

ALESSANDRA SANTANA BATISTA TONI

**MORFOLOGIA DO INTESTINO E RECUPERAÇÃO DE DNA DO CONTEÚDO
INTESTINAL DE LARVAS E ADULTOS DE *Oxelytrum discicolle* (BRULLÉ, 1840)
(COLEOPTERA: SILPHIDAE)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: José Eduardo Serrão

Coorientadoras: Verônica Saraiva Fialho

Jamile Fernanda Silva Cossolin

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2021**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa

T

T655m
2021 Toni, Alessandra Santana Batista, 1997-
Morfologia do intestino e recuperação de DNA do conteúdo
intestinal de larvas e adultos de *Oxelytrum discicolle* (Brullé,
1840) (Coleoptera: Silphidae) / Alessandra Santana Batista Toni.
– Viçosa, MG, 2021.
1 dissertação eletrônica (64 f.): il. (algumas color.).

Orientador: José Eduardo Serrão.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Biologia Geral, 2021.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.043>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Entomologia forense. 2. Histologia. 3. Genética forense.
I. Serrão, José Eduardo, 1965-. II. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Biologia Geral. Programa de
Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural. III. Título.

CDD 22. ed. 614.1

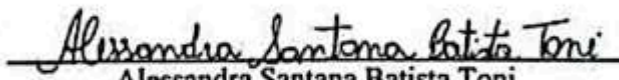
ALESSANDRA SANTANA BATISTA TONI

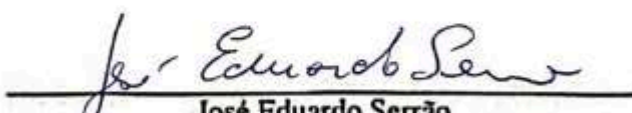
**MORFOLOGIA DO INTESTINO E RECUPERAÇÃO DE DNA DO
CONTEÚDO INTESTINAL DE LARVAS E ADULTOS DE *Oxelytrum discicolle*
(BRULLÉ, 1840) (COLEOPTERA: SILPHIDAE)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 22 de outubro de 2021.

Assentimento:


Alessandra Santana Batista Toni
Autora


José Eduardo Serrão
Orientador

DECLARAÇÃO COVID

A pandemia de COVID-19 iniciada em 2020 afetou a realização dessa dissertação, impossibilitando análises em microscopia eletrônica de transmissão das amostras de intestino de larvas e adultos.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural pela oportunidade de realizar uma pós-graduação, trabalhando em uma universidade com ótima estrutura e oportunidades de crescimento profissional e pessoal para os seus alunos;

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise pelo apoio técnico;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos;

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001;

À Deus e a Nossa Senhora, pela oportunidade de realizar esse trabalho dando a força e paciência necessários e por sempre me mostrarem o melhor caminho a seguir;

À minha mãe, Márcia, por todo carinho e preocupação, ao meu pai, Rogério pelo apoio tanto emocional quanto prático me ajudando nas coletas, a minha irmã, Francielli pela amizade e apoio, e ao André pela paciência e incentivo;

Aos amigos do MUR Viçosa, em especial do Grupo de Estudos Bíblicos Semente, pela amizade e por serem refúgio tanto nos dias felizes quanto nos difíceis;

Ao professor Serrão, pela orientação e paciência, todos os pós-graduandos poderiam ter a chance de trabalhar com um orientador compreensivo e excelente profissional;

À Verônica, pela coorientação e ensinamentos que levarei ao longo da minha vida profissional;

À servidora Elizabeth Alves Pena pelos serviços prestados aos alunos do programa;

Aos colegas do laboratório de Biologia Celular e Estrutural, em especial à Jamile, pelos ensinamentos e ajuda que não foram poucos, e também à Daniela, ao André e à Lenise por toda a ajuda e paciência;

À banca examinadora, pelo aceite em participar da avaliação deste trabalho e pelas contribuições para o aperfeiçoamento do mesmo.

RESUMO

TONI, Alessandra Santana Batista, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2021. **Morfologia do intestino e recuperação de DNA do conteúdo intestinal de larvas e adultos de *Oxelytrum discicolle* (BRULLÉ, 1840) (COLEOPTERA: SILPHIDAE).** Orientador: José Eduardo Serrão. Coorientadoras: Verônica Saraiva Fialho e Jamile Fernanda Silva Cossolin.

Oxelytrum discicolle é um besouro necrófago estudado pela entomologia forense com ampla distribuição na América do sul. Possui três instares larvais e tanto as larvas quanto os adultos se alimentam de carcaças. O intestino dos insetos é um órgão amplamente estudado e suas características podem variar de acordo com o hábito alimentar e a história evolutiva de cada grupo. A partir das características do intestino é possível estabelecer aplicações na entomologia forense. Em situações onde a identificação da vítima e do autor não são possíveis, analisar o conteúdo presente no intestino permite a recuperação do DNA do cadáver do qual os insetos se alimentaram. O objetivo deste trabalho foi analisar a morfologia do intestino de larvas e adultos e recuperar o DNA presente no conteúdo intestinal de larvas e adultos de *O. discicolle*. Larvas e adultos foram dissecados, e o intestino analisado em microscopia de luz e eletrônica de varredura. Foram observadas poucas diferenças entre os instares larvais, com presença de criptas regenerativas e grande quantidade de secreção no lúmen do intestino médio. Entre machos e fêmeas também não há diferenças significativas. Os adultos possuem cecos no intestino médio que assumem tanto a função regenerativa quanto as funções de secreção de enzimas e absorção de nutrientes. Para a detecção de DNA larvas e adultos alimentados com carne suína foram dissecados e, tanto o intestino inteiro, quanto o conteúdo intestinal, passaram por processo de extração e amplificação do DNA. A taxa de detecção geral foi de 31,3% das amostras. A taxa de detecção foi maior nas larvas em relação aos adultos. Os resultados deste trabalho mostram que *O. discicolle* possui as características do intestino semelhantes as demais espécies de Coleoptera corroborando com a hipótese de que a morfologia do intestino dos insetos é um padrão herdado, sendo moldada pela evolução dos grupos. Além disso, analisando o conteúdo intestinal de *O. discicolle* é uma espécie que pode ser utilizada na recuperação de DNA em seu conteúdo intestinal quando encontrada em locais de crime.

Palavras-chave: Entomologia Forense. Histologia. Entomogenética.

ABSTRACT

TONI, Alessandra Santana Batista, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, October, 2021. **Gut morphology and DNA recovery of the intestinal contents of *Oxelytrum discicolle* (BRULLÉ, 1840) (COLEOPTERA: SILPHIDAE) larvae and adults.** Advisor: José Eduardo Serrão. Co-advisors: Verônica Saraiva Fialho and Jamile Fernanda Silva Cossolin.

Oxelytrum discicolle is a necrophagous beetle studied by forensic entomology with wide distribution in the Neotropical region. It has three larval instars and both larvae and adults feed on carcasses. The insect gut is a widely studied organ and its characteristics may vary according to the eating habits and evolutionary history of each group. From the characteristics of the gut, it is possible to establish applications in forensic entomology. In situations where the identification of the victim and the perpetrator are not possible, analyzing the contents present in the gut allows the recovery of the corpse's DNA on which the insects fed on. The objective of this study was to analyze the morphology of larvae and adults' gut and recover the DNA present in the intestinal content of *O. discicolle* larvae and adults. Larvae and adults were dissected, the gut was analyzed by light microscopy and scanning electronics microscopy. Only a few differences were observed between larval instars, with the presence of regenerative crypts and a large amount of secretion in the midgut lumen. Between males and females, there were no significant differences either. Adults have cecum in the midgut that take on both the regenerative function and the functions of enzyme secretion and nutrient absorption. For the detection of DNA, larvae and adults that fed on pork were dissected and both the entire gut and the intestinal contents underwent a process of DNA extraction and amplification. The overall detection rate was in 31.3% of the samples. The detection rate was higher in larvae than in adults. The results of this study show that *O. discicolle* has gut characteristics similar to other Coleoptera species, confirming the hypothesis that insect gut morphology is an inherited pattern, being shaped by the evolution of groups. Also, by analyzing the intestinal content of *O. discicolle*, it is a species that can be used to recover DNA in its intestinal content when found in crime scenes.

Keywords: Forensic Entomology. Histology. Entomogenetics.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	8
1.1 O intestino dos insetos	9
1.2 Recuperação de DNA do conteúdo intestinal de insetos	11
1.3 <i>Oxelytrum discicolle</i> : um vestígio importante na cena de crime	13
2. OBJETIVO.....	14
CAPÍTULO 1: Morfologia do intestino de larvas e adultos do besouro necrófago <i>Oxelytrum discicolle</i> (Brullé, 1840) (Coleoptera: Silphidae).....	19
1. INTRODUÇÃO	21
2.MATERIAL E MÉTODOS	23
2.2 Anatomia	23
2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura	24
2.4 Histologia e Histoquímica	24
3.RESULTADOS	25
3.1 Larvas	25
3.2 Adultos.....	27
4.DISSCUSSÃO.....	33
4.1 Larvas	33
4.2 Adultos.....	35
CAPÍTULO 2: Recuperação de DNA exógeno do conteúdo intestinal de larvas e adultos do besouro necrófago <i>Oxelytrum discicolle</i> (Brullé, 1840) (Silphidae)	43
1.INTRODUÇÃO	45
2.MATERIAL E MÉTODOS	47
2.1 Coleta dos insetos e delineamento experimental.....	47
2.2 Dissecção.....	50
2.3 Extração e quantificação	51
2.4 Seleção e teste dos primers.....	52
2.5 Amplificação do DNA via PCR <i>touchdown</i>	53
3.RESULTADOS	53
4.DISSCUSSÃO.....	55
5.CONCLUSÕES.....	61
REFERÊNCIAS	62

1. INTRODUÇÃO GERAL

A ordem Coleoptera possui uma alta diversidade de famílias com os mais variados hábitos alimentares. Silphidae abrange duas subfamílias, 13 gêneros e 210 espécies de besouros predominantemente necrófagos, das quais 82 ocorrem na região Neotropical (PECK, 2001; PECK e ANDERSON, 1985). O gênero *Oxelytrum* se destaca por sua ampla distribuição, com registros de ocorrência em praticamente todo o continente americano, especialmente nas regiões Central e Sul (LIRA e VASCONCELOS, 2016; OLIVA, 2012; PECK e ANDERSON, 1985; URURAHY-RODRIGUES e colab., 2010). Este gênero possui oito espécies, sendo três encontradas no Brasil: *Oxelytrum cayennense* (Stürm, 1826), *Oxelytrum discicolle* (Brullé, 1840) e *Oxelytrum erythrurum* (Blanchard, 1859) (PECK e ANDERSON, 1985).

O hábito necrófago de adultos e, sobretudo, das larvas e a ampla distribuição geográfica possibilitam que as espécies de *Oxelytrum* sejam utilizadas como vestígios pela entomologia forense na averiguação de casos de crimes contra a vida (LIRA e colab., 2020; LIRA e VASCONCELOS, 2016; SOUZA e colab., 2014).

Além da importância forense, estas espécies são de importância ecológica, atuando de diversas formas na homeostase do ecossistema que ocupam. Participam da ciclagem de nutrientes enquanto insetos detritívoros e, através da bioturbação, ajudam na dispersão dos nutrientes liberados pela decomposição e promovem fertilização do solo, possibilitando o crescimento da vegetação (NICHOLS e colab., 2008). Atuam também no controle populacional de Diptera, predando larvas.

As larvas de *O. discicolle* são esclerotizadas, com tergitos prolongados e região dorsal de coloração castanho escuro (COSTA e colab., 1988). São exclusivamente necrófagas (OLIVA, 2012), caminham pela carcaça e alojam-se nas cavidades corporais, especialmente no crânio, e sob o cadáver, alimentando-se principalmente dos exsudatos liberados durante a decomposição. Do ovo até o adulto apresentam três instares larvais. O primeiro instar dura de um a três dias e o tamanho das larvas varia entre 12 a 21 mm de acordo com (VELÁSQUEZ e VILORIA, 2010) e de 4 a 10 mm de acordo com (BONFANTI e colab., 2018). O segundo instar dura de um a quatro dias e o tamanho das larvas varia de 18 a 44 mm de acordo com (VELÁSQUEZ e VILORIA, 2010) e de 7 a 15 mm de acordo com (BONFANTI e colab., 2018). Já o terceiro instar dura de um a 16 dias e o tamanho das larvas varia de 29 a 47 mm de

acordo com (VELÁSQUEZ e VILORIA, 2010) e 12 a 23 mm de acordo com (BONFANTI e colab., 2018). De modo geral, o ciclo de vida desta espécie possui duração de, aproximadamente, 40 dias, embora possam ocorrer variações mediante influência da temperatura (BONFANTI e colab., 2018; MISE, 2011; VELÁSQUEZ e VILORIA, 2009, 2010).

Os adultos de *O. discicolle* possuem élitro curto, com tamanho variando entre 11-19 mm (PECK e ANDERSON, 1985). Apresentam pronoto alaranjado e dimorfismo sexual (OLIVA, 2012; PECK e ANDERSON, 1985). O seu hábito é predominantemente noturno e alimentam-se não somente de carcaças, mas também são predadores de larvas de Diptera necrófagos (LIRA e colab., 2017; LIRA e VASCONCELOS, 2016; PECK e ANDERSON, 1985).

1.1 O intestino dos insetos

O canal alimentar dos insetos é constituído por intestino anterior, médio e posterior, também denominados estomodeu, mesêntero e proctodeu, respectivamente. Geralmente essas três regiões são formadas por uma camada simples de células epiteliais delimitadas por uma membrana basal e músculo estriado (CHAPMAN, 2013).

O intestino anterior é de origem ectodérmica, possui epitélio com células achatadas revestidas por cutícula e é dividido em: faringe, esôfago, papo, proventrículo e válvula cardíaca. De forma geral, o intestino anterior é responsável por ativar a liberação das enzimas digestivas no intestino médio. A faringe tem a função de passagem de alimento, geralmente possui musculatura associada mais desenvolvida. O esôfago é um tubo simples de conexão entre a faringe e o papo. O papo é uma região de armazenamento de alimento, sendo uma parte extensível do intestino localizada logo após o esôfago. O proventrículo filtra e tritura as partículas ingeridas e possui formato variado. A válvula cardíaca (estomodeal) é uma região de transição entre os intestinos anterior e médio que pode ter o formato de bulbo em algumas espécies (CACCIA e colab., 2019; CHAPMAN, 2013; HOLTOF e colab., 2019).

O intestino médio é de origem endodérmica e, na maioria dos insetos, é revestido por matriz peritrófica. A matriz peritrófica é formada por quitina e proteínas, e possui funções como a lubrificação da passagem do bolo alimentar, proteção do epitélio contra entomopatógenos e toxinas que possam ter sido ingeridas e também contra a abrasão causada pelos alimentos. Além disso, compartimentaliza o lúmen do intestino médio em espaços

endoperitrófico e ectoperitrófico, delimitando o sítio de ação das enzimas digestivas (ERLANDSON e colab., 2019; HEGEDUS e colab., 2019; KONNO & MITSUHASHI 2019; OLIVEIRA e colab., 2019). Em muitos insetos, o intestino médio é circundado por cecos, e suas principais funções são a digestão propriamente dita e a absorção de nutrientes (CACCIA e colab., 2019; CHAPMAN, 2013; HOLTOF e colab., 2019). As principais células que compõem o intestino médio são as células colunares, células regenerativas e células endócrinas (BILLINGSLEY e LEHANE, 1996). As células colunares têm como funções a síntese de enzimas digestivas e a absorção dos nutrientes através das microvilosidades (HECKER, 1977; THOMAS e BÖCKELER, 1994). Estas células podem sofrer alterações fisiológicas em situações de alimentação com diferentes fontes e escassez de alimento. Armazenam moléculas geradoras de energia em vacúolos para serem utilizadas em situação de escassez (FIALHO e colab., 2009; ROCHA e colab., 2010). Já as células regenerativas são responsáveis pela renovação do tecido durante o crescimento, recuperação após injúrias e participam ativamente da formação de tecido durante a metamorfose (BILLINGSLEY e DOWNE, 1986; HECKER, 1977; MARTINS e colab., 2006). As células endócrinas produzem moléculas sinalizadoras que regulam a fisiologia do intestino e atividade de outros órgãos (ANDRIÈS e BEAUVILLAIN, 1988; ANDRIÈS e TRAMU, 1985; SANTOS, D. E. e colab., 2015).

O intestino posterior é de origem ectodérmica, revestido por cutícula. É subdividido em três regiões: piloro, íleo e reto (CHAPMAN, 2013). A organização geral do intestino posterior é de células colunares e achatadas revestidas por cutícula, porém nesta região a cutícula tende a ser mais espessa e esclerotizada (DALLAI e colab., 1991; JARIAL e SCUDDER, 1970). O piloro é o local de inserção dos túbulos de Malpighi. Em muitos insetos ele é delimitado por músculos e atua como esfíncter, controlando a passagem de alimento do intestino médio para o posterior, a fim de impedir o refluxo para o intestino médio. Os túbulos de Malpighi realizam a absorção de água e excreção de sais, mantendo níveis homeostáticos no organismo do inseto (CACCIA e colab., 2019; CHAPMAN, 2013; HOLTOF e colab., 2019). O íleo, geralmente é um tubo estreito entre o piloro e o reto, as células do íleo possuem dobras no ápice da membrana plasmática com grande quantidade de mitocôndrias nessa região. A base da membrana plasmática também possui dobras, mas em menor extensão. O reto é um saco alargado com um epitélio fino, e possui papilas retais. Na região das papilas retais o epitélio é formado por células colunares. Normalmente são seis papilas retais ao redor do reto, onde as células epiteliais de cada papila são isoladas da hemocele por células da

bainha e uma camada celular basal. No intestino posterior ocorre a absorção de íons e água e detoxificação dos metabólitos resultantes da digestão. A absorção de água ocorre principalmente nas papilas retais (CACCIA e colab., 2019; CHAPMAN, 2013; HOLTOF e colab., 2019; PHILLIPS e colab., 1987).

Assim, como em muitos insetos, em Silphidae há uma grande quantidade de bactérias específicas associadas ao trato digestivo que irão auxiliar no processo de digestão dentre outras funções (VOGEL e colab., 2017). Esses micro-organismos possuem não somente a função de digestão do alimento como também estão envolvidos na modulação da atividade imunológica, participando da reciclagem de nutrientes, separação de toxinas e síntese de moléculas para comunicação, possuindo uma relação de simbiose com o hospedeiro (ENGEL e MORAN, 2013; VOGEL e colab., 2017).

Não há dados sobre a morfologia e histologia do intestino de *O. discicolle*. As informações sobre o intestino de besouros necrófagos abordam outras características, como a microbiota residente e a liberação de secreções intestinais como forma de defesa (EISNER e MEINWALD, 1983; VOGEL e colab., 2017).

1.2 Recuperação de DNA do conteúdo intestinal de insetos

Na investigação de crimes contra a vida, diversos recursos são utilizados para elucidação da dinâmica do fato delituoso. Algumas das principais medidas que devem ser tomadas são as identificações da vítima e do agressor, e o estabelecimento do intervalo pós-morte (IPM). Nesse sentido, os insetos necrófagos podem ser aliados, porque são os primeiros a chegar ao corpo e permanecem todo o seu ciclo de vida no cadáver. O estudo da utilização de insetos na apuração de crimes é denominado entomologia forense e possui diversas ramificações, sendo as principais ordens de insetos estudadas por essa área, os Diptera e Coleoptera (CATTS e GOFF, 1992; KEH, 1985).

Nesse contexto, o conhecimento sobre o ciclo de vida dos insetos pode auxiliar na determinação do IPM. A identificação dos instares larvais dos insetos necrófagos encontrados no local do crime, juntamente com o estado de decomposição em que o corpo da vítima foi encontrado, podem ser analisados para estimar o intervalo de tempo em que ocorreu o óbito, sendo que espécies de Silphidae tem sido estudadas e usadas para essa finalidade (RIDGEWAY e colab., 2014), incluindo *O. discicolle* (LIRA e colab., 2020). Com a ajuda

dos insetos também é possível avaliar se o corpo foi transportado, se a vítima morreu antes ou depois de ser enterrada e quanto tempo após a morte o corpo foi enterrado (CATTS e GOFF, 1992; KEH, 1985).

Além dessas aplicações, é possível detectar, através da entomotoxicologia forense, substâncias químicas que possam estar associadas ao óbito, como entorpecentes, sedativos e venenos, que podem impregnar ou bioacumular nos insetos localizados na cena de crime (INTRONA e colab., 2001). Nesta área também se avalia a interferência de drogas no ciclo de vida dos insetos, podendo acelerar ou retardar o tempo de desenvolvimento das larvas, o que interfere diretamente na estimativa do IPM. Essa aplicação se mostra uma alternativa em casos onde, devido à decomposição, não há mais tecidos moles ou fluidos que geralmente são usados nas análises toxicológicas (INTRONA e colab., 2001).

Há situações em que o corpo pode ter sido removido, encontrado em avançado estágio de decomposição, carbonizado ou restarem apenas os ossos, dificultando a identificação da vítima. Nesses casos, existe a possibilidade de recuperação do DNA do cadáver no intestino dos insetos encontrados no local do crime, (DURDLE e colab., 2018; NJAU e colab., 2016; POWERS e colab., 2019). Este DNA recuperado também pode permitir a identificação do criminoso em situações de violência sexual através do processamento dos insetos presentes na região genital, que potencialmente alimentaram-se do sêmen (CHAMOUN e colab., 2019, 2020).

