

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

ESTUDO COMPARATIVO DE IMATUROS DE DíPTEROS MUSCOIDES DE
IMPORTÂNCIA MÉDICA-VETERINÁRIA E FORENSE COM BASE EM CARACTERES
MORFOLÓGICOS E MOLECULARES

PALOMA MARTINS MENDONÇA

Sob a Orientação da Doutora

Margareth Maria de Carvalho Queiroz

Tese submetida como requisito
parcial para a obtenção do grau de
Doutor em Ciências, no Curso de
Pós-Graduação em Ciências
Veterinárias

T
595.47
M5392

Seropédica, RJ

Outubro de 2014

| | |
|--------------------------|----------|
| UFRRJ-Biblioteca Central | |
| Registro | |
| Data: | 21/03/18 |
| Nº BC: | 218 |
| Ex.: | 153138 |
| Ac.: | 78421 |
| Origem: | DDAAs |

aut ori

595.77
M539e
T

Mendonça, Paloma Martins, 1982-
Estudo comparativo de imaturos de
dípteros muscoides de importância médica-
veterinária e forense com base em
caracteres morfológicos e moleculares /
Paloma Martins Mendonça. - 2014.
199 f.: il.

✓ Orientador: Margareth Maria de Carvalho
Queiroz.

Tese (doutorado) - Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-
Graduação em Ciências Veterinárias, 2014.

Bibliografia: f. 121-130.

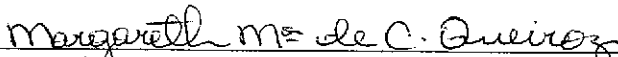
1. Díptero - Teses. 2. Díptero -
Morfologia - Teses. 3. Biologia molecular -
Teses. 4. Entomologia forense - Teses.
I. Queiroz, Margareth Maria de Carvalho,
1964- II. Universidade Federal Rural do Rio
de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias. III. Título.


UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

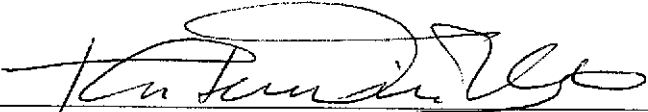
PALOMA MARTINS MENDONÇA

Tese submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no
Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

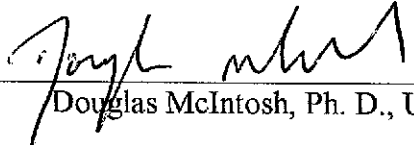
TESE APROVADA EM 16 DE OUTUBRO DE 2014.


Margareth Maria de Carvalho Queiroz, Ph. D., IOC/FIOCRUZ


Fernando Araújo Monteiro, Ph. D., IOC/FIOCRUZ


Rubens Pinto de Mello, Ph. D., IOC/FIOCRUZ


Katia Maria Famadas, Ph. D., UFRRJ


Douglas McIntosh, Ph. D., UFRRJ

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo, agradeço a Deus que me iluminou e tornou tudo isso possível.

Agradeço à Dra. Margareth Queiroz, minha querida orientadora, amiga e incentivadora, pela confiança e por todos os ensinamentos passados a mim durante a execução deste trabalho e muito antes dele (são quase 20 anos!). Certamente, os levarei por toda a minha vida. Agradeço também por todas as oportunidades!

Agradeço ao Dr. Fernando Monteiro, do Laboratório de Epidemiologia e Sistemática Molecular da Fiocruz, pela colaboração, por ter permitido que eu utilizasse seu laboratório, pela credibilidade, pelos ensinamentos valiosos e pelas sugestões durante o trabalho.

Agradeço todos os colegas do Laboratório de Transmissores de Leishmanioses – Setor de Entomologia Médica e Forense pelo auxílio, críticas, sugestões e estímulo durante a execução do trabalho. Agradeço, em especial, ao Rodrigo, pelas conversas e dúvidas sobre as questões da vida e do futuro. Agradeço também pelo enorme auxílio com a identificação dos insetos. À amiga Zeneida, pela enorme ajuda durante as disciplinas e pelos conselhos valiosos.

Agradeço em especial ao Alexandre Xavier, Cesar Carriço, Tayra Sato, Rebecca Caetano, Rodrigo Barbosa pelo material cedido.

Agradeço em especial ao Lucas Cortinhas, que me auxiliou muito na manutenção das colônias e na coleta de material para microscopia e biologia molecular, além das trocas de figurinhas depois do horário de expediente. Sem a sua ajuda, seria muito mais difícil!

Agradeço as meninas do “Lesma”, que solucionaram várias dúvidas de assuntos relacionados a biomol, mas também me fizeram rir muito. Nossos encontros e conversas foram muito importantes para superar os percalços da tese e da vida. Tenho certeza de que fiz amizades e parcerias que levarei para sempre! Vocês apareceram no momento certo! Obrigada, garotas!!!

Agradeço em especial a Dra. Karina Morelli por toda a ajuda profissional, tanto na solução de questões surgidas durante os experimentos, quanto com o valioso auxílio na parte escrita. Agradeço também a minha amiga Karina, a quem incomodei muito durante esses últimos meses. Valeu pelas caronas e pela enorme ajuda e pelos conselhos.

Agradeço a Andreia, uma pessoa que apareceu no meio da caminhada, mas que foi importante, trazendo sempre palavras de amizade e carinho!!! Agradeço também pela ajuda com os experimentos!!!!

Agradeço, sempre, a minha amiga Mari, pelos galhos quebrados e pela amizade longa e resistente! Não adianta que nada nos separa!!!

Sou especialmente grata à minha família que compreendeu as ausências e os almoços estilo “muriçoca”, mas que sempre me deu apoio durante as fases mais difíceis desse trabalho. Agradeço ao meu esposo, que sempre acreditou em mim, me fazendo insistir nos momentos de dificuldade e me acalmando nos momentos de ansiedade. Obrigada!

