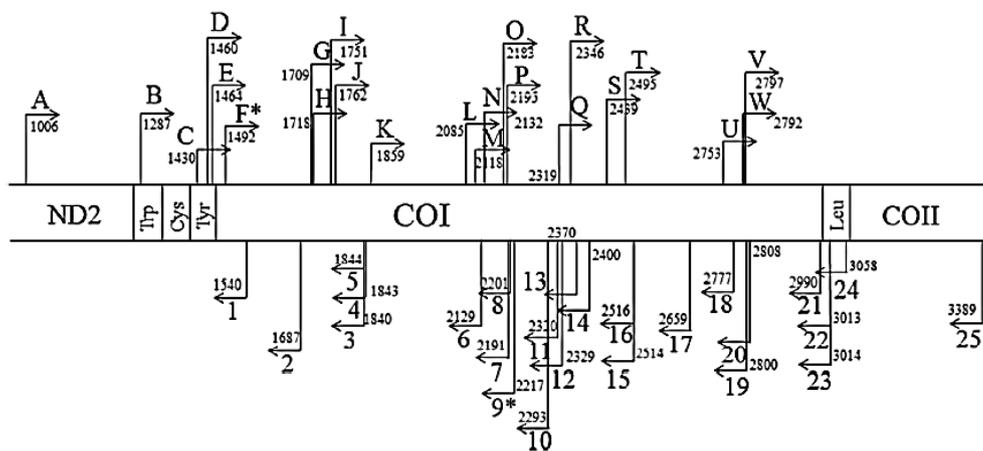
Algumas problemáticas associadas à técnica de COI-I (DNA presente na mitocôndria) têm sido identificadas por alguns autores. Estas, por sua vez, dizem respeito tanto a vulnerabilidade da aplicação das técnicas de investigação com o DNA-mitocondrial (mtDNA),

bem como a possibilidade de variações intraespecíficas da região-alvo. Ou seja, nessas regiões interespecíficas há alta similaridade de sequências COI-I (PENTINSAARI et al., 2014).

Para contornar possíveis problemas, se faz necessário a introdução de outros marcadores no DNA para investigação. Entre os novos candidatos estão: Citocromo C Oxidase Subunidade II (COI-II), genes do Citocromo b (cyt b), *Ribosomal internal transcribed spacer 2* (ITS2) e, *Elongation fator 1 alpha (ef1a)* (TSANG et al., 2014).

Zajac et al. (2016) utilizaram o marcador *ef1a* para complementar a informação obtida pela análise de COI-I. A família de interesse para investigações forenses, utilizada pelos pesquisadores foi a Piophilidae (Diptera), devido à sua presença em cadáveres com 3-4 dias (importância forense), bem como sua presença em áreas de alta altitude. O grande diferencial desta pesquisa foi a coleta de espécies em 10 localizações diferentes da Europa, sendo elas: Espanha (3 localizações), Alemanha (3 localizações), Portugal (2 localizações), Polônia (1 localização) e Suíça (1 localização), identificando, assim, nove espécies de interesse forense, tendo uma ambiguidade mínima de resultados entre as técnicas COI-I e *ef1a* variando entre 1-7% apenas. Segundo os pesquisadores, a diferença interespecífica que dificulta a análise de COI-I foi nula nas análises do marcador nuclear *ef1a*. Sugere-se que a identificação de famílias utilizando o marcador nuclear é mais precisa do que o marcador mitocondrial COI-I. No entanto, este último é melhor na identificação espécie-espécie, sugerindo, por fim, uma análise complementar entre marcador nuclear e mitocondrial para uma identificação mais precisa.

Tuccia et al. (2016) identificaram os principais *primers* utilizados na investigação da região COI-I (Fig. 1) para *Drosophila yakuba*. Em uma carta para o editor da *Revista Forense Science Internacional: Gene*, eles elucidaram também os maiores desafios encontrados na identificação de espécies Calliphoridae no que concerne ao grande número de *primers* para a sua identificação, bem como realizaram uma revisão sobre a temática entomologia forense nos últimos anos.