A detecção de DNA exógeno no conteúdo intestinal de insetos é uma técnica de identificação válida que pode complementar informações em uma investigação criminal quando as técnicas de identificação convencionais não são suficientes.

É possível também obter e identificar DNA humano do intestino de mosquitos hematófagos. Em representantes de Culicidae, apesar da probabilidade de obtenção de DNA diminuir significativamente com o passar do tempo, é possível recuperar perfis genéticos em até 88 horas após o repasto sanguíneo (CURIC e colab., 2014). Em *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) a obtenção de material genético foi feita em uma e 24 horas após a alimentação dos mosquitos. (VIEIRA e colab., 2017). O DNA humano também já foi recuperado em percevejos da espécie *Cimex lectularius* (Linnaeus, 1758) (Hemiptera: Cimicidae). com com marcadores STR até 72 horas após a alimentação com sangue humano (SCHAL e colab., 2018). Em larvas de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819) (Diptera: Calliphoridae), foi possível recuperar o DNA em até 14 dias após a alimentação com sêmen humano (CHAMOUN e colab., 2020).

Além do intervalo de tempo decorrido após a alimentação, a eficácia na recuperação do DNA pode mudar de acordo com outras variáveis. O instar larval da espécie, a ingestão de outros alimentos após a ingestão de tecido ou fluido humano e as formas de armazenamento do material para extração do DNA influenciam diretamente na taxa de recuperação (para uma revisão completa, vide DURDLE, 2019).

Além dos fatores elencados acima, as características do intestino do inseto podem influenciar na recuperação do DNA. Insetos que possuem a região anterior como região de armazenamento apresentam poucas enzimas digestivas e o processo de digestão mais lento e menos eficaz (BILLINGSLEY e LEHANE, 1996; TERRA, W. R., 1990; TERRA, Walter R. e FERREIRA, 2020), provavelmente mantendo uma maior quantidade de DNA exógeno, proveniente da alimentação, disponível por mais tempo. Espécies com intestino sem região de armazenamento de alimento e maior quantidade de enzimas digestivas possuem a digestão mais eficaz (BILLINGSLEY e LEHANE, 1996; TERRA, W. R., 1990; TERRA, Walter R. e FERREIRA, 2020), e uma possível degradação de DNA exógeno mais acelerada, o que pode reduzir consideravelmente a taxa de recuperação e caracterização deste material genético.

Nos institutos de criminalística, para a extração de DNA em amostras biológicas encontradas em local de crime são utilizados kits específicos para amostras forenses. Esses kits são mais sensíveis a amostras degradadas e a recuperação do DNA varia conforme o kit utilizado na extração.

1.3 *Oxelytrum discicolle*: um vestígio importante na cena de crime

Oxelytrum discicolle tem sido utilizada em diversos estudos de entomologia forense e aplicada em casos reais de investigação, inclusive para determinar o IPM (LIRA e colab., 2020; LIRA e VASCONCELOS, 2016; SOUZA e colab., 2014). Há registros de *O. discicolle* na Mata Atlântica (FERREIRA e colab., 2006) e em matas de galeria no Cerrado (LIRA e VASCONCELOS, 2016) sendo coletados em maior quantidade em ambientes úmidos, com vegetação mais densa e em períodos chuvosos (FERREIRA e colab., 2006; LIRA e colab., 2019; LIRA e VASCONCELOS, 2016). São encontrados em todas as fases de decomposição das carcaças, desde o estágio fresco até a esqueletização, porém com maior abundância nos estágios mais avançados da decomposição (LIRA e colab., 2019) e em carcaças de tamanho maior (LIRA e VASCONCELOS, 2016). Os adultos conseguem localizar o cadáver

imediatamente após a morte, assim como as moscas, podendo inclusive chegar a uma carcaça mesmo que esta esteja enterrada (LIRA e VASCONCELOS, 2016).

Essas características mostram que *O. discicolle* é uma espécie com potencial para uso como prova material em crimes contra a vida não só na determinação do IPM, mas na detecção de DNA no seu conteúdo intestinal. Há diversos trabalhos de recuperação de DNA em no intestino de insetos, mas abordam principalmente espécies de Diptera (DURDLE, 2019). Apenas um trabalho testa a possibilidade de recuperação em espécie de Coleoptera, onde foram utilizadas larvas de Nitidulidae retiradas de uma ossada humana (DIZINNO e colab., 2002). E, até o momento, não há estudos analisando a capacidade de recuperação de DNA no conteúdo intestinal de *O. discicolle*.

2. OBJETIVO

O objetivo foi descrever a morfologia intestinal e verificar a possibilidade de recuperação de DNA exógeno do conteúdo intestinal em larvas e adultos de *O. discicolle*. Especificamente, no capítulo 1 desta dissertação são descritas as características anatômicas, histológicas e histoquímicas do intestino de *O. discicolle*, comparando-se as características presentes entre os três instares larvais e adultos machos e fêmeas. No capítulo 2, foi analisada a possibilidade de obtenção e caracterização de DNA exógeno presente no intestino das larvas e adultos, para fins de potencial utilização desta espécie na área forense.

REFERÊNCIAS

- ANDRIÈS, J. C. e BEAUVILLAIN, J. C. **Ultrastructural study of cholecystokinin-like immunoreactivity in endocrine cells of the insect midgut.** Cell and Tissue Research, v. 254, n. 1, p. 75–81, 1988.
- ANDRIÈS, J. C. e TRAMU, G. **Ultrastructural and immunohistochemical study of endocrine cells in the midgut of the cockroach *Blaberus craniifer* (Insecta, Dictyoptera).** Cell and Tissue Research, v. 240, n. 2, p. 323–332, 1985.
- BILLINGSLEY, P. F. e LEHANE, M. J. **Structure and ultrastructure of the insect midgut.** Biology of the Insect Midgut, p. 3–30, 1996.
- BILLINGSLEY, P.F. e DOWNE, A.E.R. **Nondigestive cell types in the midgut epithelium of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae).** Journal of Medical Entomology, v. 23, n. 2, p. 212–216, 1986.
- BONFANTI, Carla Fabiana e GAEDKE, Anderson e MOUGA, Denise Monique Dubet da Silva. **Fases de desenvolvimento de *Oxelytrum discicolle* (Brullé, 1840) (Silphidae, Coleoptera) na região nordeste de Santa Catarina.** Acta Biológica Catarinense, v. 5, n. 2, p. 20–24, 2018.
- CACCIA, Silvia e CASARTELLI, Morena e TETTAMANTI, Gianluca. **The amazing complexity of insect midgut cells: types, peculiarities, and functions.** Cell and Tissue Research, v. 377, n. 3, p. 505–525, 2019.
- CATTS, E. P. e GOFF, M. L. **Forensic entomology in criminal investigations.** Annual Review of Entomology, v. 37, n. 1, p. 253–72, 1992.
- CHAMOUN, C. A. e colab. **In vitro recovery and identification of Y-STR DNA from *Chrysomya albiceps* (Diptera, Calliphoridae) larvae fed a decomposing mixture of human semen and ground beef.** Genetics and Molecular Research, v. 18, n. 1, p. 1–11, 2019.
- CHAMOUN, C. A. e colab. **Recovery & identification of human Y-STR DNA from immatures of *Chrysomya albiceps* (Diptera: Calliphoridae). Simulation of sexual crime investigation involving victim corpse in state of decay.** Forensic Science International, v. 310, p. 110239, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2020.110239>>.
- CHAPMAN, R. F. **The Insects: structure and function.** 5. ed. New York: Cambridge University Press, 2013.
- COSTA, C e VANIN, S. A e CASSARI-CHEN, S. A; **Larvas de Coleoptera do Brasil.** 1. ed. São Paulo: Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, 1988.
- CURIC, Goran e colab. **Identification of person and quantification of human DNA recovered from mosquitoes (Culicidae).** Forensic Science International: Genetics, v. 8, n. 1, p. 109–112, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigen.2013.07.011>>.
- DALLAI, R. e BENE, G. Del e MARCHINI, D. **The ultrastructure of malpighian tubules and hindgut of *Frankinella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae).** International Journal Insect Morphology & Embryology, v. 20, n. 4, p. 223–233, 1991.
- DIZINNO, Joseph A. e colab. **Mitochondrial DNA sequencing of beetle larvae (Nitidulidae: Omosita) recovered from human bone.** Journal of Forensic Sciences, v. 47, n. 6, 2002.
- DURDLE, Annalisa. **Insects as vectors of DNA in a forensic context.** Wiley Interdisciplinary Reviews: Forensic Science, n. June, p. 1–27, 2019.
- DURDLE, Annalisa e colab. **Location of artifacts deposited by the blow fly *Lucilia cuprina* after feeding on human blood at simulated indoor crime scenes.** Journal of Forensic Sciences, v. 63, n. 4, p. 1261–1268, 2018.
- DURDLE, Annalisa e MITCHELL, Robert J. e VAN OORSCHOT, Roland A.H. **The food**

- preferences of the blow fly *Lucilia cuprina* offered human blood, semen and saliva, and various nonhuman foods sources. *Journal of Forensic Sciences*, v. 61, n. 1, p. 99–103, 2016.
- EISNER, Thomas e MEINWALD, Jerrold. **Defensive spray mechanism of a silphid beetle (*Necrodes surinamensis*)**. *Psyche*, v. 87, n. 72, p. 357–367, 1983.
- ENGEL, Philipp e MORAN, Nancy A. **The gut microbiota of insects - diversity in structure and function**. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 37, n. 5, p. 699–735, 2013.
- ERLANDSON, Martin A. e TOPRAK, Umut e HEGEDUS, Dwayne D. **Role of the peritrophic matrix in insect-pathogen interactions**. *Journal of Insect Physiology*, v. 117, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2019.103894>>.
- FERREIRA, Paulo Sérgio Fiuza e colab. **Seasonal abundance and sexual variation in morphometric traits of *Oxelytrum discicolle* (Brulle, 1840) (Coleoptera: Silphidae) in a Brazilian Atlantic Forest**. *Biota Neotropica*, v. 6, n. 2, 2006.
- FIALHO, Maria do Carmo Q. e colab. **Ultrastructure of the digestive cells in the midgut of the predator *Broncotoris tabidus* (Heteroptera: Pentatomidae) after different feeding periods on prey and plants**. *Annals of the Entomological Society of America*, v. 102, n. 1, p. 119–127, 2009.
- HECKER, Hermann. **Structure and function of midgut epithelial cells in *Culicidae* mosquitoes (Insecta, Diptera)**. *Cell and Tissue Research*, v. 184, n. 3, p. 321–341, 1977.
- HEGEDUS, Dwayne D. e TOPRAK, Umut e ERLANDSON, Martin. **Peritrophic matrix formation**. *Journal of Insect Physiology*, v. 117, n. June, p. 103898, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2019.103898>>.
- HOLTOF, Michiel e colab. **Extracellular nutrient digestion and absorption in the insect gut**. *Cell and Tissue Research*, v. 377, n. 3, p. 397–414, 2019.
- INTRONA, Francesco e CAMPOBASSO, Carlo Pietro e GOFF, Madison Lee. **Entomotoxicology**. *Forensic Science International*, v. 120, n. 1–2, p. 42–47, 2001.
- JARIAL, M. S. e SCUDDER, G. G.E. **The morphology and ultrastructure of the malpighian tubules and hindgut in *Cenocorixa bifida* (Hung.) (Hemiptera, Corixidae)**. *Z. Morph. Tiere*, v. 68, n. 4, p. 269–299, 1970.
- KEH, B. **Scope and applications of forensic entomology**. *Annual Review of Entomology*, v. 30, n. 1, p. 137–154, 1985.
- KONNO, Kotaro e MITSUHASHI, Wataru. **The peritrophic membrane as a target of proteins that play important roles in plant defense and microbial attack**. *Journal of Insect Physiology*, v. 117, p. 103912, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2019.103912>>.
- LIRA, Luiz Antonio e colab. **Diel activity and effect of carcass decomposition on the attractiveness to the forensically important species *Oxelytrum discicolle* (Coleoptera: Silphidae)**. *Journal of Forensic Sciences*, v. 64, n. 3, p. 799–804, 2019.
- LIRA, Luiz Antonio e colab. **The carrion beetle *Oxelytrum discicolle* (Coleoptera: Silphidae) and the estimative of the minimum post-mortem interval in a forensic case in Brasília, Brazil**. *Revista Brasileira de Entomologia*, v. 64, n. 1, 2020.
- LIRA, Luiz Antonio e HARTERREITEN-SOUZA, Érica Sevilha e VASCONCELOS, Simão Dias. **A short-term study on bait attractiveness to the forensically relevant species *Oxelytrum discicolle* (Brullé, 1840) (Coleoptera: Silphidae)**. *Entomological News*, v. 126, n. 5, p. 424–427, 2017.
- LIRA, Luiz Antonio e VASCONCELOS, Simão Dias. **New record and update on the distribution *Oxelytrum discicolle* (Brullé, 1840) (Coleoptera: Silphidae) in South America**. *The Coleopterists Bulletin*, v. 70, n. 2, p. 399–402, 2016.
- MARTINS, Gustavo Ferreira e colab. **The regenerative cells during the metamorphosis in the midgut of bees**. *Micron*, v. 37, n. 2, p. 161–168, 2006.
- MISE, Kleber Makoto. **Parâmetros biológicos e métodos de diferenciação de espécies e**

- ínstares de Coleoptera de interesse forense.** 2011. 91 f. Universidade Federal do Paraná, 2011. Disponível em: <<http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/handle/1884/26369>>.
- NICHOLS, E. e colab. **Ecological functions and ecosystem services provided by Scarabaeinae dung beetles.** *Biological Conservation*, v. 141, n. 6, p. 1461–1474, 2008.
- NJAU, Daniel Gachuiiri e colab. **STR analysis of human DNA from maggots fed on decomposing bodies: Assessment of the time period for successful analysis.** *Egyptian Journal of Forensic Sciences*, v. 6, n. 3, p. 261–269, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejfs.2015.04.002>>.
- OLIVA, Adriana. **A new species of *Oxelytrum gistel* (Coleoptera, Silphidae) from southern Argentina, with a key to the species of the genus.** *ZooKeys*, v. 203, p. 1–14, 2012.
- PECK, Stewart B. **Review of the carrion beetles of Australia and New Guinea (Coleoptera: Silphidae).** *Australian Journal of Entomology*, v. 40, n. 2, p. 93–101, 2001.
- PECK, Stewart B. e ANDERSON, R. S. **Taxonomy, phylogeny and biogeography of the carrion beetles of Latin America (Coleoptera: Silphidae).** *Quaestiones Entomologicae*, v. 21, n. 3, p. 247–317, 1985.
- PHILLIPS, J. E. e colab. **Mechanisms and control of reabsorption in insect hindgut.** *Advances in Insect Physiology*, v. 19, p. 329–422, 1987.
- POWERS, Jessica e VAN OORSCHOT, Roland A.H. e DURDLE, Annalisa. **Investigation into the presence of human DNA in the various life stages of forensically relevant Calliphorid species.** *Australian Journal of Forensic Sciences*, v. 51, n. 1, p. 234–237, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/00450618.2019.1569143>>.
- RIDGEWAY, J. A. e colab. **Advantages of using development models of the carrion beetles *Thanatophilus micans* (Fabricius) and *T. mutilatus* (Castelneau) (Coleoptera: Silphidae) for estimating minimum post mortem intervals, verified with case data.** *International Journal of Legal Medicine*, v. 128, n. 1, p. 207–220, 2014.
- ROCHA, Lamara Laguardia Valente e colab. **Digestive cells in the midgut of *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859) in different starvation periods.** *Comptes Rendus - Biologies*, v. 333, n. 5, p. 405–415, 2010.
- SANTOS, D. E. e colab. **Endocrine cells in the midgut of bees (Hymenoptera: Apoidea) with different levels of sociability.** *Journal of Apicultural Research*, v. 54, n. 4, p. 394–398, 2015.
- SCHAL, Coby e colab. **Isolation, identification, and time course of human DNA typing from bed bugs, *Cimex lectularius*.** *Forensic Science International*, v. 293, p. 1–6, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2018.10.008>>.
- SOUZA, Eduardo Rodrigues De e colab. **First medicolegal forensic entomology case of central amazon: a suicide by hanging with incomplete suspension.** *EntomoBrasilis*, v. 7, n. 1, p. 12–15, 2014.
- TERRA, W. R. **Evolution of digestive systems of insects.** *Annual review of entomology*. Vol. 35, p. 181–200, 1990.
- TERRA, Walter R. e FERREIRA, Clelia. **Evolutionary trends of digestion and absorption in the major insect orders.** *Arthropod Structure and Development*, v. 56, p. 100931, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.asd.2020.100931>>.
- THOMAS, G. e BÖCKELER, W. **Investigation of the intestinal spherocrystals of different Cephalobaenida (Pentastomida).** *Parasitology Research*, v. 80, n. 5, p. 420–425, 1994.
- URURAHY-RODRIGUES, Alexandre e colab. **Association of *Oxelytrum cayennense* (Silphidae, Coleoptera) with pig carcasses (*Sus scrofa*, Suidae) in terra firme areas in Manaus, Amazonas, Brazil.** *EntomoBrasilis*, v. 3, n. 2, p. 45–48, 2010.
- VELÁSQUEZ, Yelitza e VILORIA, Angel L. **Effects of temperature on the development of the Neotropical carrion beetle *Oxelytrum discicolle* (Brullé, 1840) (Coleoptera:**

Silphidae). Forensic Science International, v. 185, n. 1–3, p. 107–109, 2009.

VELÁSQUEZ, Yelitza e VILORIA, Ángel L. **Instar determination of the neotropical beetle *Oxelytrum discicolle* (Coleoptera: Silphidae)**. Journal of Medical Entomology, v. 47, n. 5, p. 723–726, 2010.

VIEIRA, B. R.C. e CARVALHO, E. F. e SILVA, D. A. **Analysis of human DNA present in the digestive tract of *Aedes aegypti* mosquitoes for possible forensic application**. Forensic Science International: Genetics Supplement Series, v. 6, n. September, p. 324–326, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2017.09.124>>.

VOGEL, Heiko e colab. **The digestive and defensive basis of carcass utilization by the burying beetle and its microbiota**. Nature Communications, v. 8, n. May, p. 1–15, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/ncomms15186>>.

CAPÍTULO 1

**Morfologia do intestino de larvas e adultos do besouro necrófago *Oxelytrum discicolle*
(Brullé, 1840) (Coleoptera: Silphidae)**

RESUMO

Oxelytrum discicolle é um besouro necrófago com distribuição na América do Sul e Central, usado pela entomologia forense em investigações de crimes contra a vida. Neste trabalho foi descrita a morfologia do sistema digestório de larvas e adultos de *O. discicolle*, contribuindo para a compreensão da digestão associada com a necrofagia. Nas larvas, o intestino anterior é curto e estreito, o médio é um tubo dilatado, alongado e liso exteriormente, enquanto o intestino posterior é estreito e longo, com pequenas projeções e uma porção dilatada na região terminal. As larvas dos três instares de desenvolvimento apresentam o intestino com as mesmas características, variando apenas no tamanho. O epitélio intestinal das larvas de segundo e terceiro instares se encontra vacuolizado nas regiões média e posterior, e no lúmen do intestino médio há uma alta atividade de secreção apócrina. Nos adultos, a anatomia e a histologia do sistema digestório de machos e fêmeas são semelhantes. O intestino anterior é curto e possui espículas na cutícula que reveste o epitélio achatado. O intestino médio é dilatado e com muitos cecos curtos que abrigam na porção terminal, células regenerativas que se diferenciam em células digestivas colunares em direção lúmen do órgão. O intestino posterior é longo e estreito, com região final dilatada, sendo o epitélio dobrado e revestido por cutícula fina. Nos testes histoquímicos, tanto em larvas quanto adultos, não foram identificados grânulos celulares de armazenamento de proteínas nas células epiteliais. As características do trato digestório de larvas e adultos de *O. discicolle* são semelhantes às daquelas de outros Coleoptera, independentemente do hábito alimentar, indicando um possível ancestral comum nesta ordem.

Palavras-chave: Histologia. Histoquímica. Entomologia Forense.

1. INTRODUÇÃO

Silphidae são besouros necrófagos com 13 gêneros, sendo *Oxelytrum* com distribuição geográfica ao longo do continente americano, especialmente nas Américas Central e do Sul (LIRA e VASCONCELOS, 2016; OLIVA, 2012; PECK e ANDERSON, 1985; URURAHY-RODRIGUES e colab., 2010). No Brasil está representado por três espécies incluindo *Oxelytrum discicolle* (Brullé, 1840) (LIRA e VASCONCELOS, 2016) que tem ciclo de vida de aproximadamente 40 dias passando por três instares larvais (VELÁSQUEZ e VILORIA, 2010). As larvas alimentam-se dos exsudatos liberados durante a decomposição de carcaças animais e os adultos, além de se alimentarem das carcaças, são predadores de larvas de Diptera, incluindo espécies que parasitam animais de importância econômica (LIRA e colab., 2017; LIRA e VASCONCELOS, 2016; PECK e ANDERSON, 1985).

O hábito necrófago e a ampla distribuição de *O. discicolle* são importantes no processo de reciclagem de nutrientes (NICHOLS e colab., 2008) e fazem desta espécie um potencial indicador forense da região Neotropical (LIRA e VASCONCELOS, 2016), tendo sido utilizado para determinar a estimativa de intervalo pós-morte (LIRA e colab., 2020).