Não posso deixar de agradecer a minha mãe e aos meus avós, que mesmo sem compreender muito bem os caminhos que eu traçava para a minha vida profissional, sempre me incentivaram e me ajudaram a colocar cada pedrinha em seu lugar. Agradeço a admiração e o orgulho de vocês! Dedico tudo isso a vocês!

Agradeço a Plataforma de Identificação Molecular de Parasitos e Vetores do Brasil e a Plataforma de Microscopia Rudolf Barth, do Instituto Oswaldo Cruz pelo uso dos equipamentos.

Agradeço à coordenação do Curso de Doutorado em Ciências Veterinárias, bem como a todo o corpo docente por ter me oferecido um curso do qual me recordarei sempre. Agradeço também aos meus colegas de turma pela amizade. E, finalmente, à Fundação Oswaldo Cruz e a Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pelo apoio financeiro e estrutural para a realização desse trabalho. E ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida.

Enfim, agradeço a todos que tornaram esse trabalho possível.

*"As coisas são semelhantes: isto faz a Ciência possível,
as coisas são diferentes: isto faz a Ciência necessária."*

(Levins e Lewontin, 1985)

RESUMO GERAL

MENDONÇA, Paloma Martins. **Estudo Comparativo de Imaturos de Dípteros Muscoides de Importância Médica-Veterinária e Forense com Base em Caracteres Morfológicos E Moleculares**. 2014. 171p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

A ordem Diptera é composta por aproximadamente 153 mil espécies descritas, mas acredita-se que o número de espécies ainda desconhecidas é muito grande. Alguns grupos de dípteros muscóides possuem imaturos e adultos com poucas variações morfológicas, dificultando muito o processo de identificação. Além disso, as chaves dicotômicas existentes são baseadas nos adultos, entretanto, são os imaturos mais encontrados causando miíases ou colonizando cadáveres. Estes insetos são conhecidos vetores de patógenos, suas larvas são parasitas de humanos e animais e apresentam papel importante como auxílio a entomologia forense. Assim, a correta identificação das espécies que desempenham estas funções é muito importante. O presente estudo tem como objetivo principal caracterizar espécies de dípteros muscoides de importância médica-veterinária e forense, através da utilização de duas técnicas modernas de identificação. O primeiro capítulo utiliza a microscopia eletrônica de varredura que permite a visualização e a determinação de caracteres que possam ser utilizados na identificação das espécies. Foram estudados imaturos de três espécies de dípteros de duas famílias diferentes: *Peckia (Euboettcheria) collusor* (Diptera: Sarcophagidae) (larvas e pupários), *Lucilia cuprina* (larvas e pupários) e *Cochliomyia macellaria* (ovos, larvas e pupários) (Diptera: Calliphoridae) através desta técnica. O tamanho das células do exocócion permitiu diferenciar entre *C. macellaria* e *C. hominivorax*, duas espécies causadoras de miíases. A ausência de espinhos no espiráculo posterior das larvas de *C. macellaria* também a diferencia de *C. hominivorax*. As papilas do complexo do palpo maxilar em uma cavidade parecem ser específicas do subgênero *Euboettcheria*. As aberturas respiratórias do espiráculo anterior dispostas em fileiras irregulares são exclusivas da família Sarcophagidae. A presença de espinhos filamentosos no último segmento larval é característica específica do gênero *Lucilia*. No segundo capítulo, a técnica de *barcode* é utilizada para a formação de um banco de dados contendo sequências gênicas de espécies de importância médica-veterinária e forense da família Calliphoridae. Esta técnica baseia-se no sequenciamento de uma porção do gene mitocondrial citocromo oxidase I (*cox1*). Foram analisadas nove espécies de dípteros, coletadas em quatro regiões do Brasil, em um total de 346 espécimes utilizados. Dois segmentos do genoma nuclear (fator de alongação 1 alfa e white) também foram sequenciados pela primeira vez para algumas espécies. A proposta de *barcode* foi bem sucedida em *Hemilucilia segmentaria*, *Hemilucilia semidiaphana*, *Chloroprocta idioidea*, *Cochliomyia macellaria*, *Chrysomya megacephala* e *Chrysomya albiceps*, onde a variação intraespecífica foi menor do que 3%. Entretanto, em *Lucilia eximia*, *Chrysomya putoria* e *Chrysomya rufifacies* esta metodologia trouxe resultados incipientes. A variação intraespecífica em *Lucilia eximia* foi 4,6%, sugerindo que o limiar proposto não deve ser aplicado em todos os dípteros sem análise prévia do grupo estudado. *Chrysomya putoria* é uma espécie polifilética comprovada tanto pelos genes nucleares quanto mitocondrial, além disso, uma parte das amostras forma um agrupamento com as amostras de *C. albiceps* e *C. rufifacies*. Assim, acredita-se que mais estudos precisam ser conduzidos com o objetivo de esclarecer melhor estas questões taxonômicas.