**Figura 1.** Gene COI e principais primers utilizados. Gene COI com seus *primers forward* marcados com letras alfabéticas e seus *primers reversos* são rotulados com números. O número da posição refere-se à sequência de *Drosophila yakuba*. Fonte: TUCCIA et al. (2016).

Percebe-se que a utilização de investigações de cunho molecular auxiliam de forma precisa quanto à identificação de espécies por meio das análises do DNA BARCODE, bem como análises filogenéticas correspondentes. A precisão do método molecular torna-se mais viável do que a própria criação desses organismos em laboratório, tornando os estudos entomológicos do investigador forense mais eficientes. A ferramenta tem evoluído bastante nos últimos anos e se tornado imprescindível em uma época de expansão da Biologia Molecular.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir das análises provenientes das técnicas aplicadas à Entomologia Forense, percebe-se um gradual avanço entre estas de aplicabilidade no âmbito de justiça com contribuição biológica. As ciências relativas à natureza vêm conquistado de modo proeminente sua contraparte forense, servindo como base importantíssima na solução de casos criminais envolvendo evidência entomológica. Necessita-se de maior aprofundamento dos avanços tecnológicos para um apurado de evidências, bem como de uma regulamentação judicial para a aplicabilidade dessas tecnologias e informações.

## REFERÊNCIAS

- ALVES, A. C. F.; SANTOS, W. E.; FARIAS, R. C. A. P.; CREÃO-DUARTE, A. J. Blowflies (Diptera, Calliphoridae) associated with pig carcasses in a Caatinga area, Northeastern Brazil. **Neotropical Entomology**, v. 43, n. 2, p. 122-126. 2014.
- GRZYWACZ, A.; WYBORSKA, D.; PIWCZYŃSKI, M. DNA barcoding allows identification of European Fanniidae (Diptera) of forensic interest. **Forensic Science International**, [s.l.], v. 278, n. 1, p.106-114, set. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2017.06.023>
- HEBERT, P. D. N.; GREGORY, T. R. The promise of DNA barcoding for taxonomy. **Systematic Biology**, v. 54, n. 5, p. 852-859, 2005.
- MADRA, A.; FRATCZAK, K.; GRYZWACK, A.; MATUSZEWSKI, S. Long-term study of pig carrion entomofauna. **Forensic Science Internacional**, v. 1, n. 252, p.1-10, 2015.
- PENTINSAARI, M.; MUTANEN M.; KAILA L. Cryptic diversity and signs of mitochondrial introgression in the *Agrilus viridis* species complex (Coleoptera: Buprestidae). **European Journal of Entomology**, v. 1, n. 111, p.475-486, 2014.
- TSANG, L. M.; CHU, K. H.; NOZAWA, Y.; CHAN, B. K. K. Morphological and host specificity evolution in coral symbiont barnacles (Balanomorpha: Pyrgomatidae) inferred from a multi-locus phylogeny. **Molecular Phylogenetic Evolution**, v. 1, n. 77, p.11-22, 2014.
- SHARMA, R.; GARG, R. K.; GAUR, Jr.. Various methods for the estimation of the postmortem interval from Calliphoridae: A review. **Egyptian Journal of Forensic Sciences**, p.1-12, 2013.
- SZPILA, K., MADRA, A.; JARMUSZ, M.; MATEUSZEWSKI, S. Flesh flies (Diptera: Sarcophagidae) colonising large carcasses in Central Europe., **Parasitology Research**, v. 1, n. 114, p.2341-2348, 2015.
- TUCCIA, F.; GIORDANI, G.; VANIN, S. A general review of the most common COI primers for Calliphoridae identification in forensic entomology. **Forensic Science International: Genetics**, v. 24, n. 1, p. 9-11, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigen.2016.07.003>
- ZAJAC, B. K.; MARTIN-VEGA D.; FEDDERN, N.; FREMDT, H.; CASTRO, C. P.; SZPILA, K.; RECKEL, F.; SCHUTT, S.; VERHOFF, M. A.; AMENDT, J.; ZEHNER R. Molecular identification and phylogenetic analysis of the forensically important family Piophilidae (Diptera) from different European locations. **Forensic Science International**, v. 259, n. 1, p. 77-84, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2015.12.024>