De forma geral, o sistema digestório dos insetos é constituído de três regiões: intestinos anterior, médio e posterior, também denominadas estomodeu, mesêntero ou ventrículo e proctodeu, respectivamente, as quais são formadas por uma camada simples de células epiteliais sobre uma membrana basal e músculos estriados (CHAPMAN, 2013). Os intestinos anterior e posterior são de origem ectodérmica sendo revestido por uma intima cuticular (JARIAL & SCUDDER, 1970; DALLAI e colab., 1991; CACCIA e colab., 2019; HOLTOF e colab., 2019), enquanto o intestino médio é de origem endodérmica e, na maioria dos insetos, é revestido por uma matriz peritrófica (BILLINGSLEY & LEHANE, 1996; CACCIA e colab., 2019; HOLTOF e colab., 2019).

Nos insetos holometábolos, larvas e adultos possuem diferenças na morfologia do intestino, utilizam nichos e recursos alimentares distintos, e durante a metamorfose, o intestino é degradado por apoptose e reconstruído pela proliferação e diferenciação das células regenerativas. Essa renovação resulta em diferenças na morfologia do sistema digestório destas fases do desenvolvimento (CRUZ-LANDIM e COSTA-LEONARDO, 1996; HAKIM e colab., 2010; MARTINS e colab., 2006; NEVES e colab., 2003; WERNER e colab., 1991).

Em Coleoptera, o intestino anterior geralmente é reto e tubular, constituído de uma faringe curta, esôfago tubular estreito, papo e proventrículo (CHAPMAN, 2013; SNODGRASS, 1935). A cutícula que reveste o intestino anterior geralmente é bem desenvolvida na região do proventrículo (SNODGRASS, 1935), podendo ser coberta por espículas responsáveis pela ingestão, trituração e filtragem de partículas de alimento (CANDAN e colab., 2019; CHAPMAN, 2013). O intestino médio é mais dilatado podendo ter muitos cecos ao longo de diferentes regiões e uma matriz peritrófica, que envolve o alimento, sintetizada ao longo de todo o intestino médio (CHAPMAN, 2013; DE SOUSA e CONTE, 2013). O intestino posterior é dividido em piloro, íleo e reto e estas regiões se encontram revestidas por uma cutícula fina e permeável, sendo que os túbulos de Malpighi abrem-se na transição do intestino médio e posterior e juntamente com as papilas retais, participam da excreção e regulação osmótica (CANDAN e colab., 2019; CHAPMAN, 2013; SARWADE e BHAWANE, 2013).

Besouros necrófagos como os Silphidae possuem recurso alimentar escasso e necessitam de um maior aproveitamento do alimento através da digestão. Cada região do canal alimentar é compartimentalizada de forma específica para obter os nutrientes dos alimentos. *Nicrophorus vespilloides* (Herbst, 1783) (Coleoptera: Silphidae) possui canal alimentar dividido em intestino anterior curto e estreito, intestino médio volumoso e intestino posterior estreito e alongado, sendo que toda extensão do intestino médio apresenta cecos gástricos, que aumentam a área de digestão e absorção (VOGEL e colab., 2017). Além da compartimentalização há bactérias específicas associadas ao trato digestório que parecem auxiliar no processo de digestão (VOGEL e colab., 2017).

O conhecimento sobre o intestino dos Silphidae está, em sua maioria, relacionado com aspectos microbiológicos apontando a relação dos insetos com a microbiota residente no lúmen intestinal (SETIAWAN e colab., 2020; SOLTER e colab., 1989; WANG e ROZEN, 2017), bem como com a excreção de secreções intestinais como forma de defesa contra predadores (EISNER e MEINWALD, 1983). Porém, faltam informações relacionadas à morfologia do intestino, não havendo dados da organização das células ao longo do epitélio intestinal, que são importantes para entender o processo de digestão e renovação tecidual no intestino destes insetos necrófagos.

Conhecer o sistema digestório de *O. discicolle* é importante para entender características que possam estar relacionadas ao seu hábito alimentar, uma vez que estudos sobre a morfologia do sistema digestório de insetos necrófagos estão limitados a um besouro

da família Dermestidae (CALDEIRA E COLAB., 2007) e representantes de abelhas (SERRÃO & CRUZ-LANDIM, 1995a). Não há dados sobre a anatomia interna de *O. discicolle*, e estas informações podem ser úteis para entender a biologia desse besouro para o meio ambiente e para a entomologia forense. Além disso, as características do intestino permitem aprofundar o conhecimento das relações filogenéticas entre os grupos de insetos, onde famílias próximas tendem a ter a estrutura do intestino semelhante, independentemente do hábito alimentar (TERRA, 1990; DA FONSECA e colab., 2011; SANTOS e colab., 2017). Portanto, o objetivo deste trabalho foi descrever a morfologia do intestino de larvas e adultos de *O. discicolle*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta dos insetos

A coleta de *O. discicolle* foi realizada na unidade de conservação da Mata Atlântica Estação de Pesquisa, Treinamento e Educação Ambiental Mata do Paraíso em Viçosa, Minas Gerais, Brasil (20°48'S, 42°51'O). Os insetos foram atraídos por carcaças de porcos disponibilizadas em gaiolas, as larvas foram coletadas diretamente sobre as carcaças e os adultos foram capturados por meio de armadilhas do tipo *pitfall*. As armadilhas foram constituídas de potes plásticos de 1 L inseridos em tubos de PVC de 14 cm de diâmetro aterrados ao nível do solo, com uma cobertura de isopor fixada por palitos para proteção contra chuva e contra a fuga dos besouros capturados. As armadilhas foram inspecionadas a cada dois dias durante o período de decomposição até a esqueletização da carcaça por cerca de 10 dias. Os insetos coletados foram levados para o laboratório e dissecados. Para determinação dos instares larvais foram considerados o tamanho das larvas e a idade em dias. Larvas de primeiro instar foram processadas com cerca de dois dias de vida, larvas de segundo instar com quatro dias e larvas de terceiro instar com 10 dias de vida.

2.2 Anatomia

Previamente à dissecação, os besouros foram crioplanados a 4°C em geladeira por 10 min. Cinco machos, cinco fêmeas e três larvas de cada instar foram dissecados em NaCl

125 mM. Após a dissecação, os intestinos foram transferidos para solução fixadora Zamboni (STEFANINI e colab., 1967) por 24 h à 4°C e fotografados em estereomicroscópio Zeiss Discovery 2.0 acoplado com câmera Zeiss AxioCam MRc.

2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura

O intestino de dois besouros adultos foram lavados em tampão fosfato de sódio 0,15 M, pH 7.2 duas vezes por três min, desidratados em série crescente de etanol (70%, 80%, 90%, 95% e 99%) por 10 min em cada concentração, transferidos para hexametildisilazano por 15 min e secos em temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras foram fixadas em suportes de alumínio, cobertas com ouro (20 nm de espessura) e examinadas ao microscópio eletrônico de varredura LEO VP 1430 no Núcleo de Microscopia e Microanálise.

2.4 Histologia e Histoquímica

Após dissecados e fixados como descritos acima, os intestinos foram lavados em água destilada, três vezes por 5 min. Posteriormente foram desidratados em série crescente de etanol (70%, 80%, 90%, 95% e 99%) por 10 min em cada concentração, sendo imersos em etanol 99% por duas vezes. Após a desidratação o material foi transferido para solução de historesina Leica® (Código 10695-0003) e etanol absoluto 1:1 por 24 h. Posteriormente, as amostras foram transferidas para historesina pura por 24 h e posteriormente incluídas com a adição de catalisador (Código 10695-0021) na proporção 15:1, em temperatura ambiente. As amostras foram seccionadas com 2 µm de espessura em micrótomo rotativo. Cinco lâminas de cada indivíduo (adultos e larva de cada instar) foram coradas com hematoxilina por 10 min e eosina por 30 s. Outras cinco lâminas de cada foram submetidas ao teste de mercúrio bromofenol (Bancroft e Gamble, 2008) para detecção de proteínas totais. As lâminas foram imersas em mercúrio bromofenol por 2 h e 15 min, lavadas em ácido acético 0,5% por 10 min e posteriormente lavadas em água corrente (até atingirem a coloração azul). Outras cinco lâminas foram submetidas ao teste de PAS para detecção de polissacarídeos neutros (Bancroft e Gamble, 2008). As amostras foram mantidas em ácido periódico 0,4% por 30 min e lavadas em água destilada. Posteriormente foram imersas em reativo de Schiff (Bancroft e Gamble, 2008) por uma hora, em temperatura ambiente no escuro. Após essa etapa foram lavadas em água corrente e os núcleos contra corados com hematoxilina por 10 min. Todas as amostras

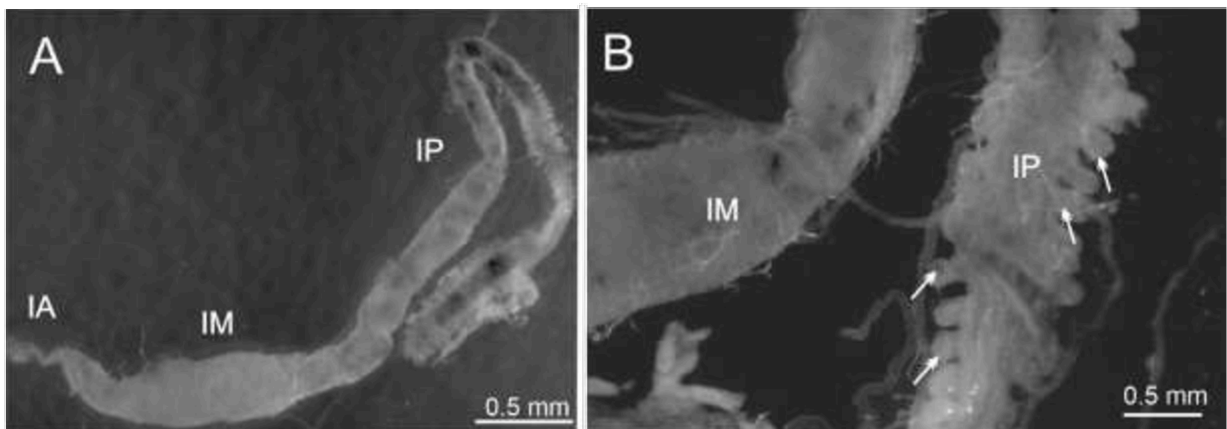
foram montadas com lamínulas e Entellan®, e fotografadas em microscópio Olympus® BX60 com câmera fotográfica acoplada.

3. RESULTADOS

3.1 Larvas

Quanto à anatomia, o intestino das larvas possui as mesmas características nos três instares, variando apenas no tamanho. O intestino anterior é um tubo curto e estreito, o médio é longo, dilatado que se estreita progressivamente até a região de transição com o posterior que é estreito, longo, com dobras na parede e uma pequena dilatação na porção terminal (Fig. 1 A e B).

Figura 1 - Anatomia do intestino das larvas de *Oxelytrum discicolle*. **A** Visão geral do intestino mostrando o intestino anterior **IA**, médio **IM** e posterior **IP**. **B** Detalhe do intestino posterior **IP** mostrando as dobras da parede **setas**.



O intestino da larva de primeiro instar, possui 7,12 mm de comprimento, da larva de segundo instar 29,80 mm e da de terceiro instar 32,25 mm. Durante a dissecação foi possível observar que em larvas recém-alimentadas o intestino se dilata bastante, com a capacidade de suportar grande quantidade de alimento.

Quanto a histologia, o epitélio intestinal é semelhante nos três instares. O intestino anterior possui epitélio colunar. As células possuem citoplasma mais claro na base e o epitélio é revestido por cutícula. Há presença de células musculares associadas a base (Fig. 2 A).

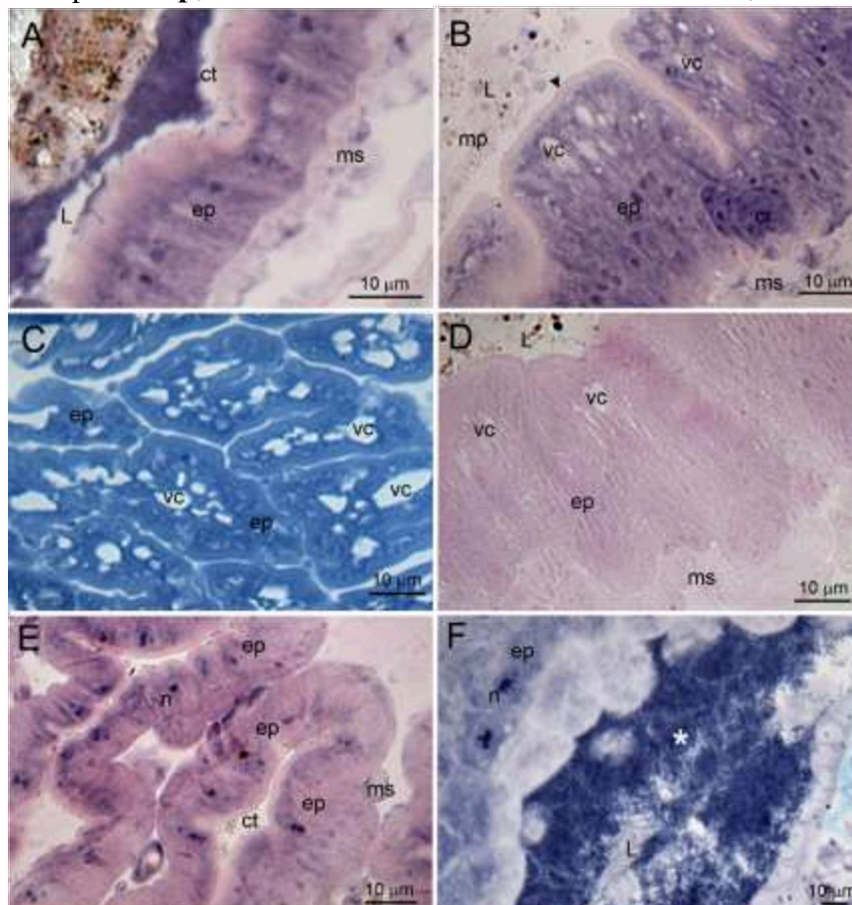
O intestino médio possui vilosidades com epitélio colunar com borda estriada evidente (Fig. 2 B). O citoplasma perinuclear das células digestivas é basófilo enquanto o apical e o

basal estão fracamente corado. O núcleo é rico em cromatina descondensada e com nucléolo evidente. Ao longo de todo intestino médio ocorrem criptas com células regenerativas (Fig. 2 B). Externamente ocorrem células musculares associadas. No lúmen, há matriz peritrófica fina que foi marcada nos testes histoquímicos (Fig. 2 B). A principal diferença entre os instares é que em larvas de segundo e terceiro instar há vacúolos no ápice das células digestivas e presença de secreção apócrina no lúmen. A vacuolização foi mais intensa nas larvas de terceiro instar. Os vacúolos não foram marcados pelos testes histoquímicos e a secreção foi positiva tanto para marcação com Mercúrio bromofenol quanto para PAS (Fig C e D).

No intestino posterior, o íleo possui parede com muitas dobras, com epitélio cúbico (Fig. 2 E). Há presença de células musculares associadas à base do epitélio (Fig. 2 E). O reto possui epitélio com células cúbicas, mas não há dobras. No lúmen dessa região há um aglomerado de corpos basófilos que provavelmente são bactérias (Fig 2 F). Nas duas porções do intestino posterior o núcleo das células se encontra mais compactado e há cutícula fina revestindo o epitélio.

Figura 2 - Secção do intestino das larvas de *Oxelytrum discicolle*. **A** Intestino anterior, mostrado epitélio cúbico **ep**, cutícula **ct**, lúmen **L** e células musculares associadas **ms**. **B** Intestino médio, com epitélio colunar **ep**, vacúolos **vc** e borda estriada **ponta de seta** no ápice do epitélio, membrana peritrófica **mp** no lúmen **L**, células regenerativas **cr** e células musculares **ms** associadas na base do epitélio. **C** Teste histoquímico com mercúrio bromofenol, negativo nos vacúolos **vc** no epitélio **ep**. **D** Teste histoquímico PAS negativo nos vacúolos **vc** no epitélio **ep**, células musculares associadas **ms**. **E** Íleo, com dobras no epitélio

ep,
núcleo
n, células
ms. **F**
cúbico
n, lúmen
basófilos



cutícula **ct**,
compactado
musculares
associadas
Reto, epitélio
ep, núcleo
compactado
L, corpos
*.

3.2 Adultos

O canal alimentar dos adultos é semelhante entre machos e fêmeas. O intestino anterior é curto dividido em esôfago curto e estreito e proventrículo curto e dilatado (Fig. 3 A e B), enquanto o intestino médio forma um tubo de maior comprimento e dilatado, com projeções ao longo de toda a extensão e a região final mais estreita (Fig. 3 A e B). O intestino posterior é longo e estreito, com íleo alongado, sinuoso e com superfície irregular e reto dilatado e (Fig. 3 A e C). As projeções do intestino médio correspondem a cecos gástricos que são curtos e ocorrem ao longo de todo o órgão (Fig. 4 A e 4 B). A superfície irregular do íleo corresponde a dobras da parede associada a músculos (Fig. 4 C e 4 D).

Figura 3 - Anatomia do intestino dos adultos de *Oxelytrum discicolle*. **A** Intestino anterior **IA**, intestino médio **IM** e intestino posterior **IP**. Íleo **il** e reto **re**. **B** Destaque para a região anterior com esôfago **es**, proventrículo **pr** e média com cecos **ce**. **C** Destaque na região posterior mostrando reto **re** dilatado.

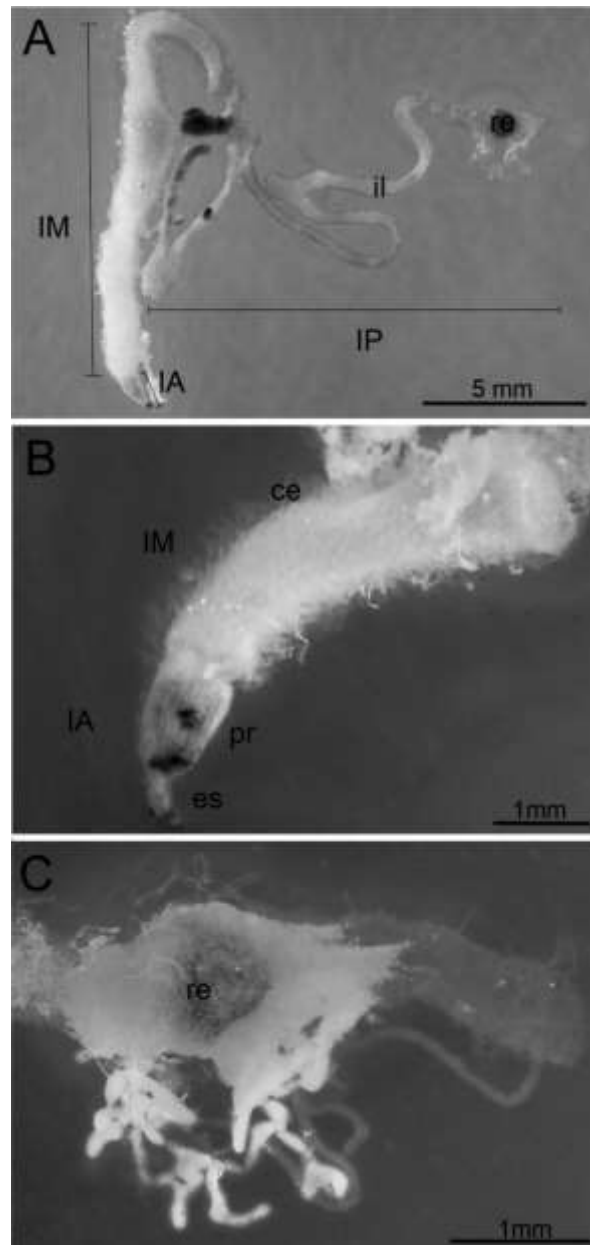
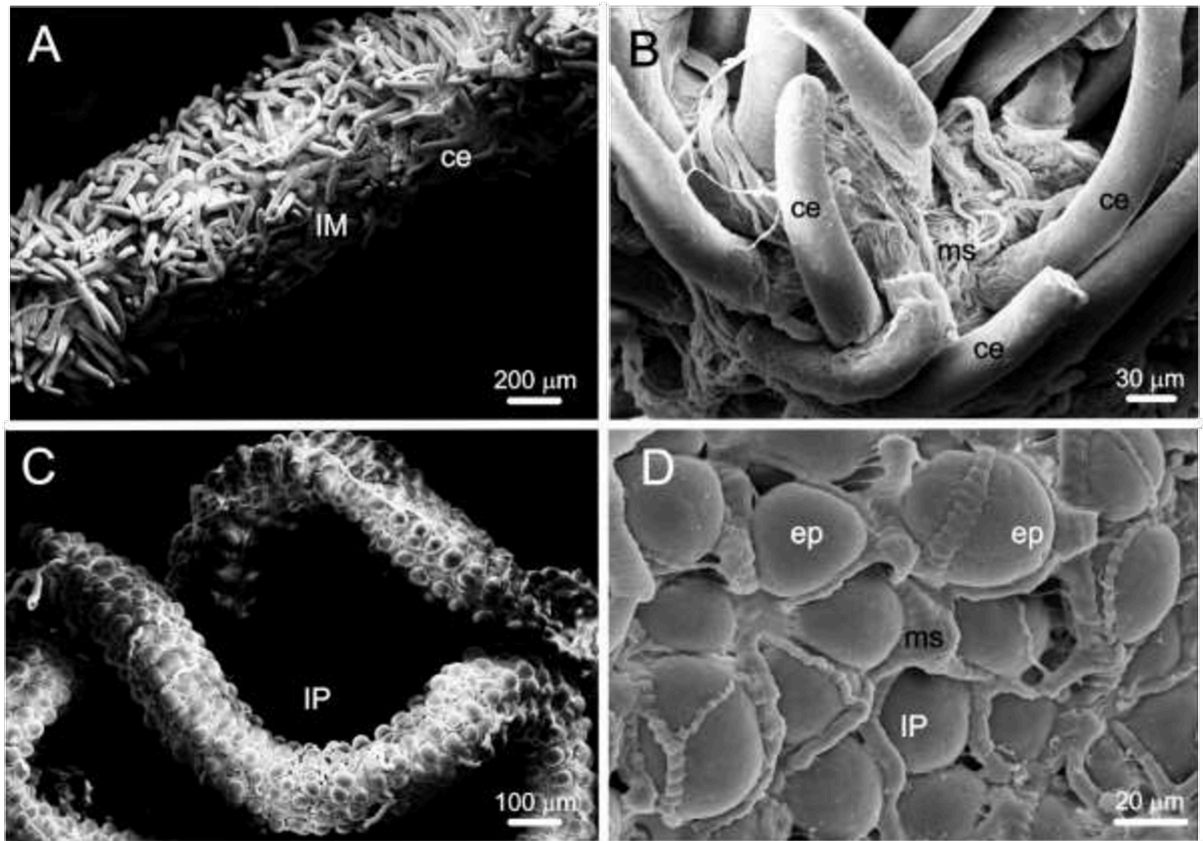