Palavras-chave: dípteros muscoides; microscopia eletrônica de varredura; *barcode*

ABSTRACT

MENDONÇA, Paloma Martins. **Comparative Studies of Muscoids Diptera with Medical-Veterinary and Forensic Importance using Morphological and Forensic Characters.** 2014. 171p. Tesis (Doctoral Degree in Veterinary Sciences). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

The Order Diptera is composed by about 153 thousand described species, but it is believed that the number of unknown species is much bigger. Adults and immature of some muscoid dipteran groups have little morphological differences, making the identification process more difficult. Besides, the available dichotomous keys are based on adults, but in the case of myiasis and cadaver colonization, only immature are found. These insects are known pathogen vectors, their larvae parasite humans and animals and they play an important role in forensic entomology. Therefore, the correct identification of these species is very important. This study aims to characterize features of medical, veterinary and forensic important dipteran species using two new approaches. The first chapter uses scanning electron microscopy which gives detailed information on the morphological characters that can help identify the immature forms of the flies. Immatures belonging to three muscoids with forensic and sanitary importance were studied using this methodology: *Peckia (Euboettcheria) collusor* (Diptera: Sarcophagidae) (larvae and puparia), *Lucilia cuprina* (larvae and puparia) e *Cochliomyia macellaria* (eggs, larvae and puparia) (Diptera: Calliphoridae). The size of the chorionic cells as well as the absence of spines at the posterior spiracle allowed to differentiate *C. macellaria* from *C. hominivorax*, both myiasis causing species. The maxillary palp complex composed by a group of papillae inside a cavity seem to be specific to the subgenus *Euboettcheria*. The anterior spiracular openings displaced in an irregular row are found exclusively in Sarcophagidae. The filiform spines at the anal segments are found only in the genus *Lucilia*. In the second chapter, *barcoding* is used to provide a gene sequence database of medical, veterinary and forensically important Calliphoridae flies. This technique is based on the sequencing of a portion of the genome of the mitochondrial cytochrome oxidase I (*coI*) gene. Nine species of flies were collected in four regions in Brazil, corresponding to 346 specimens. Two other gene fragments (elongation factor 1 alpha and white) were sequenced for the first time for some species. The *barcode* proposal was successfully achieved for *Hemilucilia segmentaria*, *Hemilucilia semidiaphana*, *Chloroprocta idioidea*, *Cochliomyia macellaria*, *Chrysomya megacephala* and *Chrysomya albiceps*, for which the intraspecific variation was less than 3%. However, for *Lucilia eximia*, *Chrysomya putoria* and *Chrysomya rufifacies*, this methodology brought incipient results. Intraspecific variation among *Lucilia eximia* samples was 4.6%, suggesting that the threshold proposed should not be used for all dipteran species without previous analysis of the studied group. *Chrysomya putoria* is polyphyletic according to nuclear and mitochondrial genes. In addition, a set of samples grouped with samples of *C. albiceps* and *C. rufifacies*. Therefore, more studies need to be done to better explain these taxonomic problems.

Key Words: muscoids diptera; scanning electron microscopy; *barcode*

SUMÁRIO

| | |
|--|-----|
| 1. Introdução Geral | 01 |
| | |
| Capítulo I - Ultraestrutura dos Estágios Imaturos de <i>Peckia (Euboettcheria) collusor</i> (Diptera: Sarcophagidae), <i>Lucilia cuprina</i> e <i>Cochliomyia macellaria</i> (Diptera: Calliphoridae), Dípteros Muscoides de Importância Sanitária e Forense | 13 |
| Resumo | 14 |
| Abstract | 15 |
| 1. Introdução | 16 |
| 2. Metodologia | 19 |
| 3. Resultados | 24 |
| 4. Discussão | 54 |
| 5. Conclusões | 62 |
| 6. Referências Bibliográficas | 63 |
| | |
| Capítulo II - Identificação Molecular de Dípteros da Família Calliphoridae de Importância Médica-Veterinária e Forense | 71 |
| Resumo | 72 |
| Abstract | 73 |
| 1. Introdução | 74 |
| 2. Metodologia | 78 |
| 3. Resultados e Discussão | 83 |
| 4. Conclusões | 110 |
| 5. Referências Bibliográficas | 111 |
| | |
| 2. Considerações Finais | 119 |
| 3. Referências Bibliográficas | 121 |
| Anexo A – Artigos Publicados | 131 |

| | |
|--|---------|
| Ultrastructure of immature stages of <i>Peckia (Euboettcheria) collusor</i> (Diptera: Sarcophagidae). <i>Acta Tropica</i> , v. 128, 522-527, 2013. | 132 |
| Ultrastructure of immature stages of <i>Lucilia cuprina</i> (Diptera: Calliphoridae) using scanning electron microscopy. <i>Acta Tropica</i> , v. 136, 123-128, 2014. | 138 |
| Ultrastructure of immature stages of <i>Cochliomyia macellaria</i> (Diptera: Calliphoridae), a fly of medical and veterinary importance. <i>Parasitology Research</i> , v. 113, 3675-3683, 2014. | 144 |
| Anexo B – Tabelas, Matrizes e Árvores de Distância | 153 |
| Tabelas e Matrizes de distância genética construídas pelo método de neighbor-joining e máxima verossimilhança, utilizando o citocromo oxidase I. | 153 |
| Árvores de distância genética construídas pelo método de neighbor-joining e máxima verossimilhança, utilizando o citocromo oxidase I, fator de elongação e gene <i>white</i> | 154 |

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 – Diversidade da Ordem

Os insetos correspondem ao grupo de seres vivos mais diversificado e numeroso do planeta. São cerca de um milhão de espécies já descritas e acredita-se que para cada espécie descrita, outras cinco ainda sejam desconhecidas (GRIMALDI & ENGEL, 2005). Dentro deste grupo, cinco ordens são consideradas megadiversas, Coleoptera, Lepidoptera, Diptera, Hymenoptera e Hemiptera, em ordem decrescente de riqueza de espécies, correspondendo juntas a cerca 903 mil espécies descritas (RAFAEL *et al.*, 2009). Há uma estimativa que, destas, cerca de 153 mil correspondam a representantes da Ordem Diptera (THOMPSON, 2008; WIEGMANN *et al.*, 2011), no entanto o número atual de espécies pode ser muito maior. Segundo CARVALHO *et al.* (2012), o número de espécies desta ordem, no mundo, pode chegar a aproximadamente 400 mil, sendo estimado 60 mil encontradas no Brasil. Atualmente, o número de espécies descritas no Brasil é cerca de 8.700, do total de 31.000 reconhecidas na Região Neotropical (AMORIM, 2009).

1.2 – Filogenia

A monofilia da ordem Diptera é baseada em um número grande e válido de modificações morfológicas ou sinapomorfias, como por exemplo, o desenvolvimento do aparelho bucal adaptado para perfurar e sugar e a transformação do par de asas posterior (metatorácicas) em órgãos de equilíbrio para o voo (halteres ou balancins) (YEATES *et al.*, 2007). Esta última característica, inclusive, auxilia a nomear a ordem, pois com tal alteração, apenas o par de asas anterior é funcional.

Entretanto, a monofilia das categorias inferiores ainda é bastante discutida. Classicamente, os dípteros eram divididos em Nematocera e Brachycera. Os nematóceros compreendem aqueles dípteros que possuem o flagelo antenal fino e com numerosos segmentos, encontrado, por exemplo, nos mosquitos, pernilongos, mosquito-pólvora. Os dípteros braquíceros apresentam flagelo antenal curto e robusto, com a porção final atrofiada formando um estilo ou uma arista, como encontrada nas moscas varejeiras e moscas domésticas.

Mas apenas Brachycera apresenta monofilia aceita, sendo assim, as infraordens dos dípteros nematóceros foram elevadas a subordens (AMORIM & YATES, 2006). Atualmente, a topologia mais aceita corresponde a formação de dois grupos, um deles mais basal composto por Tipulomorpha, Psychodomorpha e Culicomorpha; e outro denominado Neodiptera, formado por Bibionomorpha e Brachycera (WIEGMANN *et al.*, 2011). O grupo Brachycera possui quatro diferentes subgrupos com relações internas mal resolvidas: Tabanomorpha, Stratiomyomorpha, Xylophagomorpha e Muscomorpha. Este último também dividido em

Asiloidea e Eremoneura (subdividido em Empidoidea e Cyclorrhapha). O grupo dos Cyclorrhapha é considerado monofilético por WIEGMANN *et al.* (2011), tendo como características principais a metamorfose do inseto dentro do pupário formado pela quitinização da pele do último instar larval e pela presença de um balão que se enche de hemolinfa e permite que o adulto livre-se do pupário (Schizophora). Ainda segundo estes autores, o grupo Schizophora possui maior diversidade dentro da ordem, com aproximadamente 85 das 157 famílias e cerca de 50 mil espécies. Neste grupo, podemos encontrar ainda os dípteros que não possuem a calíptera (Acalyptratae) e os que possuem a calíptera (Calyptratae), que corresponde a duas expansões laminares localizadas próximas a base das asas (SERRA-FREIRE & MELLO, 2006; GULLAN & CRANSTON, 2008; WIEGMANN *et al.*, 2011). Os caliptratos são conhecidos como dípteros muscoides (SERRA-FREIRE & MELLO, 2006).

1.3 – Importância Médica-Veterinária como Transmissores de Patógenos

Os dípteros muscoides são muito estudados, não só devido à tamanha diversidade do grupo, mas também devido ao alto grau de sinantropia de algumas espécies. Seguindo a definição proposta por NUORTEVA (1963), as moscas sintrópicas são aquelas espécies que aproveitam as condições ambientais criadas pelo homem para melhorar seu desenvolvimento. Ainda segundo este autor, o grau de proximidade de cada espécie com o homem pode ser inferido numericamente através do índice de sinantropia. Além desse, outros índices foram propostos considerando também o tamanho do inseto e a capacidade de contaminação e transmissão de patógenos (MALDONADO & CENTENO, 2003).

Estes índices ajudam a determinar quais espécies possuem maior potencial como transmissoras de patógenos ao homem e assim, auxiliar na determinação de medidas de controle. Muitos estudos foram realizados buscando relacionar e quantificar os patógenos carregados pelas moscas.

Musca domestica Linnaeus, 1758 (Diptera: Muscidae) deve ser, provavelmente, a espécie mais estudada na transmissão de patógenos por apresentar altos níveis de sinantropia e endofilia, ou seja, está intimamente associada com o ambiente doméstico (GREENBERG, 1971; BUTLER *et al.*, 2010). No entanto, algumas espécies da família Calliphoridae também possuem estas características e são consideradas pragas urbanas (GUIMARÃES *et al.*, 1979). No Brasil, na cidade de Manaus, AM, PARALUPPI *et al.* (1996) isolaram seis gêneros de bactérias do revestimento externo de *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1974), *Chrysomya putoria* (Wiedemann, 1818), *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819) e *Lucilia eximia* (Wiedemann, 1819) (Calliphoridae) coletadas em feiras livres, reiterando a importância dessas espécies de moscas como carreadoras de patógenos aos humanos. No Rio de Janeiro, OLIVEIRA *et al.* (2006) isolaram *Escherichia coli*, *Citrobacter* sp., *Proteus mirabilis*, *Morganella* sp., *Klebsiella* sp., *Pseudomonas* sp., *Enterobacter* sp., *Salmonella* em adultos de *C. megacephala* e *M. domestica*.

Escherichia coli sorotipo 0157:H7 apresenta risco conhecido à saúde humana e já foi isolada diversas vezes de diferentes espécies de dípteros muscoides (KOBAYASHI *et al.*, 1999; OLIVEIRA *et al.*, 2006; AHMAD *et al.*, 2007; BUTLER *et al.*, 2010).

Alguns dípteros muscoides picadores, como a mosca dos estábulos *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus, 1758) são muito estudados como transmissores de vírus entre os

animais e destes ao homem como, por exemplo, o vírus do Oeste do Nilo (*West Nile Virus Fever*) (JOHNSON *et al.*, 2010; BALDACCHINO *et al.*, 2013).