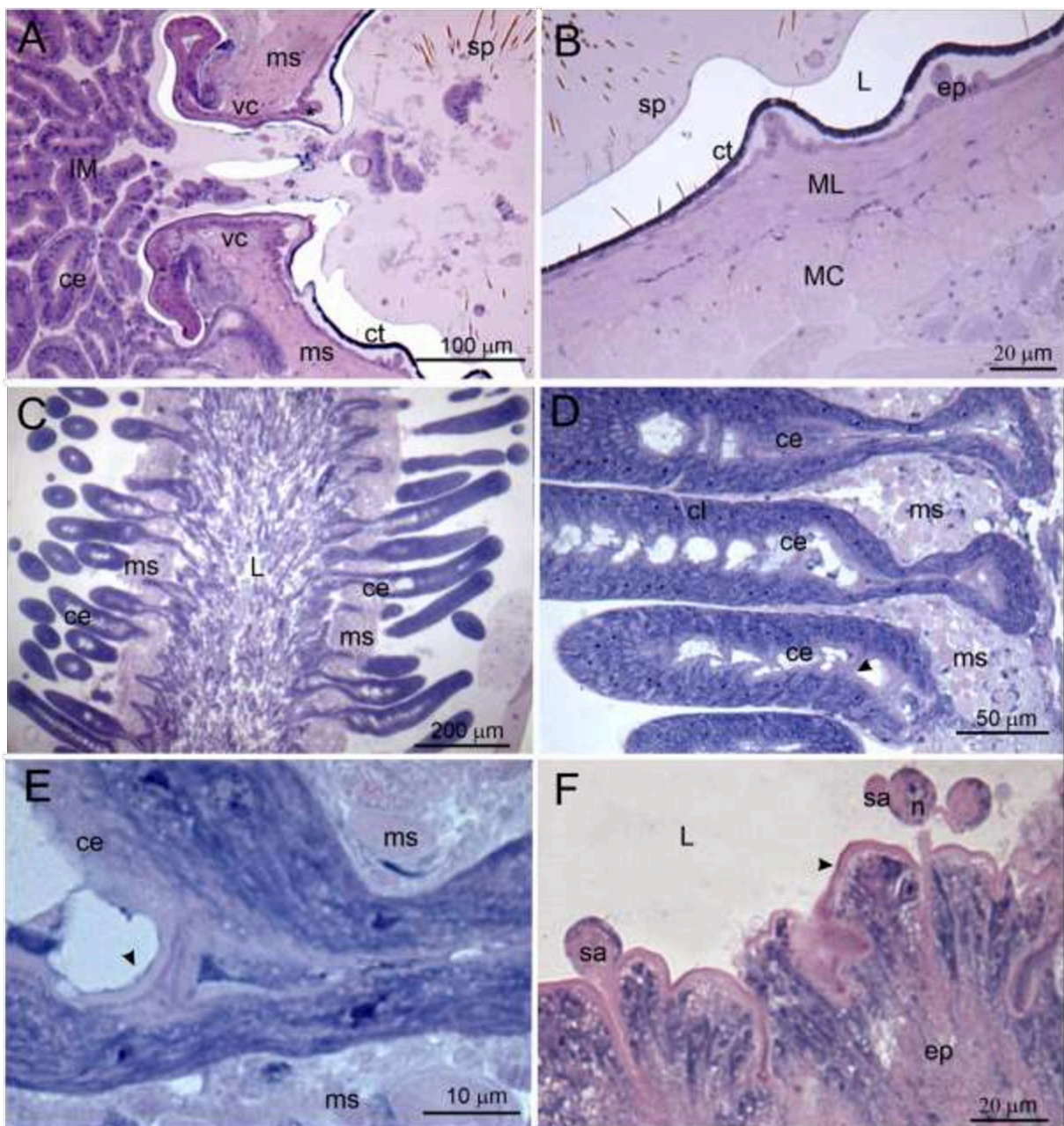
Figura 4 - Microscopia eletrônica de varredura do intestino dos adultos de *Oxelytrum discicolle*. **A** Intestino médio **IM**, com cecos gástricos curtos **ce**. **B** Detalhe dos cecos gástricos **ce** do intestino médio. **C** Intestino posterior **IP** com parede irregular. **D** Detalhe da parede da região do íleo no intestino posterior mostrando as dobras da parede **pa** associada a músculos **ms**.



Quanto à histologia, o esôfago possui epitélio simples achatado revestido por uma cutícula fina. O proventrículo é formado por um epitélio achatado revestido com cutícula com projeções em forma de espículas no lúmen (Fig. 5 A e B) e com camadas musculares circular e longitudinal bem desenvolvidas (Fig. 5 B). A válvula cárdica forma uma dobra do epitélio da região terminal do intestino anterior de transição do proventrículo projetando-se no lúmen do intestino médio (Fig. 5 A).

O intestino médio é dilatado e organizado em muitos cecos gástricos curtos e com lúmen estreito (Fig. 5 C). Os cecos possuem uma constrição na transição para parede do intestino médio onde ocorrem duas camadas de musculatura longitudinal externa e circular interna (Fig. 5 D, 5 E). No lúmen de todo o intestino médio foram observadas a eliminação secreção apócrina (Fig 5 F) e membrana peritrófica fina.

Figura 5 - Seção do intestino de adultos de *Oxelytrum discicolle*. **A** Região de transição entre o intestino anterior e médio mostrando espículas **sp** e cutícula **ct** no proventrículo, válvula cardíaca **vc** projetada no lúmen do intestino médio **IM** com cecos gástricos **ce**. **B** Destaque do proventrículo mostrando epitélio achatado **ep**, cutícula **ct** e musculatura longitudinal **ML** e circular **MC** associadas. **C** Intestino médio mostrando o lúmen **L** cecos gástricos **ce** e visão geral das camadas musculares **ms**. **D** Detalhe dos cecos gástricos **ce**, formados por células digestivas colunares **cl** e células musculares associadas **ms** na junção com a parede do intestino médio. **E** Detalhe da junção dos cecos gástricos com a parede o intestino com células musculares **ms**. Note borda estriada **ponta de seta** no epitélio do ceco gástrico. **F** Epitélio colunar **ep** do intestino médio com borda estriada **ponta de seta** e secreção apócrina **sa** para o lúmen **L**. Núcleo **n**.



Na porção terminal de cada ceco gástrico há um ninho de células regenerativas que são globulares, com núcleo compactado e com aspecto de células indiferenciadas (Fig. 6 A). Ao longo do epitélio do ceco gástrico em direção à parede do intestino médio, as células regenerativas estão em processo de diferenciação, modificando-se para inicialmente em células cúbicas com núcleo mais desenvolvido seguida por aspecto colunar com núcleo próximo a região basal e o desenvolvimento da borda estriada no ápice (Fig 6 A, 6 B). Estas células colunares digestivas dos cecos gástricos possuem núcleo com cromatina descondensada e nucléolos evidentes. Em seção transversal foi possível observar as células colunares liberando secreção apócrina fortemente basófila (Fig 6 C).

A transição do intestino médio para o posterior não possui cutícula na porção mais anterior e a cutícula surge no início da região posterior. O epitélio do intestino posterior é cúbico, revestido por cutícula espessa com algumas projeções em forma de espículas para o lúmen com músculos circulares desenvolvidos (Fig. 6 D). O íleo tem a parede com dobras, entre as quais ocorrem músculos circulares bem desenvolvidos (Fig. 6 E, 6 F). O epitélio é cúbico a acidófilo com núcleo compactado no posterior (Fig. 6 E). O reto é dilatado e formado por um epitélio colunar com citoplasma fracamente acidófilo e núcleo compactado (Fig. 6 F). O lúmen possui corpos basófilos que provavelmente são bactérias e revestido por uma cutícula fina (Fig. 6 F). Externamente há músculos circulares e longitudinais bem desenvolvidos (Fig. 6 F).

Nos testes histoquímicos não foi possível observar armazenamento de proteínas e carboidratos em grande quantidade. No intestino anterior, a cutícula foi positiva para proteína no proventrículo e esôfago (Fig. 7 A). No intestino médio, a secreção apócrina nos cecos gástricos foi positiva para proteínas (Fig. 7 B), enquanto a borda estriada foi positiva para o teste de PAS (Fig. 7 C). No intestino posterior, não houve reações positivas para proteínas e carboidratos no epitélio (Fig. 7 D).

Figura 6 - Seção dos cecos gástricos e do intestino posterior de adultos de *Oxelytrum discicolle*. **A** Porção terminal do ceco gástrico com células regenerativas **cr**. **B** Epitélio em processo de diferenciação com células cúbicas **cb** e colunares **cl**, com núcleo **n** e borda estriada apical evidente **ponta de seta**. **C** Seção transversal de um ceco gástrico mostrando secreção apócrina **seta** das células colunares **cl**. **D** Região de transição entre o intestino médio e o posterior mostrando cutícula **ct** com projeções, células musculares **ms** e epitélio cúbico **ep**. **E** Íleo com epitélio **ep** dobrado apresentando núcleo **n**, lúmen revestido por cutícula **ct** e células musculares **ms**, **F** Reto com epitélio **ep** colunar com núcleo **n** e lúmen com corpos basófilos *.

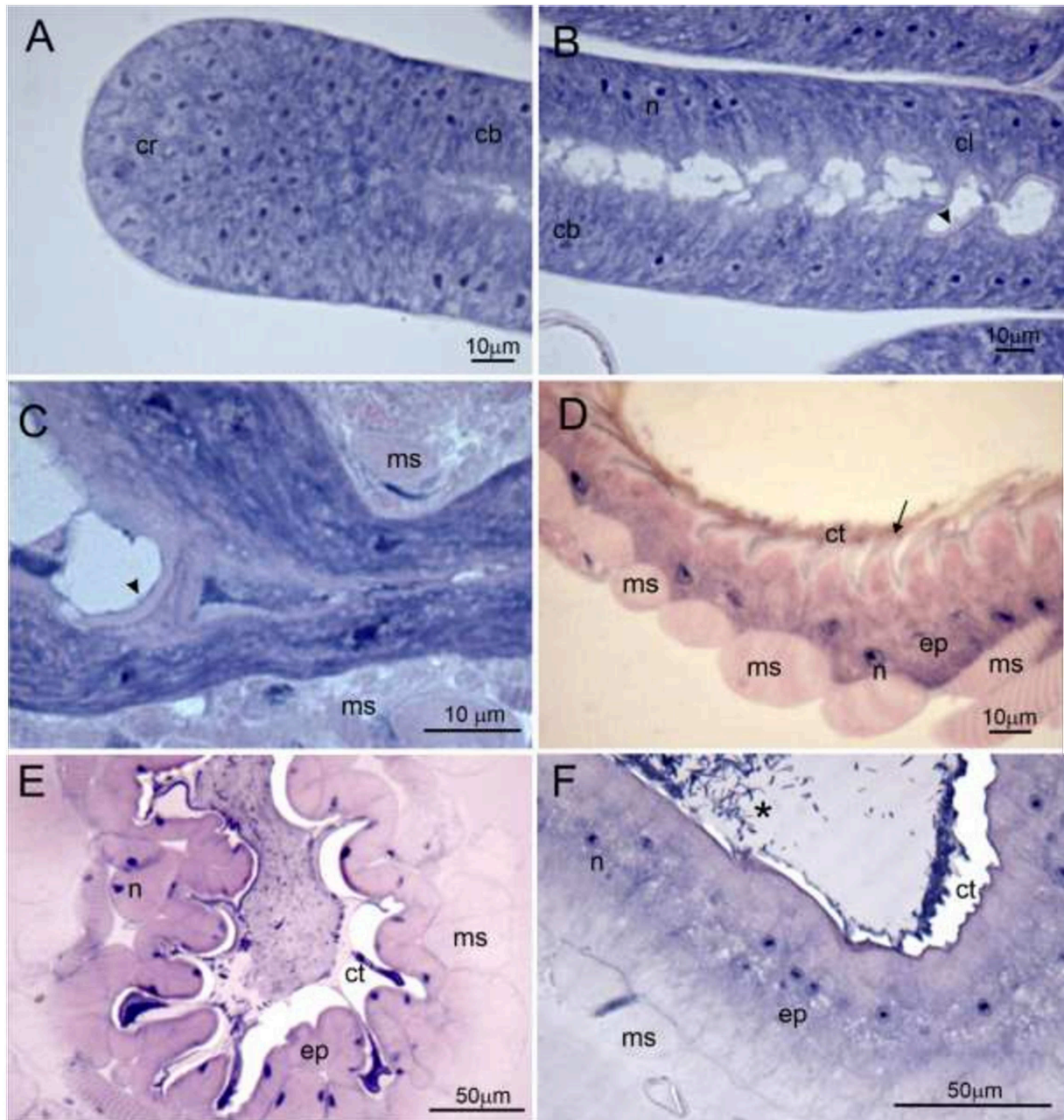
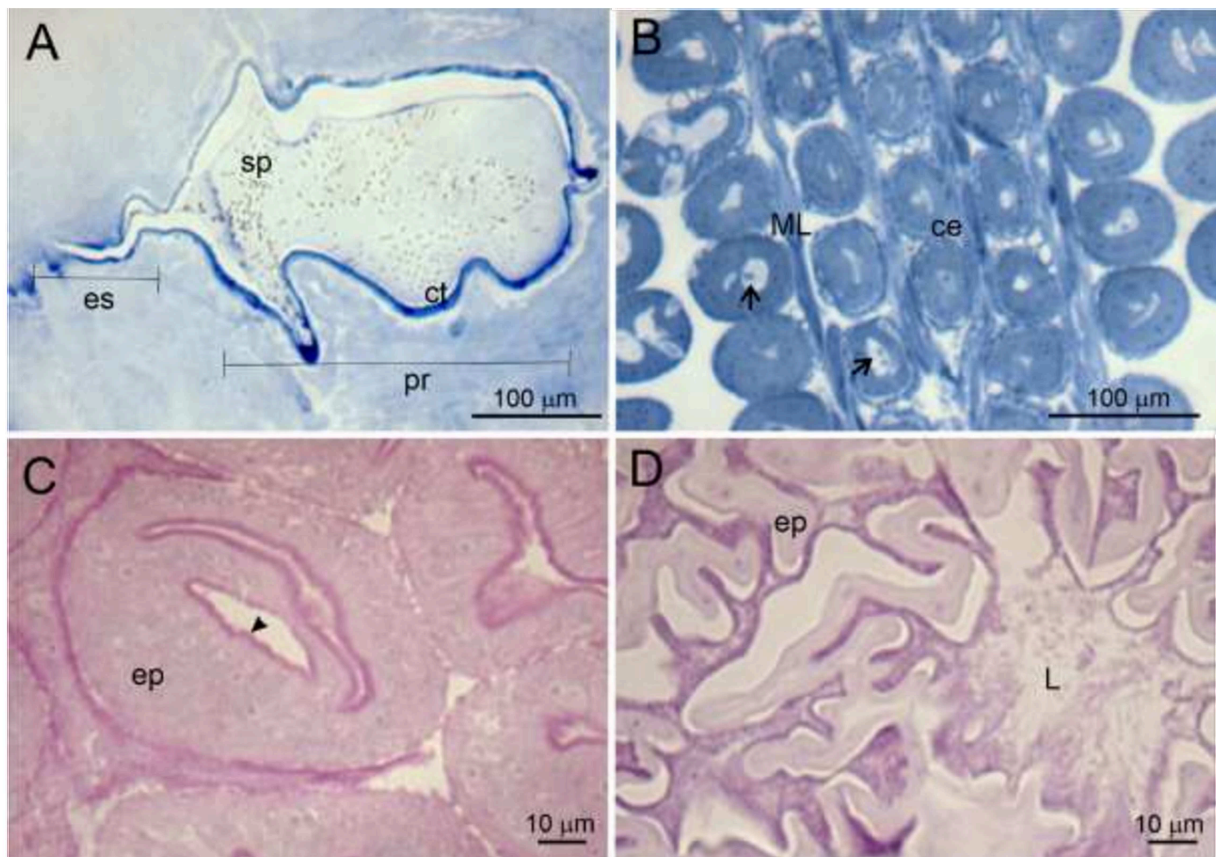


Figura 7 - Histoquímica do intestino de adultos de *Oxelytrum discicolle*. **A** Intestino anterior submetido ao teste de mercúrio bromofenol, destacando a cutícula **ct** presente no esôfago **es**, e proventrículo **pr** com espículas **sp**. **B** Intestino médio submetido ao teste de mercúrio bromofenol mostrando cecos gástricos **ce** liberando secreção apócrina positivas **seta** para proteínas. **C** Ceco gástrico submetido ao teste de PAS mostrando reação positiva na borda estriada **ponta da seta** do epitélio **ep**. **D** Intestino posterior submetido ao teste de PAS com epitélio negativo **ep** e lúmen **L** com bactérias positivas para carboidratos.



4. DISCUSSÃO

4.1 Larvas

A anatomia do intestino das larvas de *O. discicolle* é semelhante àquela das larvas do besouro necrófago *Dermestes maculatus* (Degeer, 1774) (Dermestidae) (CALDEIRA e colab., 2007) e do detritívoro e *P. barbatus* (Passalidae) (BAKER, 1968) com o intestino médio sendo a região mais desenvolvida que a anterior e que é curta e estreita, exceto na região do reto que é dilatado. Além disso, *P. barbatus* possui um camada externa de musculatura longitudinal revestindo o intestino e lacunas subepiteliais (BAKER, 1968) que não ocorrem em *O. discicolle*. As larvas de Scarabaeidae também apresentam alargamento de estruturas do intestino posterior, esta característica é considerada derivada em Coleoptera, estando associada à degradação de celulose (TERRA, W. R., 1990), como em *Oryctes nasicornis* (Linnaeus, 1758) (BAYON, 1981).

O epitélio cúbico do intestino anterior associado a tecido muscular em *O. discicolle* indica que sua função é predominantemente de passagem de alimento. A presença de células musculares no intestino anterior também ocorre em *P. barbatus* (BAKER, 1968). A presença de cutícula fina se deve ao fato desse órgão ser de origem ectodérmica, como ocorre em todos os insetos (Snodgrass 1935).

O intestino médio de *O. discicolle* é um órgão dilatado sem ocorrência de cecos gástricos, os quais tem sido reportados em larvas de Coleoptera representantes de Scarabaeidae (TERRA, W. R., 1990) e Crysomelidae (BILLINGSLEY e LEHANE, 1996).

O epitélio do intestino médio dos três instares larvais de *O. discicolle* tem como principal diferença a presença de vacúolos nas larvas de segundo e terceiro instar, com maior vacuolização nas larvas de terceiro instar. Esses vacúolos podem estar associados à processos de autofagia evolvindo no descarte de organelas que se exaurem devido à proximidade do final do desenvolvimento larval. Vacuolização celular associada a autofagia tem sido reportada em órgãos de larvas de insetos próximos ao período de pupação (DENTON e colab., 2009; FRANZETTI e colab., 2012; SANTOS, Douglas Elias e colab., 2015). Estes vacúolos não foram marcados nos testes histoquímicos para proteínas e carboidratos, indicando que nessa região não há armazenamento de glicoproteínas e açúcares. A vacuolização em maior grau nas larvas de segundo e terceiro instar pode indicar o início da

renovação tecidual que ocorrerá na metamorfose, na fase de pupa o intestino será degradado e regenerado como uma nova estrutura (CRUZ-LANDIM e COSTA-LEONARDO, 1996; HAKIM e colab., 2010; MARTINS e colab., 2006; NEVES e colab., 2003; WERNER e colab., 1991). Em *Sitophilus zeamais*, vacúolos semelhantes aos aqui observados também foram negativos para os testes de com mercúrio bromofenol e PAS (DE SOUSA e CONTE, 2013). Em *Lucilia sericata* (Meigen, 1826) (Diptera), as células estão vacuolizadas nos segmentos anterior e posterior e a vacuolização é mais intensa em larvas famintas, com presença de gordura nos vacúolos. Em larvas alimentadas a vacuolização é menor e há uma maior quantidade de enzimas digestivas. De acordo com o autor isso indica que as células possuem as funções de secreção e absorção (HOBSON, 1931) .