Além destes patógenos, helmintos intestinais como *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Strongyloides stercoralis*, *Taenia* spp. e protozoários *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba coli*, *Giardia lamblia* e *Cryptosporidium* sp. foram isolados de moscas das espécies *Chrysomya rufifacies* (Macquart, 1843), *M. domestica*, *Musca sorbens* (Wiedemann, 1830), *Lucilia cuprina* (Wiedemann, 1830), *Sarcophaga* sp., *Calliphora vicina* Robineau-Desvoidy, 1830 e *Wohlfahrtia* sp. (UMECHÉ & MANDAH, 1989; GETACHEW *et al.*, 2007).

Acredita-se que o importante papel das moscas como transmissoras de patógenos está relacionado com a sua habilidade de voar grandes distâncias, algumas espécies podem voar até 3km ao dia (GUIMARÃES *et al.*, 1979). Mas, além disso, a sua elevada atração tanto por matéria orgânica em decomposição, assim como por locais onde o alimento é processado e estocado (OLSEN, 1998).

1.4 - Importância Médica-Veterinária como Causadores de Miíases

As larvas de dípteros muscoides podem se desenvolver em tecidos do homem e de outros animais, onde elas evoluem como parasitos. Algumas espécies são parasitas obrigatórias e as larvas são denominadas biontófagas, pois se alimentam em tecido vivo, por exemplo: *Dermatobia hominis* (Diptera: Oestridae) e *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae). Outras espécies são consideradas parasitas facultativas e suas larvas são denominadas necrobiontófagas ou necrófagas, pois têm a capacidade de se alimentar de tecido necrosado que pode estar em um organismo vivo ou não. Como exemplo desse último tipo, podemos citar: *Cochliomyia macellaria* (Fabricius, 1775) (Diptera: Calliphoridae) e representantes dos gêneros *Chrysomya*, *Lucilia*, *Fannia* e *Muscina* (Diptera: Calliphoridae), além de alguns membros da família Sarcophagidae (GUIMARÃES & PAPAVERO, 1999; REY, 2010).

A infestação por estas larvas causa um prejuízo grande para a criação de animais em larga e pequena escala. Segundo GRISI *et al.* (2002), as perdas econômicas podem chegar até US\$ 150 milhões por ano, no Brasil. Os danos ao animal vão desde ao aumento da irritabilidade, diminuição do apetite, anemia, levando a perda de peso, diminuição na produção de leite, até mesmo a mastites e infecções graves em umbigos de recém-nascidos, que podem levar ao desmame prematuro e a morte (BARROS & VAZQUEZ *et al.*, 2004; HALL & WALL, 1995; DUARTE *et al.*, 2012).

1.5 – Importância Forense

As moscas se destacam também entre o grupo dos decompositores, pois algumas espécies são capazes de colonizar rapidamente diversos habitats devido a sua atração pelo odor exalado durante o processo de decomposição e ao fato de serem ágeis e boas voadoras.

A Entomologia Forense é o estudo dos insetos e outros artrópodes associados a eventos criminais, com o objetivo de fornecer informações úteis à investigação (KEH, 1985). Tradicionalmente, pode ser subdividida em três áreas: **Urbana** (abrange os insetos que afetam

o homem e seu ambiente); **Pragas de produtos armazenados** (relacionada com insetos ou parte deles que são encontrados contaminando alimentos, por isso possuem grande importância econômica); **Médico-Legal** (relacionada com os componentes criminais do sistema legal, enfocando os insetos necrófagos) (LORD & STEVENSON, 1986). Além destas, duas novas áreas foram propostas: **Toxicológica** (relacionada com a utilização de insetos para a detecção de drogas e toxinas presentes em tecidos, além de verificar os efeitos destas substâncias sobre o desenvolvimento destes insetos, também conhecida como Entomotoxicologia) e **Ambiental** (relacionada com o uso de insetos como auxílio na apuração de crimes como biopirataria e impacto ambiental) (INTONA *et al.*, 2001).

Algumas espécies de moscas são capazes de detectar o odor dos cadáveres rapidamente, pois possuem especial atração por tecido necrosado.

Segundo diversos autores, os dípteros muscoides são os primeiros insetos a chegar aos cadáveres e possuem a habilidade de ovipor logo após encontrá-lo (SMITH, 1986; CARVALHO *et al.*, 2000). Além disso, as larvas são responsáveis por cerca de 90% da degradação da massa corpórea, desempenhando importante função ecológica como decompositoras (SALVIANO *et al.*, 1996) e podem ser encontradas na maioria dos cadáveres investigados (SALVIANO *et al.*, 1994; SOUZA, 1994; OLIVEIRA-COSTA, 2003). Acredita-se que a decomposição do cadáver é mais rápida quando ocorre na presença de insetos (PAYNE, 1965; JIRÓN & CARTÍN, 1981).

A aplicação mais comum dos insetos na entomologia forense é a estimativa do intervalo pós-morte (IPM), que é o intervalo de tempo entre a morte e quando o corpo é encontrado. Isso pode ser determinado através do período mínimo de atividade do inseto no corpo em decomposição. Do mesmo modo, os insetos também podem sugerir movimentações do cadáver após a morte, auxiliar na avaliação de ferimentos feitos no corpo, relacionar causas e circunstâncias em que ocorreu a morte, comparar um suspeito à cena do crime e, mais recentemente, na investigação de substâncias tóxicas (CATTS & GOFF, 1992; ANDERSON, 1999; BENECKE, 2004; CARVALHO *et al.*, 2001).

Em situações mais extremas, quando os tecidos ou líquidos corpóreos não estão mais disponíveis e o cadáver se encontra em estágios avançados de decomposição, imaturos de dípteros muscoides podem ser utilizados como fonte de material para a determinação de presença de substâncias tóxicas, drogas e até mesmo fármacos. Isto se deve ao fato de que tais organismos não metabolizam essas substâncias e estas permanecem na cutícula e podem ser identificadas muitos dias e até mesmo anos após a morte (GOFF *et al.*, 1989; GOFF & LORD, 1994; INTONA *et al.*, 2001; CAMPOBASSO *et al.*, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2009).

De acordo com BOUREL *et al.* (2003), embora os insetos ainda não sejam amplamente utilizados na determinação do intervalo pós-morte, estes devem ser usados para complementar às técnicas tradicionais, que se tornam imprecisas à medida que este intervalo aumenta. Os métodos histológicos, químicos, bacteriológicos e fenômenos cadavéricos também são utilizados por legistas para a determinação do intervalo pós-morte. No entanto, 72-96 horas após a morte, os insetos servem como o instrumento de maior precisão para a estimativa do intervalo pós-morte (KASHYAP & PILLAI, 1989).

Recentemente, muitos estudos relacionados a entomofauna buscam definir grupos de insetos como indicadores forenses, ou seja aquelas espécies que efetivamente buscam o cadáver para o desenvolvimento de suas formas imaturas (BARBOSA *et al.*, 2010; VASCONCELOS *et al.*, 2013). Muitas espécies de Diptera pertencentes às famílias

Calliphoridae, Sarcophagidae, Fanniidae, Muscidae e Phoridae têm sido associadas a corpos em decomposição por diversos pesquisadores de diferentes institutos de investigação criminal e de pesquisa (SMITH, 1986; OLIVA, 1997; BARBOSA *et al.*, 2010).

1.6 – Problemas na Identificação

A identificação correta das espécies que estão associadas a corpos ou carcaças é um passo essencial para as análises forenses. Algumas espécies filogeneticamente próximas e com morfologia semelhante podem apresentar taxas de crescimento, resposta a diapausa e ecologia diferente (KAMAL, 1958; ASH & GREENBERG, 1975; KURAHASHI, 1982).

A diferenciação dos dípteros muscoides de importância médica-veterinária e forense normalmente é realizada através do adulto, pois a identificação dos imaturos é muito difícil e até mesmo, em alguns casos, impossível (SCHROEDER *et al.*, 2003; MENDONÇA *et al.*, 2008; WELLS & STEVENS, 2008; MENDONÇA *et al.*, 2010). Para a maioria das espécies de dípteros muscoides existem chaves dicotômicas de identificação de adultos (ALBUQUERQUE *et al.*, 1981; CARVALHO, 2002; CARVALHO *et al.*, 2002; MELLO, 2003; CARVALHO & MELLO-PATIU, 2008; FLOREZ & WOLFF, 2009). No entanto, grande parte dos espécimes encontrados nos cadáveres corresponde às fases imaturas (ovos, larvas e pupas) que não apresentam diferenças morfológicas visíveis a olho nu ou ao microscópio óptico (SMITH, 1986; QUEIROZ *et al.*, 1997; ANDERSON, 1999; BYRD & CASTNER, 2001). Isso se dá devido à ausência de caracteres diagnósticos específicos para imaturos, além de variações intraespecíficas observadas em algumas regiões geográficas (LIU & GREENBERG, 1989; GREENBERG & SINGH, 1995).

Como tentativa de contornar este problema, realiza-se a criação dos imaturos até a fase adulta a fim de identificá-los, mas em muitos casos criminais, a coleta no local do crime é realizada por pessoas não treinadas que matam ou fixam o material, impedindo a finalização do seu desenvolvimento e, conseqüentemente, a identificação taxonômica das espécies envolvidas (PUJOL-LUZ *et al.*, 2006).

Um entrave para a criação dos imaturos até a fase adulta de maneira bem sucedida é o acompanhamento dos fatores abióticos, como luminosidade, temperatura e umidade, que precisam ser mantidos similares aqueles da região de onde as larvas foram retiradas, caso não sejam mantidos, poderá ocorrer imprecisões com relação à determinação da idade dos imaturos, bem com sua morte.

A criação de imaturos de moscas demanda tempo para o desenvolvimento completo da espécie, pois o ciclo biológico de muitas espécies ainda é desconhecido. Além disso, é necessário um laboratório adequado para a criação destes insetos devido ao substrato preferencial de criação, que pode ser fezes, carne bovina, suína, de peixe, vísceras de frango putrefata (OLIVEIRA-COSTA *et al.*, 2013). Este laboratório de criação de dípteros precisa seguir as normas de biossegurança a fim de evitar a contaminação dos pesquisadores (OLIVEIRA-COSTA *et al.*, 2013).

Nos casos criminais, a rápida determinação do intervalo pós-morte é crucial à investigação. Frequentemente, não há tempo hábil para a criação dos imaturos até a emergência dos adultos, além disso, os espécimes podem morrer antes da identificação em nível específico, impedindo assim a análise de evidências criminais importantes (OLIVEIRA-COSTA, 2007).

1.7 – Identificação Através da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Uma alternativa para minimizar a dificuldade da criação dos dípteros muscoides de importância forense e sanitária, seria a utilização da microscopia eletrônica de varredura (MEV), que é uma técnica mais apurada e permite a visualização precisa de caracteres diagnósticos ainda nas fases imaturas.