As células colunares do intestino médio com basofilia citoplasmática, núcleo com cromatina descondensada e nucléolo evidente, bem como a ocorrência de secreção apócrina são características de células envolvidas na secreção de enzimas digestivas (JORDÃO e colab., 1996; SERRÃO, José Eduardo e DA CRUZ-LANDIM, 1996), indicando essa função em *O. discicolle*. Essas células apresentam ainda borda estriada apical bem desenvolvida, característica que aumenta a superfície de absorção dos nutrientes (Serrão & Cruz-Landim 1996). A secreção apócrina tem sido atribuída também estar envolvida na liberação de proteínas responsáveis pela formação da matriz peritrófica (HEGEDUS e colab., 2019; MARQUES-SILVA e colab., 2005; TEIXEIRA e colab., 2015), estrutura que ocorre no intestino médio de *O. discicolle*. Assim, as células digestivas do intestino médio de larvas de *O. discicolle* podem ser consideradas como multifuncionais, atuando tanto na secreção de enzimas digestivas quanto na absorção de nutrientes, considerando que não há uma regionalização anatômica e histológica no intestino médio dessas larvas, o que é comumente encontrado nesse órgão de larvas de insetos holometábolos.

A ocorrência de muitas criptas abrigando células regenerativas organizadas em pilhas indica que epitélio do intestino médio pode ser constantemente renovado, principalmente neste besouro necrófago em que o alimento possui alta carga de microrganismos, que embora possam ser barrados pela matriz peritrófica (ERLANDSON e colab., 2019; MARQUES-SILVA e colab., 2005; OLIVEIRA e colab., 2019; TEIXEIRA e colab., 2015), podem indiretamente, pela produção de toxinas, afetar as células. A organização das células regenerativas em *O. discicolle* é similar à de *Dermestes maculatus* que possui as células regenerativas organizadas em ninhos também na base do epitélio (CALDEIRA e colab.,

2007), o fato das duas espécies pertencerem a mesma ordem e a mesma subordem (Polyphaga) pode explicar a semelhança (Vanin & Ide 2002).

O epitélio cúbico no intestino posterior em larvas de *O. discicolle* pode estar relacionado com a absorção de água e íons. Em *Cryomya megacephala* (Fabricius, 1794) (Diptera) o epitélio é formado por uma monocamada de células epiteliais cuboidais com grandes núcleos ovais e fibras musculares periféricas (BOONSRIWONG e colab., 2007).

A presença de bactérias intactas no intestino posterior em larvas indica que estas podem atuar como simbioses, seja no processo de digestão e absorção do alimento, seja na defesa contra a alta carga de microrganismos decompositores presentes no alimento, que podem comprometer a imunidade das larvas e adultos (VOGEL e colab., 2017).

Em comparação com espécies de Diptera necrófagas, o intestino de *O. discicolle* é diferente. *Lucilia sericata* tem intestino longo, estreito e enrolado, e as regiões anterior e posterior são mais dilatadas que a média (HOBSON, 1931). Larvas de *Cryomya megacephala* (Fabricius, 1794) tem o papo largo e dilatado, o qual não ocorre em *O. discicolle* e a válvula cardíaca com formato de bulbo sintetizando a matriz peritrófica no intestino médio que tem quatro cecos gástricos tubulares (BOONSRIWONG e colab., 2007, 2011). As diferenças entre a estrutura do intestino das larvas de Diptera e Coleoptera com o mesmo hábito alimentar podem estar relacionadas com a filogenia, como tem sido demonstrado por em outros insetos (SANTOS, Helen Pinto e colab., 2017; TERRA, Walter R. e FERREIRA, 2020). Porém alguma associação com o hábito alimentar não pode ser descartada pois as larvas de Diptera se alimentam predominantemente dos exsudatos liberados na decomposição (TERRA, W. R., 1990), enquanto *O. discicolle* além de consumir o tecido em decomposição da carcaça, são predadoras (LIRA e colab., 2017; LIRA e VASCONCELOS, 2016; PECK e ANDERSON, 1985).

4.2 Adultos

Em *O. discicolle* não há diferenças na anatomia do intestino de machos e fêmeas, assim como em *N. vespilloides*, que além da mesma anatomia, machos e fêmeas possuem a comunidade de bactérias residentes no intestino semelhante (VOGEL e colab., 2017).

A anatomia do intestino dos adultos de *O. discicolle* é semelhante à de algumas espécies de besouro Cleridae, que também possuem intestino anterior curto, médio mais

dilatado com projeções e posterior estreito e alongado (OPITZ, 2014). Da mesma forma, *Sitophilus zeamais* (Mots, 1855), Curculionidae fitófago, possui um intestino anterior curto e projeções ao longo de todo o intestino médio e posterior (DE SOUSA e CONTE, 2013). O intestino anterior curto também ocorre em outras espécies de Coleoptera. *Epiphaneus malachiticus* (Boheman 1842), Curculionidae fitófago apresenta essa característica (CANDAN e colab., 2019), além do Coccinellidae fitófago *Epilachna chrysomelina* (Fabricius, 1775) (ALDIGAIL e colab., 2013) e do Tenebrionidae praga de grãos estocados *Platynotus belli* (Fairmere, 1896) (SARWADE e BHAWANE, 2013). A região inicial do intestino curta indica que estas espécies não possuem a necessidade de armazenar grandes quantidades de alimento, sendo a redução ou perda do papo no intestino anterior uma característica derivada encontrada em Coleoptera (TERRA, W. R., 1990).

A musculatura desenvolvida associada ao epitélio e as espículas presentes na cutícula que reveste o lúmen do intestino anterior em *O. discicolle* tem sido associadas com a movimentação e na trituração do alimento (SNODGRASS, 1935). Essas características também ocorrem em outras espécies Coleoptera, como em *E. malachiticus* (CANDAN e colab., 2019) e no Buprestidae fitófago *Capnodis tenebrionis* (Linnaeus, 1758) (ÖZYURT KOÇAKOĞLU e colab., 2020).

A presença de cecos no intestino médio de *O. discicolle* também ocorre outras espécies de Coleoptera, com algumas variações. *Nicrophorus vespilloides* possui cecos semelhantes a bolsas ao longo da parede do intestino (VOGEL e colab., 2017). *Capnodis tenebrionis* possui cecos alongados também associados a criptas regenerativas semelhante a *O. discicolle*, porém não estão na parede do intestino, mas posicionados separadamente na porção inicial do intestino médio (ÖZYURT KOÇAKOĞLU e colab., 2020), enquanto em *O. discicolle* os cecos estão inseridos diretamente na parede do intestino médio. *Sitophilus zeamais* possui cecos na parede do intestino médio (DE SOUSA e CONTE, 2013) semelhantes aos encontrados em *O. discicolle*. *Calosoma calidum* (Fabricius, 1775), Carabidae necrófago e predador (CHEESEMAN e GILLOTT, 1987), *Passalus punctatostrigatus* (Percheron, 1835) Passalidae saproxilófaga (LIZBETH e colab., 2010), Curculionidae fitófagos *E. malachiticus* (Candan e colab., 2019) e *Eusomus ovulum* (Germar, 1824), (KOÇAKOĞLU e colab., 2020) também apresentam cecos com criptas, mas em conformações distintas em relação a *O. discicolle*. Essas diferenças podem ser explicadas pela relação de parentesco entre os grupos. Nos insetos, os grupos mais próximos tendem a ter características dos órgãos internos semelhantes (SNODGRASS, 1935).

O epitélio dos cecos gástricos presentes no intestino médio de *O. discicolle*, parece ter funções de renovação do epitélio, digestão do alimento e absorção dos nutrientes, pois, as células regenerativas na base renovam o tecido, as células colunares digestivas com núcleo descondensado e secreção apócrina podem sintetizar enzimas envolvidas da digestão e a presença de borda estriada permite uma maior área de absorção dos nutrientes, além disso, a musculatura associada ausente nas paredes e apenas na inserção dos cecos gástricos indica que elas não assumem função contrátil *S. zeamais* (DE SOUSA e CONTE, 2013) e *C. tenebrionis* (ÖZYURT KOÇAKOĞLU e colab., 2020) também não possuem musculatura nas paredes dos cecos.

No intestino posterior de *O. discicolle*, o epitélio dobrado na região do íleo aumenta a área de absorção de água e íons. Essa característica é comum em Coleoptera, ocorrendo também em *C. tenebrionis* (ÖZYURT KOÇAKOĞLU e colab., 2020) e *P. punctatostriatus* (LIZBETH e colab., 2010). A presença de projeções na cutícula do intestino posterior foi observada em *P. punctatostriatus* (LIZBETH e colab., 2010) assim como ocorre em *O. discicolle*. *Pentalobus barbatus* (Passalidae) apresenta epitélio dobrado e projeções na cutícula no íleo (BAKER, 1968) assim como *O. discicolle*. O reto dilatado encontrado em *O. discicolle* é uma característica que ocorre em outras espécies de Coleoptera, como representantes do Scarabaeidae e do gênero *Lepanus* (EBERT e colab., 2021). A presença de bactérias no lúmen do reto indica que estas possuem uma possível relação simbiote com os besouros, pois as bactérias auxiliam os insetos na digestão do alimento e no sistema de defesa imune (JING e colab., 2020). Em Silphidae, alguns trabalhos apontam que a microbiota associada ao intestino auxilia na imunidade destes insetos necrófagos, pelo fato de viverem em um ambiente com alta contaminação devido a matéria orgânica em decomposição (HEISE e colab., 2019; VOGEL e colab., 2017).

Os resultados obtidos contribuem para sustentar a hipótese que a anatomia e histologia do intestino dos insetos tende a variar mais de acordo com a história evolutiva e o parentesco de cada grupo do que com o hábito alimentar. O hábito alimentar não é a única pressão evolutiva que influencia na morfologia do intestino. Isso pode ser concluído a partir da comparação da estrutura do intestino em espécies de outras famílias de Coleoptera que possuem anatomia e histologia semelhantes, mas hábitos alimentares diferentes. Essa relação também ocorre em outros insetos como abelhas (SERRÃO & CRUZ-LANDIM 1995a, b) e Hemiptera (SANTOS e colab., 2017).

Esta é a primeira descrição anatômica e histológica de larvas e adultos de um representante de Silphidae. Os resultados acrescentam novas informações sobre a biologia desse importante grupo de insetos, além da sua distribuição (LIRA & VASCONCELOS 2016) e desenvolvimento (BONFANTI e colab., 2018) para a entomologia forense e para a ecologia, contribuindo para estudos futuros nessas áreas.

REFERÊNCIAS

- ALDIGAIL, Saleh A. e ALSAGGAFF, Ahmed I. e AL-AZAB, Abbas M. **Anatomical and histological study on the digestive canal of *Epilachna chrysomelina* (Coleoptera: Coccinellidae)**. Biosciences Biotechnology Research Asia, v. 10, n. 1, p. 183–192, 2013.
- BAKER, W. V. **The gross structure and histology of the adult and larval gut of *Pentalobus barbatus* (Coleoptera: Passalidae)**. The Canadian Entomologist, v. 100, n. 10, p. 1080–1090, 1968.
- BAYON, Colette. **Modifications ultrastructurales des parois végétales dans le tube digestif d'une larve xylophage *Oryctes nasicornis* (Coleoptera, Scarabaeidae): rôle des bactéries**. Canadian Journal of Zoology, v. 59, n. 10, p. 2020–2029, 1981.
- BILLINGSLEY, P. F. e LEHANE, M. J. **Structure and ultrastructure of the insect midgut**. Biology of the Insect Midgut, p. 3–30, 1996.
- BOONSRIWONG, Worachote e colab. **Alimentary canal of the blow fly *Chrysomya megacephala* (F.) (Diptera: Calliphoridae): An emphasis on dissection and morphometry**. Journal of Vector Ecology, v. 36, n. 1, p. 2–10, 2011.
- BOONSRIWONG, Worachote e colab. **Fine structure of the alimentary canal of the larval blow fly *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae)**. Parasitology Research, v. 100, n. 3, p. 561–574, 2007.
- CACCIA, Silvia e CASARTELLI, Morena e TETTAMANTI, Gianluca. **The amazing complexity of insect midgut cells: types, peculiarities, and functions**. Cell and Tissue Research, v. 377, n. 3, p. 505–525, 2019.
- CALDEIRA, Waldir e colab. **Digestive enzyme compartmentalization and recycling and sites of absorption and secretion along the midgut of *Dermestes maculatus* (Coleoptera) larvae**. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, v. 64, n. 1, p. 1–18, 2007.
- CANDAN, S. e ÖZYURT KOÇAKOĞLU, N. e ERBEY, M. **Morphology and histology of the alimentary canal of *Epiphaneus malachiticus* Boheman, 1842 (Coleoptera, Curculionidae)**. Entomological Review, v. 99, n. 3, p. 326–336, 2019.
- CHAPMAN, R. F. **The Insects: structure and function**. 5. ed. New York: Cambridge University Press, 2013.
- CHEESEMAN, M. T. e GILLOTT, C. **Organization of protein digestion in adult *Calosoma calidum* (Coleoptera: Carabidae)**. Journal of Insect Physiology, v. 33, n. 1, 1987.
- CRUZ-LANDIM, C. e COSTA-LEONARDO, A. M. **Ultrastructure of cell renewal in the midgut of termites**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 91, n. 1, p. 129–130, 1996.
- DALLAI, R. e BENE, G. Del e MARCHINI, D. **The ultrastructure of malpighian tubules and hindgut of *Frankinella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae)**. International Journal Insect Morphology & Embryology, v. 20, n. 4, p. 223–233, 1991.
- DENTON, Donna e colab. **Autophagy, Not Apoptosis, Is Essential for Midgut Cell Death in *Drosophila***. Current Biology, v. 19, n. 20, p. 1741–1746, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2009.08.042>>.
- EBERT, Kathryn M. e colab. **Hindgut microbiota reflects different digestive strategies in dung beetles (Coleoptera:Scarabeidae:Scarabaeinae)**. Applied and Environmental Microbiology, v. 87, n. 5, p. 1–17, 2021.
- EISNER, Thomas e MEINWALD, Jerrold. **Defensive spray mechanism of a silphid beetle (*Necrodes surinamensis*)**. Psyche, v. 87, n. 72, p. 357–367, 1983.
- ERLANDSON, Martin A. e TOPRAK, Umut e HEGEDUS, Dwayne D. **Role of the peritrophic matrix in insect-pathogen interactions**. Journal of Insect Physiology, v. 117, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2019.103894>>.

- DA FONSECA, Claudio Ruy Vasconcelos e BARBOSA, Márcio Luís Leitão e FERNANDEZ, Maria Fernanda Souza. **A hypothetical evolutionary history of passalid beetles narrated by the comparative anatomy of the hindgut (Coleoptera: Passalidae).** *Zootaxa*, n. 3012, p. 1–20, 2011.
- FRANZETTI, Eleonora e colab. **Autophagy precedes apoptosis during the remodeling of silkworm larval midgut.** *Apoptosis*, v. 17, n. 3, p. 305–324, 2012.
- HAKIM, Raziel S. e BALDWIN, Kate e SMAGGHE, Guy. **Regulation of midgut growth, development, and metamorphosis.** *Annual Review of Entomology*, v. 55, p. 593–608, 2010.
- HEGEDUS, Dwayne D. e TOPRAK, Umut e ERLANDSON, Martin. **Peritrophic matrix formation.** *Journal of Insect Physiology*, v. 117, n. June, p. 103898, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2019.103898>>.
- HEISE, Philipp e colab. **Antibiotic-producing beneficial bacteria in the gut of the burying beetle *Nicrophorus vespilloides*.** *Frontiers in Microbiology*, v. 10, n. MAY, p. 1–11, 2019.
- HOBSON, R. P. **Studies on the nutrition of blow-fly larvae.** *Journal of Evolutionary Biology*, v. VIII, n. 2, 1931.
- HOLTOF, Michiel e colab. **Extracellular nutrient digestion and absorption in the insect gut.** *Cell and Tissue Research*, v. 377, n. 3, p. 397–414, 2019.
- JARIAL, M. S. e SCUDDER, G. G.E. **The morphology and ultrastructure of the malpighian tubules and hindgut in *Cenocorixa bifida* (Hung.) (Hemiptera, Corixidae).** *Z. Morph. Tiere*, v. 68, n. 4, p. 269–299, 1970.
- JING, Tian Zhong e QI, Feng Hui e WANG, Zhi Ying. **Most dominant roles of insect gut bacteria: Digestion, detoxification, or essential nutrient provision?** *Microbiome*, v. 8, n. 1, p. 1–20, 2020.
- JORDÃO, Beatriz P. e colab. **An immunocytochemical investigation of trypsin secretion in the midgut of the stablefly, *Stomoxys calcitrans*.** *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 26, n. 5, p. 445–453, 1996.
- KOÇAKOĞLU, Nurcan Özyurt e CANDAN, Selami e ERBEY, Mahmut. **Structure of the mouthparts and alimentary canal of *Eusomus ovulum* Germar, 1824 (Coleoptera: Curculionidae).** *Revista Brasileira de Entomologia*, v. 64, n. 3, p. 1–12, 2020.
- LIRA, Luiz Antonio e colab. **The carrion beetle *Oxelytrum discicolle* (Coleoptera: Silphidae) and the estimative of the minimum post-mortem interval in a forensic case in Brasília, Brazil.** *Revista Brasileira de Entomologia*, v. 64, n. 1, 2020.
- LIRA, Luiz Antonio e HARTEERREITEN-SOUZA, Érica Sevilha e VASCONCELOS, Simão Dias. **A short-term study on bait attractiveness to the forensically relevant species *Oxelytrum discicolle* (Brullé, 1840) (Coleoptera: Silphidae).** *Entomological News*, v. 126, n. 5, p. 424–427, 2017.
- LIRA, Luiz Antonio e VASCONCELOS, Simão Dias. **New record and update on the distribution *Oxelytrum discicolle* (Brullé, 1840) (Coleoptera: Silphidae) in South America.** *The Coleopterists Bulletin*, v. 70, n. 2, p. 399–402, 2016.
- LIZBETH, González-Gómez e VILLEDA-CALEJAS, María del Pilar e ESCORCIA, Héctor Barrera. **Análisis histológico del tubo digestivo de *Passalus (Pertinax) punctatostriatus* Percheron, 1835 (Coleoptera, Passalidae).** *Biocyt*, v. 3, n. 10, p. 135–144, 2010.
- MARQUES-SILVA, Solange e SERRÃO, José Eduardo e MEZÊNCIO, José Mario S. **Peritrophic membrane protein in the larval stingless bee *Melipona quadrifasciata anthidioides*: Immunolocalization of secretory sites.** *Acta Histochemica*, v. 107, n. 1, p. 23–30, 2005.
- MARTINS, Gustavo Ferreira e colab. **The regenerative cells during the metamorphosis in the midgut of bees.** *Micron*, v. 37, n. 2, p. 161–168, 2006.
- NEVES, Clóvis Andrade e DE BRITO GITIRANA, Lycia e SERRÃO, José Eduardo. **Ultrastructural study of the metamorphosis in the midgut of *Melipona quadrifasciata***

- anthidioides (Apidae, Meliponini) worker.** *Sociobiology*, v. 41, n. 2, p. 443–459, 2003.
- NICHOLS, E. e colab. **Ecological functions and ecosystem services provided by Scarabaeinae dung beetles.** *Biological Conservation*, v. 141, n. 6, p. 1461–1474, 2008.
- OLIVA, Adriana. **A new species of *Oxelytrum gistel* (Coleoptera, Silphidae) from southern Argentina, with a key to the species of the genus.** *ZooKeys*, v. 203, p. 1–14, 2012.
- OLIVEIRA, André Henrique e colab. **A peritrophin mediates the peritrophic matrix permeability in the workers of the bees *Melipona quadrifasciata* and *Apis mellifera*.** *Arthropod Structure and Development*, v. 53, p. 1–9, 2019.
- OPITZ, Westib. **Morphologic studies of the alimentary canal and internal reproductive organs of the Chaetosomatidae and the Cleridae (Coleoptera: Cleroidea) with comparative morphology and taxonomic analyses.** *Insecta Mundi*, v. 2014, n. 0337–0344, 2014.
- ÖZYURT KOÇAKOĞLU, Nurcan e CANDAN, Selami e ÇAĞLAR, Üzeyir. **Histomorphology of the Adult Digestive Tract of *Capnodis tenebrionis* (L. 1758) (Coleoptera, Buprestidae).** *Microscopy and Microanalysis*, v. 26, n. 6, p. 1245–1254, 2020.
- PECK, Stewart B. **Review of the carrion beetles of Australia and New Guinea (Coleoptera: Silphidae).** *Australian Journal of Entomology*, v. 40, n. 2, p. 93–101, 2001.
- PECK, Stewart B. e ANDERSON, R. S. **Taxonomy, phylogeny and biogeography of the carrion beetles of Latin America (Coleoptera: Silphidae).** *Quaestiones Entomologicae*, v. 21, n. 3, p. 247–317, 1985.
- SANTOS, D. E. e colab. **Endocrine cells in the midgut of bees (Hymenoptera: Apoidea) with different levels of sociability.** *Journal of Apicultural Research*, v. 54, n. 4, p. 394–398, 2015.
- SANTOS, Douglas Elias e colab. ***Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae) fat body persists through metamorphosis with a few apoptotic cells and an increased autophagy.** *Protoplasma*, v. 252, n. 2, p. 619–627, 2015.
- SANTOS, Helen Pinto e colab. **Ultrastructure of the midgut in Heteroptera (Hemiptera) with different feeding habits.** *Protoplasma*, v. 254, n. 4, p. 1743–1753, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00709-016-1051-2>>.
- SARWADE, A B e BHAWANE, G P. **Anatomical and histological structure of digestive tract of adult *Platynotus belli* F. (Coleoptera : Tenebrionidae).** *Biological Forum-An International Journal*, v. 5, n. 2, p. 47–55, 2013.
- SERRÃO, Jose Eduardo e DA CRUZ-LANDIM, Carminda. **Gut structures in adult workers of necrophorous neotropical stingless bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponinae).** *Entomologia Generalis*, v. 19, n. 4, p. 261–265, 1995a.
- SERRÃO, Jose Eduardo e DA CRUZ-LANDIM, Carminda. **Scanning electronic microscopy of the proventriculus in stingless bees (Apidae: Meliponinae) with a comparison of necrophagous and feeding pollen workers.** *Naturalia*, v. 20, p. 207–212, 1995b.
- SERRÃO, José Eduardo e DA CRUZ-LANDIM, Carminda. **Ultrastructure of digestive cells in stingless bees of various ages (hymenoptera, apidae, meliponinae).** *Cytobios*, v. 1996, n. 354, p. 161–171, 1996.
- SETIAWAN, Ruby e colab. **Comparison of gut microbiome from Sulawesi carrion and burying beetles (Coleoptera: Silphidae) through metagenomic analysis of 16S rRNA gene.** *BIO Web of Conferences*, v. 19, n. 00015, 2020.
- SNODGRASS, R E. **Insect morphology.** 1. ed. New York: McGraw-Hill Book Company, 1935.
- SOLTER, L. F. e LUSTIGMAN, B. e SHUBECK, P. **Survey of medically important true bacteria found associated with carrion beetles (Coleoptera: Silphidae).** *Journal of medical entomology*, v. 26, n. 4, p. 354–359, 1989.

- STEFANINI, M., MARTINO, C. & ZAMBONI, L. **Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy.** *Nature* 216, 173-174, 1967.
- DE SOUSA, Géssica e CONTE, Helio. **Midgut morphophysiology in *Sitophilus zeamais* Motschulsky, 1855 (Coleoptera: Curculionidae).** *Micron*, v. 51, p. 1–8, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.micron.2013.06.001>>.
- TEIXEIRA, Aparecida das Dores e colab. **Peritrophic membrane origin in adult bees (Hymenoptera): Immunolocalization.** *Micron*, v. 68, p. 91–97, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.micron.2014.09.009>>.
- TERRA, W. R. **Evolution of digestive systems of insects.** *Annual review of entomology*. Vol. 35, p. 181–200, 1990.
- TERRA, Walter R. e FERREIRA, Clelia. **Evolutionary trends of digestion and absorption in the major insect orders.** *Arthropod Structure and Development*, v. 56, p. 100931, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.asd.2020.100931>>.
- URURAHY-RODRIGUES, Alexandre e colab. **Association of *Oxelytrum cayennense* (Silphidae, Coleoptera) with pig carcasses (*Sus scrofa*, Suidae) in terra firme areas in Manaus, Amazonas, Brazil.** *EntomoBrasilis*, v. 3, n. 2, p. 45–48, 2010.
- VANIN, S. A., & IDE, S. **Classificação comentada de Coleoptera.** *Red Iberoamericana de Biogeografia y Entomologia Sistemática*, 2, 193–205, 2002.
- VELÁSQUEZ, Yelitza e VILORIA, Ángel L. **Instar determination of the neotropical beetle *Oxelytrum discicolle* (Coleoptera: Silphidae).** *Journal of Medical Entomology*, v. 47, n. 5, p. 723–726, 2010.
- VOGEL, Heiko e colab. **The digestive and defensive basis of carcass utilization by the burying beetle and its microbiota.** *Nature Communications*, v. 8, n. May, p. 1–15, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/ncomms15186>>.
- WANG, Yin e ROZEN, Daniel E. **Gut microbiota colonization and *Nicrophorus vespilloides* throughout development.** *Applied and Environmental Microbiology*, v. 83, n. 9, p. 1–13, 2017.
- WERNER, Kolpona e MOUTAIROU, Kabirou e WERNER, Gerhard. **Formation and structure of the surface coat in the midgut of a waterstrider, *Gerris najas* deg. (Heteroptera : Gerridae).** *International Journal of Insect Morphology and Embryology*, v. 20, n. 1–2, p. 69–77, 1991.

CAPÍTULO 2

**Recuperação de DNA exógeno do conteúdo intestinal de larvas e adultos do besouro
necrófago *Oxelytrum discicolle* (Brullé, 1840) (Silphidae)**

RESUMO

Na investigação dos crimes contra a vida, a identificação da vítima e o autor por métodos convencionais de identificação pode não ser suficiente. Nesse caso, existe a possibilidade de recuperação do DNA da vítima no conteúdo intestinal dos insetos necrófagos que se alimentam do cadáver. *Oxelytrum discicolle* (Brullé, 1840) (Coleoptera: Silphidae) é uma espécie necrófaga que possui características favoráveis para possibilitar a recuperação do DNA em seu conteúdo intestinal. O objetivo deste trabalho foi testar a possibilidade de extração e identificação de DNA exógeno (proveniente da alimentação) presente no sistema digestório de larvas e adultos de *O. discicolle* para fins de potencial utilização desta espécie na área forense. Larvas e adultos foram dissecados e processados de duas formas: (i) o intestino processado inteiro para extração do DNA; e (ii) o conteúdo intestinal retirado e inserido na solução de lise para extração. Também foi testada a quantidade mínima necessária de amostras para obter o DNA. As taxas de recuperação foram de 33,3% em larvas e de 25% em adultos. Em comparação com Diptera, as taxas foram menores, devido às diferentes características do intestino de Diptera e Coleoptera. Essa diferença não descarta a utilização de *O. discicolle*, mas determina que essa espécie é uma potencial fonte de DNA exógeno quando encontradas em local de crime. O processamento do intestino inteiro e do conteúdo intestinal separadamente não influenciaram na taxa de detecção. Foi possível recuperar o DNA do intestino inteiro armazenado em etanol absoluto a -20 °C em até 11 dias após a dissecação, o que favorece as investigações, já que os vestígios podem ficar armazenados por vários dias nos institutos de criminalística para processamento posterior. Os resultados mostram que *O. discicolle* possui potencial para recuperação de DNA exógeno podendo ser utilizado em investigações criminais.

Palavras-chave: Entomologia forense. Entomogenética. Intestino.

1. INTRODUÇÃO

Na investigação dos crimes contra a vida, é fundamental identificar a vítima e o autor. Para realizar essa identificação há métodos convencionais como a papiloscopia, comparação da arcada dentária e análise de DNA coletando amostras diretamente do corpo. Porém, há situações em que o corpo da vítima pode ter sido retirado do local (MOHAMMAD e colab., 2020), estar em decomposição avançada (NJAU e colab., 2016) ou, ainda, carbonizado (CHÁVEZ-BRIONES e colab., 2013). Nesses casos, a identificação é mais difícil e exige técnicas específicas para tal finalidade (STAITI e colab., 2004; VINUEZA-ESPINOSA e colab., 2020).

Os insetos que colonizam o corpo da vítima se alimentam dos tecidos em decomposição e se desenvolvem no mesmo. Os adultos ovipositam no cadáver e as larvas crescem nesse mesmo local. Geralmente esses insetos necrófagos colonizadores são usados para determinar o tempo de morte da vítima (CATTS e GOFF, 1992), e também podem auxiliar na identificação do corpo em casos atípicos como os citados no parágrafo anterior. Nesses casos, existe a possibilidade de recuperar o DNA do cadáver no intestino dos insetos encontrados no local do crime, preferencialmente aqueles que tenham se desenvolvido no cadáver e se alimentado do mesmo (DURDLE, 2019).

A maioria dos estudos de detecção de DNA no intestino foi realizada com representantes de Diptera. Larvas de terceiro instar de *Megaselia scalaris* (Loew, 1866) (Diptera: Phoridae) alimentadas com carne suína tiveram o DNA do suíno detectado nas amostras do conteúdo intestinal larval, com uma boa taxa de recuperação (MUKHERJEE e colab., 2019). Larvas de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819) (Diptera: Calliphoridae) alimentadas com sêmen humano tiveram o DNA humano detectado em amostras da região anterior do intestino (CHAMOUN e colab., 2019, 2020). Larvas de *C. albiceps* (Diptera: Calliphoridae) e *Musca domestica* (Linnaeus, 1758) (Diptera: Muscidae) alimentadas com fígado de roedores tiveram o DNA detectado no intestino anterior, com melhores resultados em larvas de terceiro instar (MOHAMMAD e colab., 2020).

Coleoptera é a segunda ordem de maior importância forense. No entanto, apenas um trabalho foi feito para detectar DNA no intestino de besouro. Larvas de *Omosita* spp. (Nitidulidae) foram coletadas em ossos humanos e, através de técnica de marcação do DNA mitocondrial, foi obtida uma mesma sequência correspondente aos restos mortais (DIZINNO e colab., 2002).

Além das moscas e besouro necrófagos, a recuperação de DNA no conteúdo intestinal tem sido reportado em outros insetos, como mosquitos (ANSELL e colab., 2000; CHOW-SHAFFER e colab., 2000; CURIC e colab., 2014; KREIKE e KAMPFER, 1999; VIEIRA e colab., 2017), piolhos (DAVEY e colab., 2007; LORD e colab., 1998; MUMCUOGLU e colab., 2009) e percevejos hematófagos (SCHAL e colab., 2018). Nestes casos, a evidência entomológica pode identificar uma vítima de sequestro ou uma vítima fatal, cujo corpo não se encontra mais no local, bem como identificar os autores destes crimes.

Além dos testes utilizando o conteúdo intestinal dos insetos, foram feitos experimentos de recuperação de DNA com outros tipos de amostras, com boas taxas de detecção: pupários vazios de *Lucilia sericata* (Meigen, 1826) (Diptera: Calliphoridae) (MARCHETTI e colab., 2013) e artefatos provenientes da regurgitação e excreção de *Lucilia cuprina* (Wiedemann, 1830) (Diptera: Calliphoridae) (DURDLE e colab., 2009, 2013).

A eficácia na recuperação do DNA pode variar de acordo com alguns aspectos. Se os insetos se alimentarem de outros tipos de alimento após se alimentarem do cadáver, a recuperação do DNA humano é menor (NJAU e colab., 2016). O instar larval da espécie, o intervalo de tempo decorrido após a alimentação e a forma de armazenamento das amostras após a coleta também interferem na taxa de detecção do DNA (DURDLE, 2019).

Nos institutos de criminalística brasileiros, o material fonte de DNA coletado em local de crime é transportado para o laboratório e entra em uma fila de espera para ser analisado. Isso pode ocorrer devido à falta de estrutura ou até mesmo pela alta demanda de laudos periciais a serem confeccionados. Para isso deve ser estabelecido um protocolo de coleta e armazenamento das amostras entomológicas para que o DNA permaneça viável até sua análise. Neste sentido, o DNA permanece viável no intestino dos insetos por meses se armazenado da forma correta, gerando perfis genéticos íntegros e confiáveis (DURDLE, 2019).

Oxelytrum discicolle (Brullé, 1840) (Coleoptera: Silphidae) é uma espécie de hábito necrófago distribuída ao longo do Continente Americano nas regiões Central e Sul. Há registros de *O. discicolle* nos biomas Mata Atlântica (FERREIRA e colab., 2006) e Cerrado (LIRA e VASCONCELOS, 2016) e está presente em todas as fases de decomposição das carcaças (LIRA e colab., 2019). A ampla distribuição de *O. discicolle* e seu hábito necrófago são características que a tornam objeto de estudo da entomologia forense (CATTS e GOFF, 1992; KEH, 1985; LIRA e colab., 2020) e também da ecologia, por ter papel essencial na ciclagem de nutrientes e fertilização do solo através da bioturbação (NICHOLS e colab., 2008).

Oxelytrum discicolle apresenta características favoráveis para ser utilizado com a finalidade de recuperar o DNA humano, seja para identificação da vítima ou do autor do crime. As larvas se desenvolvem no cadáver e permanecem até o último estágio da decomposição (i.e. esqueletização), podendo ser um importante reservatório de material genético. Talvez mais eficaz do que algumas espécies de Diptera, como *Lucilia cuprina* (Calliphoridae), que em situações de oferta de outros recursos alimentares, tem menor preferência por fluidos humanos (DURDLE e colab., 2016). Este besouro é capaz de detectar o cadáver com rapidez, ainda nos estágios iniciais de decomposição, e produz grande quantidade de ovos, colonizando a carcaça com abundância de larvas que podem ser identificadas com maior facilidade em campo se comparados às espécies de Diptera (LIRA e colab., 2019). Estas propriedades possibilitam a coleta de quantidade suficiente de amostras para a recuperação do DNA. Além disso, larvas de *O. discicolle* foram utilizadas em caso real, na determinação do intervalo pós-morte mínimo onde o corpo da vítima foi encontrado em avançado estágio de decomposição (LIRA e colab., 2020), porém há apenas um trabalho testando a detecção de DNA humano em larvas de Coleoptera (DIZINNO e colab., 2002) e não há trabalhos testando a possibilidade de detecção de DNA no conteúdo intestinal de larvas e adultos de *O. discicolle*.

O objetivo foi verificar se é possível extrair e identificar o DNA exógeno (proveniente da alimentação) presente no sistema digestório de larvas e adultos de *O. discicolle* para fins de potencial utilização desta espécie na área forense. Para tanto, foi comparada a qualidade do DNA obtido e a taxa de detecção molecular do alimento nos três instares larvais e adultos a partir de dois métodos de preparação das amostras (intestino inteiro e conteúdo intestinal isolado) usando kits de extração e PCR convencionais (não-forenses).

2. MATERIAL E MÉTODOS

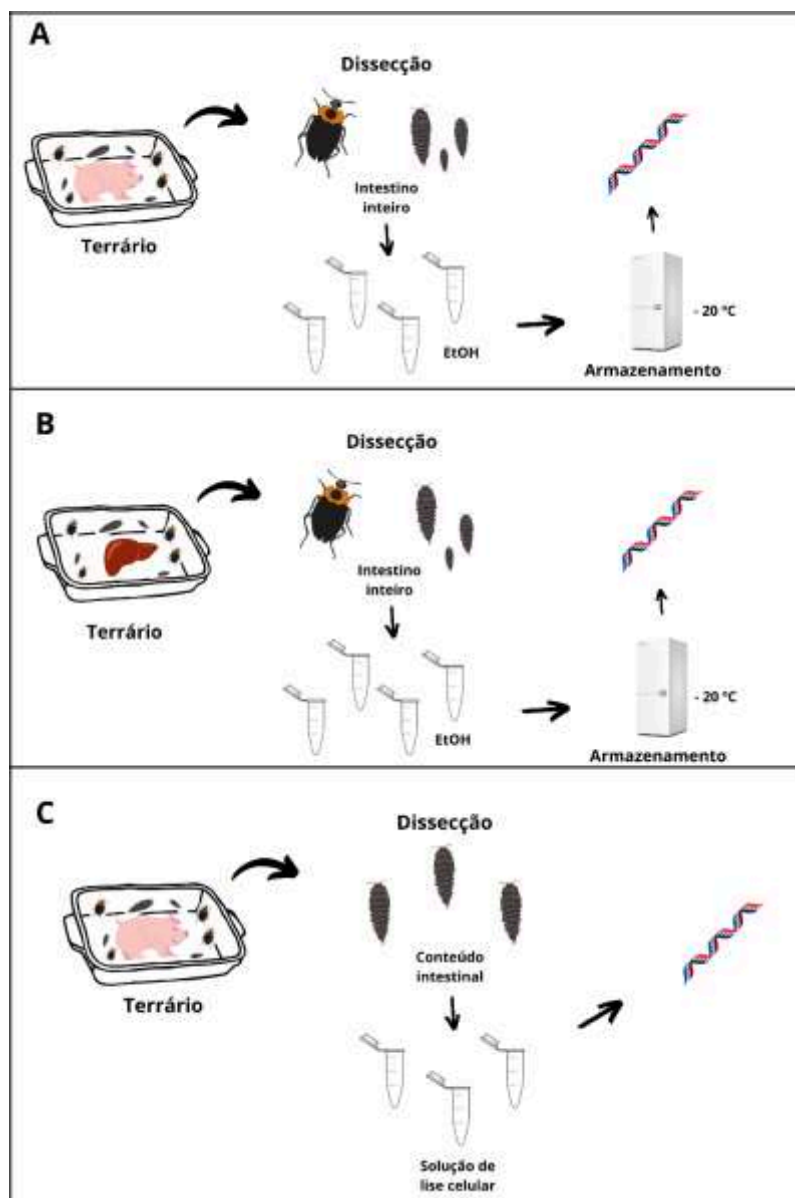
2.1 Coleta dos insetos e delineamento experimental

A coleta foi realizada de acordo com a metodologia descrita no capítulo 1. Após a coleta, os insetos foram mantidos em terrários redondos ($\emptyset = 14$ cm, vol. = 1 L). Os terrários foram montados com uma camada de solo de aproximadamente 2 cm de altura, coletado na mesma região em que os insetos foram capturados. Os terrários foram cobertos com tecido tipo organza (voil) para evitar a entrada de outros insetos e foram mantidos em temperatura do ambiente (18 a 21 °C), com umidade fornecida por algodão embebido em água (65 a 75%).

Os besouros foram alimentados com carne de porco (tratamento) ou fígado de galinha (controle) e água *ad libitum*.

Para testar o melhor protocolo de preparação das amostras visando maior sensibilidade na detecção de DNA do alimento ingerido pelos insetos, duas metodologias foram testadas: (i) extração de DNA de intestino inteiro, previamente armazenado em etanol absoluto a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Fig. 1 A e B); (ii) extração de DNA imediatamente após dissecção e retirada do conteúdo intestinal do inseto (Fig. 1 C).

Figura 1 - Delineamento experimental do tratamento **A**, onde os insetos se alimentaram de carne suína, e controle **B**, em que os insetos se alimentaram de fígado de galinha. Adultos e larvas de todos os instares foram retirados de cada terrário e dissecados. Os intestinos foram colocados em microtubos contendo álcool 100% e mantidos sob refrigeração a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Um método adicional de preparação das amostras **C** consistiu na dissecção de larvas de terceiro instar que se alimentaram de carne suína. As larvas foram retiradas do terrário e dissecadas. Neste método, o conteúdo intestinal foi removido do intestino de cada larva e colocado em um microtubo contendo solução de lise celular para extração de DNA imediata.



Para identificar a quantidade mínima de amostra necessária para detecção do DNA ingerido usando kits de extração e PCR não-forenses, os intestinos de larvas de primeiro e segundo instares, cujos tamanhos são inferiores aos de larvas de terceiro instar e adultos, foram agrupados de forma crescente em algumas amostras (Tabela 1).

Tabela 1. Detalhamento das amostras processadas de acordo com o delineamento experimental.

Amostra	Estágio	Alimento	Intestino	Armazenamento *
1	larva L1	carne de porco	1 intestino inteiro	11 dias
2	larva L1	carne de porco	1 intestino inteiro	11 dias
3	larva L1	carne de porco	2 intestinos inteiros	11 dias
4	larva L1	carne de porco	3 intestinos inteiros	11 dias
5	larva L2	carne de porco	1 intestino inteiro	11 dias
6	larva L2	carne de porco	1 intestino inteiro	11 dias
7	larva L2	carne de porco	1 intestino inteiro	11 dias
8	larva L2	carne de porco	2 intestinos inteiros	11 dias
9	larva L3	carne de porco	1 intestino inteiro	6 dias
10	larva L3	carne de porco	1 intestino inteiro	6 dias
11	larva L3	carne de porco	1 intestino inteiro	6 dias
12	larva L3	carne de porco	1 intestino inteiro	6 dias
13	adulto	carne de porco	1 intestino inteiro	2 dias
14	adulto	carne de porco	1 intestino inteiro	2 dias
15	adulto	carne de porco	1 intestino inteiro	2 dias
16	adulto	carne de porco	1 intestino inteiro	2 dias
17	larva L1	fígado de galinha	1 intestino inteiro	6 dias
18	larva L1	fígado de galinha	1 intestino inteiro	6 dias
19	larva L1	fígado de galinha	2 intestinos inteiros	6 dias
20	larva L1	fígado de galinha	3 intestinos inteiros	6 dias
21	larva L2	fígado de galinha	1 intestino inteiro	9 dias
22	larva L2	fígado de galinha	1 intestino inteiro	9 dias
23	larva L2	fígado de galinha	1 intestino inteiro	9 dias
24	larva L2	fígado de galinha	3 intestinos inteiros **	9 dias
25	larva L3	fígado de galinha	1 intestino inteiro	2 dias
25	larva L3	fígado de galinha	1 intestino inteiro	2 dias
27	larva L3	fígado de galinha	1 intestino inteiro	2 dias
28	larva L3	fígado de galinha	1 intestino inteiro	2 dias
29	adulto	fígado de galinha	1 intestino inteiro	2 dias
30	adulto	fígado de galinha	1 intestino inteiro	2 dias
31	adulto	fígado de galinha	1 intestino inteiro	2 dias
32	adulto	fígado de galinha	1 intestino inteiro	2 dias
33	larva L3	carne de porco	conteúdo intestinal	N/A
34	larva L3	carne de porco	conteúdo intestinal	N/A
35	larva L3	carne de porco	conteúdo intestinal	N/A
36	larva L3	carne de porco	conteúdo intestinal	N/A
37	larva L3	carne de porco	conteúdo intestinal	N/A
38	larva L3	carne de porco	conteúdo intestinal	N/A

* dias armazenados em álcool 100% a -20 °C previamente à extração de DNA.