Esta técnica vem sendo utilizada por diversos autores na identificação de ovos, larvas e pupas de dípteros muscoides, principalmente com espécies australianas (KITCHING, 1976), britânicas (ERZINCIOGLU, 1989), peruanas (GREENBERG & SZYSKA, 1984), norte-americanas (LIU & GREENBERG, 1989; GREENBERG & SINGH, 1995) e tailandesas (SUKONTASON *et al.*, 2004, 2005 e 2006). Recentemente, algumas descrições de espécies coletadas no Brasil foram publicadas (THYSSEN, 2005; THYSSEN & LINHARES, 2007; CARVALHO, 2006; MENDONÇA *et al.*, 2008; MENDONÇA *et al.*, 2010; MENDONÇA *et al.*, 2012a, 2012b; MENDONÇA *et al.*, 2013; MENDONÇA *et al.*, 2014a, 2014b), mas ainda não abrange a diversidade de espécies de importância forense do país.

Nosso país possui dimensões continentais e é constituído por vários biomas com composição biótica e abiótica bem variável e, conseqüentemente com riqueza e diversidade de espécies também bastante específica. Alguns autores ressaltam que podem ocorrer algumas variações morfológicas entre populações de dípteros de regiões geográficas e biomas diferentes (GREENBERG & SINGH, 1995), principalmente em casos onde haja introdução de novas espécies e isolamento de outras, como no caso de *Cochliomya macellaria* (Diptera: Calliphoridae).

Desta forma, com os estudos ainda tão incipientes, não existem chaves de identificação de imaturos no Brasil que forneçam caracteres morfológicos diagnósticos que englobem a diversidade de espécies de importância forense no país. Assim, a elaboração de um banco de dados baseados em micrografias eletrônicas poderia auxiliar peritos, investigadores e pesquisadores na identificação de imaturos de dípteros em qualquer lugar em que estes imaturos ocorram.

1.8 – Identificação Através de Caracteres Moleculares (Código de Barras)

Atualmente, com todos os problemas relacionados à coleta dos espécimes, criação até a fase adulta e ausência de chaves de identificação abrangentes, a busca por novas formas de identificar os dípteros muscoides é constante.

A biologia molecular tem se popularizado a cada dia e técnicas rotineiras usadas em laboratórios forenses também podem ser utilizadas na identificação de insetos. Segundo WELLS & STEVENS (2008), a determinação de espécies através da genotipagem tem sido a única técnica usada rotineiramente por entomologistas forenses na Europa e nos Estados Unidos.

A utilização de sequências de DNA para a taxonomia de espécies da ordem Diptera data de meados da década de 1990. De acordo com MEIER & ZHANG (2009), essa ampla utilização ocorreu devido ao grande número de espécies de dípteros economicamente

importantes (hematófagos, fitófagos e forenses), as dificuldades de identificações através de métodos tradicionais e aos estudos genéticos conduzidos massivamente com espécies dos gêneros *Drosophila* Fallén e *Anopheles* Meigen. Isso levou a facilidade no desenho de iniciadores e a consequente obtenção de um grande número de sequências de dípteros.

As análises moleculares apresentam vantagens claras quando comparadas a taxonomia clássica (óptica ou eletrônica de varredura) como, por exemplo, não necessitar do inseto inteiro para que sejam realizadas as análises, assim como pode ser utilizada em qualquer estágio de desenvolvimento e como quantidades ínfimas de material. Outra vantagem seria a necessidade apenas de treinamento para a execução dos procedimentos técnicos, sem que fosse preciso conhecimentos sobre biologia ou criação dos dípteros, tornando o trabalho de peritos criminais mais simples e rápido.

Os marcadores moleculares podem ser definidos como qualquer segmento específico do DNA que pode ser utilizado para distinguir entidades geneticamente diferentes (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998; SANDOVAL, 2011). Vários marcadores moleculares foram propostos para fornecer um diagnóstico espécie-específico para dípteros, dentre os principais podemos citar: citocromo c oxidase subunidades I e II, 28S do RNA ribossomal, espaçadores transcritos internos (ITS1 e ITS2) e microssatélites (STEVENS & WALL, 2001; HEBERT *et al.*, 2003; BEHURA, 2006; NELSON *et al.*, 2007; MEIER & ZHANG, 2009).

No entanto, o DNA mitocondrial é a região mais utilizada, pois apresenta herança materna, é haploide e possui alta taxa evolutiva, além disso, nos insetos é flanqueado por regiões bastante conservadas, facilitando a amplificação (SIMON *et al.*, 1994; BEHURA, 2006). Dentro do genoma mitocondrial, a região de escolha é o gene do citocromo c oxidase subunidade I (*coI*), pois é um gene que codifica uma proteína e não apresenta íntrons. Segundo MEIER & ZHANG (2009), *coI* é o gene com cobertura mais ampla entre os táxons de Diptera.

Baseado na necessidade de identificar mais rapidamente as espécies, HEBERT *et al.* (2003) propuseram a utilização de uma região do DNA que funcionasse como um código de barras para a identificação das espécies existentes e assim, consequentemente, permitir a delimitação e descoberta de novas espécies. Esta iniciativa recebeu o nome de “*The Barcode of Life Project*” (Projeto do Código de Barras da Vida) e tem como objetivo desenvolver um sistema universal para identificação de todos os seres eucarióticos baseado em uma abordagem molecular padronizada (MILLER, 2007). Este é um projeto reúne pesquisadores de diversas universidades e centros de pesquisas no mundo, agrupados pelo “*Consortium for the Barcoding of Life*” (<http://www.barcoding.si.edu>).

A região eleita como região *barcode* foi uma porção de 648pb do gene do citocromo c oxidase subunidade I (*coI*), posições 1490-2198 no final da porção 5', tendo como referência o genoma mitocondrial de *Drosophila yakuba* (Burla, 1954) (Diptera: Drosophilidae). No entanto, poucos são as sequências disponíveis nos bancos de dados contendo informações de espécies de dípteros de importância médica-veterinária e forense, principalmente com amostras coletadas no Brasil.