** foram colocados 3 intestinos porque 2 deles foram rompidos no final do intestino posterior.

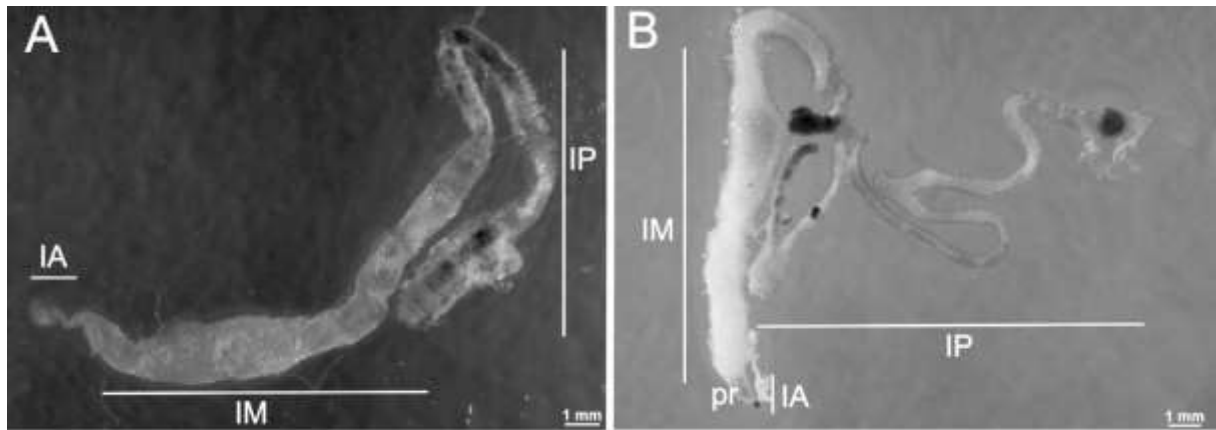
2.2 Dissecção

As larvas e adultos foram imobilizadas em baixa temperatura (10 min a 4 °C) e fixados em placa de parafina, onde foram dissecados em solução salina (NaCl 125 mM). Os insetos foram posicionados com a região ventral para cima e dissecados sob estereomicroscópio. Cabeça e pernas foram cortadas para facilitar a dissecção. Incisões nas laterais do abdômen foram realizadas para a retirada dos esternitos e, assim, ter acesso aos órgãos internos. O intestino foi removido e posicionado em uma placa de Petri limpa contendo solução salina. Após esta etapa, os intestinos inteiros foram transferidos para etanol absoluto e estocados a -20 °C até a extração do DNA (Tabela 1).

No método de preparação de amostras que consiste em usar apenas o conteúdo intestinal para a identificação molecular, as larvas de terceiro instar foram crióanestesiadas e dissecadas em solução salina (NaCl 125 mM), com uma incisão nas laterais no abdômen. O intestino foi retirado sem o corte da cabeça, para evitar extravasamento e perda do conteúdo intestinal. Posteriormente, o intestino foi transferido para uma placa de Kline de vidro contendo 700 µL de solução salina (NaCl 125 mM). A cabeça foi cortada e o conteúdo intestinal foi removido com o auxílio de uma pinça. Após a remoção da parede intestinal, 650 µL da suspensão contendo solução salina (NaCl 125 mM) e conteúdo intestinal foram transferidos para 600 µL de solução de lise celular (*Nuclei Lysis Solution*) para extração de DNA subsequente (Fig. 1 C). Este método foi adaptado do protocolo descrito para a mosca *Megaselia scalaris* (Phoridae) (MUKHERJEE e colab., 2019).

Em alguns estudos realizados com Diptera, os autores separam as partes do intestino para verificar, sobretudo, a integridade do DNA do alimento e a taxa de recuperação deste DNA. Devido às características morfológicas (Fig. 2) e histoquímicas do intestino de *O. discicolle* encontradas no capítulo 1, os intestinos foram processados inteiros. As vantagens dessa metodologia incluem economia de tempo e reagentes, bem como demanda menor conhecimento de anatomia do sistema digestório de insetos. Para orientar a dissecção, um vídeo foi gravado demonstrando os passos realizados na dissecção de uma larva de *O. discicolle*. O vídeo está disponível para visualização e download no link: <https://drive.google.com/file/d/1FoduVre4bzyVl8Q4Sr58GOawY5cUztCc/view?usp=sharing>

Figura 2 - **A** Anatomia do intestino das larvas de *Oxelytrum discicolle*. Intestino anterior curto **IA**, intestino médio **IM** e intestino posterior **IP**. **B** Anatomia do intestino dos adultos de *Oxelytrum discicolle*. Intestino anterior **IA** com destaque para o proventrículo curto **pr**, intestino médio **IM** e intestino posterior.



2.3 Extração e quantificação

As amostras contendo intestino inteiro (Tabela 1, Fig. 1 A e B, amostras # 1 a 32 mais os dois controles) foram previamente secas em papel filtro estéril e transferidas para um novo conjunto de microtubos contendo 600 μ L de solução de lise celular. Após esta transferência, as amostras foram cortadas em fragmentos pequenos (≤ 1 mm) com o auxílio de uma tesoura e maceradas com um pistilo. Entre cada amostra, a tesoura foi lavada em etanol 92,8% e flambada em chama por 5 s para evitar contaminações cruzadas. Igualmente, um pistilo estéril foi utilizado por amostra. Como controles positivo e negativo, foram extraídos os DNAs de carne de porco e de fígado de galinha, respectivamente.

Todas as amostras foram submetidas ao processo de extração do DNA total utilizando o kit *Wizard® Genomic DNA Purification* (PROMEGA®), seguindo o protocolo do fabricante. Para maior rendimento da extração de DNA e obtenção de material genético puro (sem contaminantes como proteínas), alguns passos foram adicionados ao protocolo do fabricante. A etapa de incubação para lise celular foi aumentada para 1 h 30 min a 55 °C, e foi adicionado 18 μ L de proteinase K (20 mg/mL) junto ao tampão de lise celular (*Nuclei Lysis Solution*) no início da incubação. Uma etapa adicional de desproteinização com clorofórmio: álcool isoamílico (24: 1) foi realizada. Para isso, 700 μ L desta solução foram adicionados às amostras, seguido de agitação em vortex por 20 s e centrifugação por 10 min a 14.000 g. Após esta etapa, 700 μ L da fase aquosa foram transferidas para 700 μ L de isopropanol gelado para incubação a -20 °C overnight (10 – 12 h). E duas etapas de lavagem do DNA precipitado

foram realizadas com 500 µL de etanol 70% em cada lavagem. Por fim, o precipitado foi ressuspenso em 50 µL de *DNA Rehydration Solution* com 2 µL de solução de RNase 4 mg/mL após secagem em temperatura ambiente, e foi então incubado por 1 h a 37 °C. A quantificação e verificação da qualidade do DNA obtido foram feitas em espectrofotômetro Nanodrop One (Thermo Scientific™). Para avaliar a qualidade do DNA foi considerada a razão A260/A280, onde valores próximos a 1,8 indicam DNA puro e de boa qualidade.

2.4 Seleção e teste dos primers

O principal critério de seleção utilizado para a escolha da região genômica a ser amplificada foi que essa região tivesse múltiplas cópias em uma única célula, devido às amostras estarem degradadas e/ou parcialmente digeridas. Além de atender a esse critério, os genes mitocondriais foram os mais representativos em estudos de recuperação de DNA de amostras forenses, como estudos de desastres e acidentes em massa (identificação de cadáveres) e de recuperação e identificação molecular de carnes comercializadas e embutidos (testes de fraude) até a detecção em inseto propriamente dito (CAMPOBASSO e colab., 2005; DURDLE, 2019; WELLS e colab., 2001). A partir de uma busca preliminar na literatura, o gene mitocondrial codificador da proteína citocromo B (cytB) foi escolhido devido à sua alta representatividade nos trabalhos avaliados.

O par de primers escolhido (DOOLEY e colab., 2004) foi selecionado mediante maior representatividade na revisão mais refinada em busca de primers específicos para detecção de carne suína em amostras variadas. Os primers candidatos foram escolhidos mediante testes de alinhamento no programa MEGA7 (KUMAR e colab., 2016) com sequências de cytB completas de porco (*Sus scrofa*), galo (*Gallus gallus*) e de espécies de Silphidae disponíveis no GenBank. Este teste foi necessário para a escolha de um par de primers para cytB específico para porco que não se alinhasse e produzisse sequências de cytB nos outros organismos testados (i.e., galo e besouros Silphidae). Dessa forma, os primers cytB-pork-forward: 5'-ATGAAACATTGGAGTAGTCCTACTATTTACC-3' e cytB-pork-reverse: 5'-CTACGAGGTCTGTTCCGATATAAGG-3' (DOOLEY e colab., 2004) foram selecionados e utilizados neste estudo. Este mesmo par de primers tem sido utilizado na detecção de adulteração de carnes e identificação de DNA suíno em inseto (MUKHERJEE e colab., 2019). E esse par de primers amplifica um fragmento curto de 149 pb, que aumenta a probabilidade de amplificação em amostras degradadas e/ou forenses.

2.5 Amplificação do DNA via PCR *touchdown*

A amplificação do DNA suíno presente nas amostras foi feita por meio de PCR *touchdown* utilizando o par de primers “cytB-pork”, desenhados especificamente para detecção de DNA de suínos, com 149 pb (DOOLEY e colab., 2004). Em todas as reações de PCR foram incluídos os controles positivo e negativo para comparação das bandas. Igualmente, um controle negativo adicional foi utilizado, composto de mix de PCR sem DNA. O mix de PCR (25 µL) foi composta por 12,5 µL de *DreamTaq Green PCR Master Mix (2X)* (Thermo Fisher Scientific), que contém uma pré-mistura padronizada de Taq DNA polimerase, dNTP, MgCl₂ e tampão. Ao master mix, foram adicionados: 2 µL de cada iniciador a 5 µM (para uma concentração final de 0,4 µM); 4 µL de MgCl₂ 25 mM (para aumentar a sensibilidade da reação); e 4,5 µL de água ultrapura. Em seguida, o mix de PCR foi transferido para um microtubo de 200 µL e adicionamos 1 µL de DNA molde (ca. 300 ng). As seguintes condições de termociclagem foram usadas: 3 min a 94 °C para a desnaturação inicial; 10 ciclos de 30 s de desnaturação a 94 °C, 40 s de *annealing* a 65 °C (reduzindo 1 °C por ciclo até 55 °C) e 1 min de extensão a 72 °C; mais 30 ciclos padrão de 30 s a 94 °C, 40 s a 60 °C e 1 min a 72 °C; e uma extensão final a 72 °C por 10 min, seguida por uma etapa final a 4 °C até a remoção do termociclador.

Os amplicons foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% com tampão TBE 1X pH 8,3 (0,89 M Tris-base, 0,89 M ácido bórico, 0,02 M EDTA) e marcadores de peso molecular de 1 kb e 100 pb (Thermo Scientific™). O GelRed™ (Biotium) foi usado como intercalante de DNA para visualização das bandas e fotodocumentação sob luz UV. Três microlitros de uma solução contendo GelRed™ e tampão de carregamento (1: 499) foram adicionados a 3 µL de amplicon e aplicados no gel de agarose. O tampão de carregamento foi composto de sacarose 40% e azul de bromofenol 0,25% (Sambrook & Russel 2001).

3. RESULTADOS

O DNA foi extraído com sucesso, com concentração variando de 300 a 900 ng/µL. Em relação à qualidade do DNA extraído, oito amostras (25%) de intestino inteiro apresentaram contaminação por proteínas. No entanto, esta contaminação não foi impedimento para a detecção do DNA exógeno, com a detecção do DNA suíno em 4 destas amostras.

Todas as amostras extraídas diretamente do conteúdo intestinal apresentaram pureza e alto rendimento, e apenas uma destas amostras apresentou 77 ng/μL de DNA extraído, um valor inferior em comparação com as demais amostras. O DNA dos controles (carne de porco e de fígado de galinha) foi extraído com sucesso, com alto rendimento de 1.208 e 3.338 ng/μL, respectivamente, embora tenham apresentado impurezas.

O DNA de suíno foi detectado com sucesso nas amostras # 3, 4, 10, 12, 16, 34 e 37 (Tabela 1, Fig. 3), com taxa de detecção de 31,3% nas amostras de intestino inteiro e 33,3% nas amostras de conteúdo intestinal. A taxa de recuperação foi de 33,3% para larvas em ambos os métodos de processamento (intestino inteiro e conteúdo intestinal) e de 25% em adultos que se alimentaram de carne de porco (Fig. 3 A).

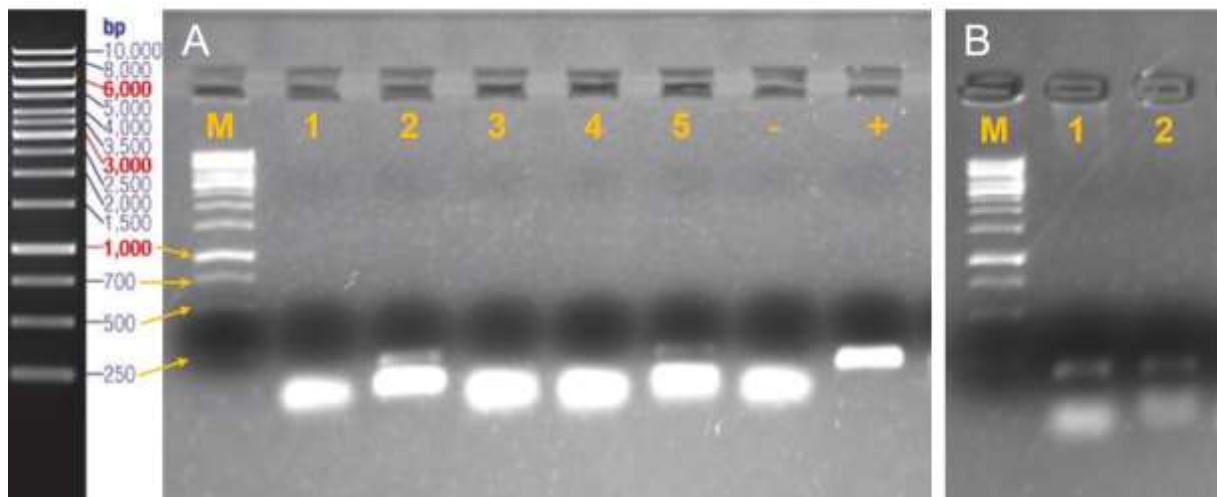
Embora as amostras #3 e #4 conttenham 2 e 3 intestinos inteiros de larvas de primeiro instar alimentadas com carne de porco, respectivamente, a quantidade de DNA de suíno amplificada não foi proporcional à quantidade esperada tendo em vista o número de intestinos por amostra (Fig. 3 B).

A taxa de recuperação das amostras de conteúdo intestinal que tiveram o DNA extraído imediatamente após a dissecação foi igual à taxa de recuperação das amostras contendo intestino inteiro e que foram armazenadas para posterior extração de DNA. Ou seja, a detecção não variou de acordo com a forma de processamento das amostras.

Apesar do delineamento experimental não contemplar diferentes tempos de armazenamento em etanol a -20 °C, foi possível extrair DNA em grande quantidade e alto grau de pureza em amostras armazenadas por até 11 dias nestas condições. Igualmente, o tempo de armazenamento não influenciou na detecção do DNA, com resultados positivos obtidos tanto em intestinos armazenados em etanol por 11 dias a -20 °C, quanto em intestinos armazenados por 2 dias nas mesmas condições.

Algumas bandas de tamanho semelhante ao controle positivo, i.e., possíveis falsos positivos ou sinais de contaminação, foram obtidas nas amostras controle.

Figura 3 - Gel de agarose submetido à eletroforese mostrando os produtos da PCR. **A:** marcador de peso molecular, amostras 1 a 5, controles negativo e positivo de 149 bp. As amostras 2 e 5, referentes a larvas de 3º instar que se alimentaram de carne suína, testaram positivo para DNA de porco, exibindo bandas de diferentes intensidades e de mesmo peso molecular do controle positivo. **B:** marcador e amostras 1 e 2, ambas de larvas de 1º instar alimentadas com carne suína, positivas para a presença de DNA de porco. Na amostra 1 há DNA extraído de 2 intestinos inteiros, enquanto que na amostra 2 há 3 intestinos inteiros. A intensidade das bandas não reflete a quantidade de DNA amplificado esperado para estas amostras. “M” = marcador 1 kb DNA Ladder; “-” = controle negativo (fígado de galinha); “+” = controle positivo (carne de porco).



4. DISCUSSÃO

Inicialmente foi testada a possibilidade de detecção de DNA no conteúdo intestinal de larvas e adultos de *O. discicolle*. A detecção foi possível, mostrando que tanto larvas quanto adultos podem ser utilizados como fonte de DNA da carcaça da qual se alimentaram, com potencial para serem usados como prova material que acrescentará dados relevantes a uma investigação criminal.

Os resultados de detecção positivos em *O. discicolle* mostram que, apesar de negligenciados em estudos de entomologia forense, os representantes de Coleoptera são úteis como vestígios nos casos criminais onde há fauna entomológica envolvida. Seu ciclo de vida é uma característica chave, pois os representantes de Diptera têm ciclo de vida mais curto se comparados aos besouros (MIDGLEY e colab., 2010). A partir das observações em campo

durante as coletas, pode-se perceber que enquanto as larvas de moscas deixam de se alimentar do cadáver para empupar rapidamente, as larvas de besouros como *O. discicolle* permanecem se alimentando nos estágios mais avançados de decomposição, servindo como fonte para a obtenção de DNA do cadáver. Este é o primeiro trabalho evidenciando a possibilidade de detecção de DNA exógeno no intestino de *O. discicolle* e o segundo a testar uma espécie de Coleoptera necrófago com potencial de aplicação na entomogenética forense.

A detecção de DNA exógeno em maior taxa nas larvas do que nos adultos de *O. discicolle* pode ser explicada pelo fato de que estas se alimentam predominantemente da carcaça e com maior frequência e intensidade do que os adultos. Os adultos, além de se alimentarem da carcaça também são predadores de larvas de Diptera (LIRA e colab., 2017; LIRA e VASCONCELOS, 2016; PECK e ANDERSON, 1985).

A taxa de sucesso na detecção de DNA exógeno obtida em *O. discicolle* foi menor em comparação com aquelas reportadas para Diptera. Analisando o conteúdo intestinal de larvas de *Megaselia scalaris*, o DNA de suíno foi detectado em 100% das amostras (MUKHERJEE e colab., 2019), com o mesmo par de primers aqui utilizados. Em larvas de Calliphoridae que se alimentaram de carcaça de suíno, foi utilizado um primer distinto com 307 pb, que demonstrou alta afinidade com o conteúdo retirado do intestino das larvas, detectando perfis STR (*short tandem repeats*) completos em aproximadamente 70% das amostras (ZEHNER e colab., 2004). A partir do conteúdo intestinal de larvas de *Lucilia sericata*, a detecção foi bem sucedida em aproximadamente 80% das amostras, utilizando marcadores STR e SNP (*single nucleotide polymorphism*) (KONDAKCI e colab., 2009). Entretanto, estes estudos não apresentam a quantidade de amostras com resultados positivos em relação a amostragem total, mas apontam quando a detecção é bem-sucedida em todas ou em maior parte das amostras (DURDLE, 2019).

Em comparação com a detecção de DNA exógeno em espécies hematófagas representantes de Culicidae (CHOW-SHAFFER e colab., 2000; CURIC e colab., 2014; VIEIRA e colab., 2017), os estudos apontam taxa de detecção também maior do que a obtida aqui em *O. discicolle*. Em um estudo de detecção de DNA humano em *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762), os autores obtiveram perfis parciais ou completos de quatro loci em 61% dos mosquitos utilizados no experimento (CHOW-SHAFFER e colab., 2000).

A diferença entre a morfologia do intestino de Diptera e Coleoptera pode explicar a taxa de detecção menor em *O. discicolle* em comparação com os trabalhos reportados acima.

Em larvas de Diptera, na região do intestino anterior, há presença de poucas enzimas digestivas, o alimento não é digerido e fica armazenado para posterior digestão na região do intestino médio. Isso preserva o DNA do alimento ingerido possibilitando a sua identificação e quantificação (CAMPOBASSO e colab., 2005). Além disso, em Diptera, a região anterior é de maior tamanho e pode ser observada a olho nu em larvas de terceiro instar. Isso facilita a dissecação e possibilita a obtenção de uma maior quantidade de DNA recuperado que nas demais regiões do intestino (BILLINGSLEY e LEHANE, 1996; CACCIA e colab., 2019; HOLTOF e colab., 2019; SKOWRONEK e colab., 2014). Já em *O. discicolle*, larvas e adultos possuem uma região anterior curta e síntese de secreção proteica no lúmen do intestino médio. Essa secreção pode conter enzimas digestivas que degradam o DNA. Nas larvas não há uma separação espacial entre as regiões anterior e média, podendo ocorrer a pré-digestão do alimento na região anterior. Nos adultos, a presença da válvula cardíaca separando o intestino anterior do médio evita essa pré-digestão, mas pelo fato do proventrículo ser curto, pouca quantidade de conteúdo fica acondicionado nessa região. Na região anterior do intestino dos mosquitos representantes de Culicidae não há digestão do sangue (BILLINGSLEY, 1990), o que acaba preservando o DNA. Isso sugere que pode haver uma relação entre as características morfológicas e químicas do intestino dos insetos e a taxa de recuperação de DNA.

Além das diferenças morfológicas e fisiológicas do intestino entre as espécies utilizadas nos estudos de recuperação de DNA e *O. discicolle*, a taxa de detecção pode ter sido influenciada pelo fato de kits de extração e PCR terem menor sensibilidade a amostras degradadas e em baixa proporção. O emprego de kits forenses pode aumentar a taxa de detecção de forma significativa, haja visto que a maioria dos trabalhos aqui citados utilizaram estes kits.

A detecção de bandas inespecíficas nas amostras controle pode ser explicada pelo fato de a dissecação ter sido feita em placa de parafina, que é porosa e apresenta furos dos alfinetes de fixação dos insetos, onde pode acumular DNA durante a dissecação. Mesmo com a limpeza da placa em água corrente entre as dissecações, esse potencial material residual pode ter contaminado as amostras.

Posteriormente foi testado se haveria alteração na sensibilidade da técnica de detecção do DNA a partir da modificação dos procedimentos de dissecação. Não houve diferenças entre a utilização do intestino inteiro e do conteúdo intestinal. A técnica de dissecação onde a cabeça foi cortada somente depois do intestino ser mudado para um poço da placa de Kline se mostrou mais eficiente para captação do conteúdo intestinal. Ao cortar a cabeça de larvas e

adultos para retirar o intestino, boa parte do conteúdo intestinal extravasa, sendo melhor esta decapitação ser realizada de forma controlada em uma placa côncava, como a placa de Kline ou o vidro de relógio, de material não poroso, para melhor aproveitamento do conteúdo. A desvantagem desta técnica é que a extração deve ser feita no mesmo dia da dissecação pelo fato do conteúdo ser diretamente colocado na solução de lise celular, e nem sempre haverá esta possibilidade de processamento imediato nos institutos de criminalística.

A utilização da técnica de detecção de DNA a partir da retirada do intestino também foi utilizada em alguns estudos com Diptera. Em larvas de *M. scalaris* (MUKHERJEE e colab., 2019), *M. domestica* (Muscidae) e *Chrysomya albiceps* (Calliphoridae) alimentadas com fígado de rato, a porção anterior do intestino foi retirada e foi possível detectar o DNA exógeno com sucesso, com melhores resultados em larvas de terceiro instar, 24 h após a alimentação (MOHAMMAD e colab., 2020). Outros estudos também utilizaram a região anterior do intestino para extração do material genético (DI LUISE e colab., 2008; KONDAKCI e colab., 2009; NJAU e colab., 2016; ZEHNER e colab., 2004). Como em *O. discicolle* o intestino anterior é menor em larvas e adultos, não houve necessidade de fazer essa separação da região anterior. Separar as regiões do intestino exige tempo e habilidade dos peritos que realizarem a dissecação e demanda mais materiais e reagentes para a detecção do DNA, deixando de ser um procedimento vantajoso. Utilizar o intestino inteiro ou retirar o conteúdo intestinal são técnicas mais simples e com menor custo.

Quanto aos testes de quantidade mínima de material necessário para detecção do DNA exógeno, a taxa de recuperação foi mais eficaz em amostras com maior quantidade de material a ser extraído, como larvas de primeiro instar contendo mais de um intestino por amostra, e larvas de terceiro instar e adultos individualizados, que possuem intestinos maiores. A quantidade de DNA amplificado pode não refletir o que é esperado para as amostras com mais de um intestino, pois o alimento ingerido pode estar em diferentes etapas da digestão. Entretanto, os dados sugerem que juntar mais de um intestino de larvas de primeiro e segundo instares aumenta a possibilidade de recuperação e identificação do DNA exógeno. Larvas de terceiro instar de Calliphoridae, Sarcophagidae e Muscidae coletadas em corpos possibilitaram a obtenção de perfis STR completos em 54% e perfis parciais em 15% das amostras a partir do conteúdo intestinal (ZEHNER e colab., 2004). Larvas de terceiro instar são as mais utilizadas para detecção de DNA e apresentam melhores resultados (KONDAKCI e colab., 2009; MOHAMMAD e colab., 2020; NJAU e colab., 2016).

Os resultados mostram que em amostras de intestino inteiro de *O. discicolle* armazenadas em etanol a -20 °C por até 11 dias é possível detectar o DNA exógeno. Esse armazenamento feito após a dissecação difere de alguns trabalhos de recuperação de DNA. Em *M. scalaris* o armazenamento das larvas inteiras a -20 °C aliado a outras técnicas resultou em uma melhor quantidade de DNA recuperado (MUKHERJEE e colab., 2019). Em mosquitos, o conteúdo retirado do intestino foi acondicionado de diferentes formas com a utilização de etanol 95% sendo mais eficaz para preservação dos mosquitos inteiros por até 180 dias (REEVES e colab., 2016). Em testes de preservação com larvas inteiras de *Calliphora vicina* (Robineau-Desvoidy, 1830) (Diptera: Calliphoridae), o acondicionamento das amostras sem nenhum tipo de fluido a -70 °C possibilitou melhores resultados na detecção do DNA, possibilitando a detecção de perfis STR nas amostras em até seis meses de armazenamento (LINVILLE e colab., 2004 apud DURDLE 2019). Em *O. discicolle*, armazenar as larvas inteiras ou adultos para dissecação posterior pode não ser vantajoso, pois a desidratação causada pelo etanol deixa os indivíduos ainda mais rígidos, pois são revestidos por escleritos espessos, dificultando a dissecação. Portanto, armazenar o intestino ao invés dos indivíduos inteiros é mais apropriado.

O primer utilizado foi adequado para a detecção da carne suína, não detectando o DNA de *O. discicolle*. Por se tratar de um marcador referente a um gene mitocondrial, a detecção de DNA em amostras parcialmente digeridas maiores é possível. Levando em consideração a degradação da carcaça da qual os insetos se alimentam, um marcador de gene nuclear poderia resultar em taxa de detecção menor, pois o DNA nuclear se encontra em menor quantidade, enquanto do DNA mitocondrial possui múltiplas cópias e maior probabilidade de recuperação (WILSON e colab., 1993). É importante levar isto em consideração na entomogenética forense, pois as amostras geralmente são escassas e apresentam DNA altamente degradado.

Os resultados indicam que a utilização de suíno como modelo animal em trabalhos de entomologia forense é uma alternativa interessante. Apesar de existirem trabalhos com experimentos de detecção de DNA usando larvas de insetos alimentadas com fluidos biológicos humanos ou coletadas diretamente de cadáveres (CHAMOUN e colab., 2020; KONDAKCI e colab., 2009; NJAU e colab., 2016; STAITI e colab., 2004), nem sempre esse tipo de trabalho é viável. A utilização de cadáveres e/ou material biológico humano implica em impasses éticos, como a discussão em torno da dignidade da pessoa humana e as burocracias ao redor da autorização dos comitês de ética. Carcaças de suínos se mostram uma alternativa interessante pois os suínos possuem organismo semelhante ao dos humanos, o

tamanho e massa coincidem e levam um tempo de decomposição parecido, e a logística para aquisição e utilização é relativamente simples (MATUSZEWSKI e colab., 2019; SCHOENLY e colab., 2006).

Larvas e adultos de *O. discicolle* possuem potencial para recuperação de DNA exógeno quando encontrados em local de crime. A recuperação foi igualmente possível utilizando intestino inteiro e conteúdo intestinal e a taxa de detecção foi maior nas larvas do que nos adultos. Para aplicações em casos reais de crimes contra a vida onde *O. discicolle* esteja presente, recomenda-se usar: um intestino inteiro por amostra, quando larva de terceiro instar ou adulto; ou dois a três intestinos inteiros por amostra quando larvas de primeiro ou segundo instar. Adicionalmente, recomenda-se a coleta de indivíduos suficientes para se obter, no mínimo, 10 amostras. Como o tempo de armazenamento das amostras em álcool absoluto sob refrigeração (-20 °C) não interferiu na taxa de detecção do DNA do alimento ingerido por *O. discicolle*, os intestinos podem ficar armazenados por até 11 dias nestas condições até a extração do DNA. Além disso, ao usar o intestino inteiro, economiza-se uma etapa na preparação das amostras. Estas vantagens somadas, favorecem a utilização desta espécie na prática pericial, uma vez que os peritos e técnicos dos institutos de criminalística podem não ter tempo hábil para imediata extração de DNA das amostras.

5. CONCLUSÕES

As características anatômicas e histológicas do intestino de larvas e adultos de *O. discicolle* estão relacionadas tanto com o grau de parentesco com as demais espécies de Coleoptera, quanto com seu hábito alimentar. A escassez de alimento que pode ocorrer é compensada por um sistema digestivo mais eficiente que aproveita ao máximo os nutrientes do alimento ingerido. A morfologia do intestino nos três instares larvais é semelhante, assim como entre machos e fêmeas, onde não há diferenças significativas.

Oxelytrum discicolle se mostra uma espécie com potencial para ser usada pela entomologia forense para a detecção de DNA, pois foi possível obter e identificar o DNA exógeno presente no intestino de larvas e adultos, e a taxa de detecção foi maior nas larvas, que são estritamente necrófagas, do que nos adultos. Utilizando tanto o intestino inteiro dos indivíduos, quanto apenas o conteúdo intestinal, a taxa de recuperação do DNA foi a mesma.

REFERÊNCIAS

- ANSELL, Juliet e colab. **Improved method for distinguishing the human source of mosquito blood meals between close family members.** Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, v. 94, n. 5, p. 572–574, 2000.
- BILLINGSLEY, P. F. **The ultrastructure of the midgut of hematophagous insects.** Ann. Rev. Entomol., v. 35, p. 219–48, 1990.
- BILLINGSLEY, P. F. e LEHANE, M. J. **Structure and ultrastructure of the insect midgut.** Biology of the Insect Midgut, p. 3–30, 1996.
- CACCIA, Silvia e CASARTELLI, Morena e TETTAMANTI, Gianluca. **The amazing complexity of insect midgut cells: types, peculiarities, and functions.** Cell and Tissue Research, v. 377, n. 3, p. 505–525, 2019.
- CAMPOBASSO, Carlo P. e colab. **Forensic genetic analysis of insect gut contents.** American Journal of Forensic Medicine and Pathology, v. 26, n. 2, p. 161–165, 2005.
- CATTS, E. P. e GOFF, M. L. **Forensic entomology in criminal investigations.** Annual Review of Entomology, v. 37, n. 1, p. 253–72, 1992.
- CHAMOUN, C. A. e colab. **In vitro recovery and identification of Y-STR DNA from *Chrysomya albiceps* (Diptera, Calliphoridae) larvae fed a decomposing mixture of human semen and ground beef.** Genetics and Molecular Research, v. 18, n. 1, p. 1–11, 2019.
- CHAMOUN, C. A. e colab. **Recovery & identification of human Y-STR DNA from immatures of *Chrysomya albiceps* (Diptera: Calliphoridae). Simulation of sexual crime investigation involving victim corpse in state of decay.** Forensic Science International, v. 310, p. 110239, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2020.110239>>.
- CHÁVEZ-BRIONES, María de Lourdes e colab. **Identification of human remains by DNA analysis of the gastrointestinal contents of fly larvae.** Journal of Forensic Sciences, v. 58, n. 1, p. 248–250, 2013.
- CHOW-SHAFFER, Esther e colab. **Laboratory and field evaluation of polymerase chain reaction-based forensic DNA profiling for use in identification of human blood meal sources of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae).** Journal of Medical Entomology, v. 37, n. 4, p. 492–502, 2000.
- CURIC, Goran e colab. **Identification of person and quantification of human DNA recovered from mosquitoes (Culicidae).** Forensic Science International: Genetics, v. 8, n. 1, p. 109–112, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigen.2013.07.011>>.
- DAVEY, J. S. e colab. **DNA detection rates of host mtDNA in bloodmeals of human body lice (*Pediculus humanus* L., 1758).** Medical and Veterinary Entomology, v. 21, n. 3, p. 293–296, 2007.
- DIZINNO, Joseph A. e colab. **Mitochondrial DNA sequencing of beetle larvae (Nitidulidae: *Omosita*) recovered from human bone.** Journal of Forensic Sciences, v. 47, n. 6, 2002.
- DOOLEY, John J e colab. **Detection of meat species using TaqMan real-time PCR assays.** v. 68, p. 431–438, 2004.
- DURDLE, Annalisa. **Insects as vectors of DNA in a forensic context.** Wiley Interdisciplinary Reviews: Forensic Science, n. June, p. 1–27, 2019.
- DURDLE, Annalisa e MITCHELL, Robert J. e VAN OORSCHOT, Roland A.H. **The food preferences of the blow fly *Lucilia cuprina* offered human blood, semen and saliva, and various nonhuman foods sources.** Journal of Forensic Sciences, v. 61, n. 1, p. 99–103, 2016.
- DURDLE, Annalisa e MITCHELL, Robert John e VAN OORSCHOT, Roland A.H. **The human DNA content in artifacts deposited by the blowfly *Lucilia cuprina* fed human**

- blood, semen and saliva.** Forensic Science International, v. 233, n. 1–3, p. 212–219, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2013.09.015>>.
- DURDLE, Annalisa e OORSCHOT, Roland A.H. van e MITCHELL, Robert John. **The transfer of human DNA by *Lucilia cuprina* (Meigen) (Diptera: Calliphoridae).** Forensic Science International: Genetics Supplement Series, v. 2, n. 1, p. 180–182, 2009.
- FERREIRA, Paulo Sérgio Fiuza e colab. **Seasonal abundance and sexual variation in morphometric traits of *Oxelytrum discicolle* (Brulle, 1840) (Coleoptera: Silphidae) in a Brazilian Atlantic Forest.** Biota Neotropica, v. 6, n. 2, 2006.
- HOLTOF, Michiel e colab. **Extracellular nutrient digestion and absorption in the insect gut.** Cell and Tissue Research, v. 377, n. 3, p. 397–414, 2019.
- KEH, B. **Scope and applications of forensic entomology.** Annual Review of Entomology, v. 30, n. 1, p. 137–154, 1985.
- KONDAKCI, Gulden Onur e colab. **STR and SNP analysis of human DNA from *Lucilia sericata* larvae's gut contents.** Forensic Science International: Genetics Supplement Series, v. 2, n. 1, p. 178–179, 2009.
- KREIKE, J. e KAMPFER, S. **Isolation and characterization of human DNA from mosquitoes (Culicidae).** International Journal of Legal Medicine, v. 112, n. 6, p. 380–382, 1999.
- KUMAR, Sudhir e STECHER, Glen e TAMURA, Koichiro. **MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets.** Molecular biology and evolution, v. 33, n. 7, p. 1870–1874, 2016.
- LINVILLE, J. G. e HAYES, J. e WELLS, J. **Mitochondrial DNA and STR analyses of maggot crop contents: effect of specimen preservation technique.** Journal of Forensic Sciences, v. 49, n. 2, p. 341–344, 2004.
- LIRA, Luiz Antonio e colab. **Diel activity and effect of carcass decomposition on the attractiveness to the forensically important species *Oxelytrum discicolle* (Coleoptera: Silphidae).** Journal of Forensic Sciences, v. 64, n. 3, p. 799–804, 2019.
- LIRA, Luiz Antonio e colab. **The carrion beetle *Oxelytrum discicolle* (Coleoptera: Silphidae) and the estimative of the minimum post-mortem interval in a forensic case in Brasília, Brazil.** Revista Brasileira de Entomologia, v. 64, n. 1, 2020.
- LIRA, Luiz Antonio e HARTERREITEN-SOUZA, Érica Sevilha e VASCONCELOS, Simão Dias. **A short-term study on bait attractiveness to the forensically relevant species *Oxelytrum discicolle* (Brullé, 1840) (Coleoptera: Silphidae).** Entomological News, v. 126, n. 5, p. 424–427, 2017.
- LIRA, Luiz Antonio e VASCONCELOS, Simão Dias. **New record and update on the distribution *Oxelytrum discicolle* (Brullé, 1840) (Coleoptera: Silphidae) in South America.** The Coleopterists Bulletin, v. 70, n. 2, p. 399–402, 2016.
- LORD, Wayne D. e colab. **Isolation, amplification, and sequencing of human mitochondrial DNA obtained from human crab louse, *Pthirus Pubis* (L.), blood meals.** Journal of Forensic Sciences, v. 43, n. 5, p. 14367J, 1998.
- di LUISE, E., MAGNI, P., STAITI, N., SPITALERI, S. & ROMANO, C. **Genotyping of human nuclear DNA recovered from the gut of fly larvae.** Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser., 1, 591–592, 2008.
- MARCHETTI, Daniela e colab. **Human DNA extraction from empty puparia.** Forensic Science International, v. 229, n. 1–3, p. e26–e29, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2013.03.043>>.
- MATUSZEWSKI, Szymon e colab. **Pigs vs people: the use of pigs as analogues for humans in forensic entomology and taphonomy research.** International Journal of Legal Medicine, p. 793–810, 2019.
- MIDGLEY, John M. e RICHARDS, Cameron S. e VILLET, Martin H. **The utility of**

- Coleoptera in forensic investigations.** Current Concepts in Forensic Entomology, p. 57–68, 2010.
- MOHAMMAD, Zainab e colab. **Role of *Chrysomya albiceps* (Diptera: Calliphoridae) and *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) maggot crop contents in identifying unknown cadavers.** Journal of Medical Entomology, v. 58, n. 1, p. 93–98, 2020.
- MUKHERJEE, Subham e colab. **DNA characterization from gut content of larvae of *Megaselia scalaris* (Diptera, Phoridae).** Science and Justice, v. 59, n. 6, p. 654–659, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scijus.2019.06.006>>.
- MUMCUOGLU, Kosta Y. e colab. **Use of human lice in forensic entomology.** Journal of Medical Entomology, v. 41, n. 4, p. 803–806, 2009.
- NICHOLS, E. e colab. **Ecological functions and ecosystem services provided by Scarabaeinae dung beetles.** Biological Conservation, v. 141, n. 6, p. 1461–1474, 2008.
- NJAU, Daniel Gachui e colab. **STR analysis of human DNA from maggots fed on decomposing bodies: Assessment of the time period for successful analysis.** Egyptian Journal of Forensic Sciences, v. 6, n. 3, p. 261–269, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejfs.2015.04.002>>.
- PECK, Stewart B. e ANDERSON, R. S. **Taxonomy, phylogeny and biogeography of the carrion beetles of Latin America (Coleoptera: Silphidae).** Quaestiones Entomologicae, v. 21, n. 3, p. 247–317, 1985.
- REEVES, Lawrence E. e colab. **Maintenance of host DNA integrity in field-preserved mosquito (Diptera: Culicidae) blood meals for identification by DNA barcoding.** Parasites and Vectors, v. 9, n. 1, p. 1–11, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s13071-016-1791-z>>.
- Sambrook, J.; Russel, D. W. (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory
- SCHAL, Coby e colab. **Isolation, identification, and time course of human DNA typing from bed bugs, *Cimex lectularius*.** Forensic Science International, v. 293, p. 1–6, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2018.10.008>>.
- SCHOENLY, Kenneth G. e colab. **Recreating death's acre in the school yard: using pig carcasses as model corpses.** the American Biology Teacher, v. 68, n. 7, p. 402–410, 2006.
- SKOWRONEK, R. e colab. **Insects feeding on cadavers as an alternative source of human genetic material.** Archiwum medycyny sądowej i kryminologii, v. 64, n. 4, p. 254–267, 2014.
- STAITI, N. e colab. **Identification of a carbonized body by DNA profiling.** International Congress Series, v. 1261, n. C, p. 494–496, 2004.
- VIEIRA, B. R.C. e CARVALHO, E. F. e SILVA, D. A. **Analysis of human DNA present in the digestive tract of *Aedes aegypti* mosquitoes for possible forensic application.** Forensic Science International: Genetics Supplement Series, v. 6, n. September, p. 324–326, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2017.09.124>>.
- VINUEZA-ESPINOSA, Diana C. e colab. **Human DNA extraction from highly degraded skeletal remains: How to find a suitable method ?** Electrophoresis, v. 41, p. 2149–2158, 2020.
- WELLS, Jeffrey D. e colab. **Human and Insect Mitochondrial DNA Analysis from Maggots.** Journal of Forensic Sciences, v. 46, n. 3, p. 15022J, 2001.
- WILSON, Mark R. e colab. **Guidelines for the use of mitochondrial DNA sequencing in forensic science.** Crime Laboratory Digest, v. 20, n. 4, 1993.
- ZEHNER, Richard e AMENDT, Jens e KRETTEK, Roman. **STR typing of human DNA from fly larvae fed on decomposing bodies.** Journal of Forensic Sciences, v. 49, n. 2, p. 1–4, 2004.