Alguns pesquisadores analisaram a região *coI* completa de espécies de dípteros muscoides, mas são poucos os registros na literatura de análises de espécies coletadas no Brasil (WELLS & SPERLING 1999, 2001; WALLMAN & DONNELLAN, 2001; WELLS *et al.*, 2007; BOEHME *et al.*, 2012). Além disso, a região *barcode* foi analisada apenas por NELSON *et al.* (2007) que estudaram espécies do gênero *Chrysomya* Robineau-Desvoidy coletadas na

Austrália; RAMARAJ *et al.* (2014) que identificaram, pela primeira vez, a variante sinantrópica de *C. megacephala* ocorrendo no sudeste da Índia através do *barcode*.

1.9 – Família Calliphoridae

Esta família é representada por aproximadamente 108 gêneros com total de 1.526 espécies no mundo (THOMPSON, 2008). No Novo Mundo, são cerca de 20 espécies endêmicas e 4 introduzidas, distribuídas em 7 gêneros: *Chloroprocta* van der Wulp, *Cochliomyia* Townsend, *Compsomyops* Townsend, *Chrysomya*, *Hemilucilia* Brauer, *Lucilia* Robineau-Desvoidy e *Paralucilia* Brauer & Bergenstamm (THOMPSON, 2008).

Moscas desta família são conhecidas popularmente como moscas varejeiras e apresentam características biológicas e comportamentais bastante diversificadas, entretanto, a variação morfológica dentro dos gêneros é pequena.

Apresentam larvas vorazes e extremamente competitivas pelos recursos alimentares. No entanto, não são restritas a necrofagia, algumas espécies podem se alimentar de tecido vivo, bem como de matéria orgânica vegetal e lixo orgânico (FERREIRA *et al.*, 1995).

No Brasil, BARBOSA *et al.* (2010) relataram que as três espécies mais abundantes de dípteros coletadas em carcaças de *Sus scrofa* (porco doméstico) no Rio de Janeiro eram pertencentes a esta família, reiterando a condição de indicadoras forenses já proposta por outros autores (SALVIANO *et al.*, 1996; CARVALHO *et al.*, 2000; THYSSEN, 2000).

Os gêneros que apresentam maior importância forense são *Chrysomya*, *Cochliomyia*, *Lucilia* e *Hemilucilia*, tendo sido relatados por diversos autores como colonizadores de todos os estágios de decomposição (MONTEIRO-FILHO & PENEREIRO, 1987; BARBOSA *et al.*, 2010; CARVALHO *et al.*, 2000).

Segundo PRADO & GUIMARÃES (1982), a introdução das quatro espécies representantes do gênero *Chrysomya* no Brasil data de 1975, coincidindo com a chegada de refugiados africanos oriundos de Angola e Moçambique (GUIMARÃES *et al.*, 1979). As espécies introduzidas no Brasil foram *C. albiceps*, *C. megacephala*, *C. putoria* e *C. rufifacies*, sendo esta última relatada pela primeira vez em nosso território por SILVA *et al.* (2012). Atualmente, as três primeiras espécies são coletadas abundantemente nas cinco regiões geográficas do país.

As espécies do gênero *Chrysomya* apresentam rápido crescimento populacional e elevada taxa de dispersão, desta forma, acredita-se que estas características tenham facilitado o deslocamento e a supressão de algumas espécies nativas da região (GUIMARÃES *et al.*, 1979). LINHARES (1981) e FERREIRA (1983) associaram a redução da população nativa de *C. macellaria* coletadas em Campinas, SP e Goiânia, GO, respectivamente, a presença de *C. putoria*, que ocuparia nicho semelhante à espécie nativa. FERREIRA (1983) relatou a redução de mais de 70% da frequência da espécie nativa nas coletas e um aumento proporcional da espécie introduzida.

Os imaturos deste gênero apresentam preferência alimentar bastante ampla, variando de fezes de animais e humanos a frutas e carcaças. São consideradas também espécies endófilas, pois frequentemente invadem casas em busca de locais para postura (BAUMGARTNER & GREENBERG, 1984). Devido a esses hábitos e a elevada prevalência, as

espécies do gênero *Chrysomya* são relatadas como causadoras de miíases secundárias no homem e em outros animais (GUIMARÃES & PAPAVERO, 1999; QUEIROZ *et al.*, 1997; SUKONTASON *et al.*, 2005).

As moscas do gênero *Lucilia* apresentam o comportamento sinantrópico típico e também estão associadas aos humanos e seus habitats, sendo frequentemente encontradas em carcaças e lixões (NORRIS, 1965; LINHARES, 1981; D'ALMEIDA & LOPES, 1983; FERREIRA & LACERDA, 1993). São espécies bastante estudadas devido ao comportamento biontófago das suas larvas, em casos de infestações artificiais em ovelhas lanadas no Brasil, como causadoras de miíases primárias em ovinos na Austrália e em seres humanos, em outros países (ZUMPT, 1965; TOWNEND, 1987; MOREIRA-LIMA & MOYA-BORJA, 1997; ABOSERA & MORSY, 2013; MISRA *et al.*, 2013).

Segundo EARLY & GOFF (1986), *L. cuprina* é uma espécie dominante durante a fase de decomposição ativa da carcaça, sendo responsável pela remoção de grande quantidade de material. Entretanto, a frequência de adultos desta espécie foi baixa em experimentos realizados no Rio de Janeiro (SALVIANO *et al.*, 1996; BARBOSA, 2008; CAETANO, 2012).

Lucilia eximia é uma espécie pioneira na decomposição e pode ser considerada uma espécie chave na estimativa do intervalo pós-morte, pois não apresenta tendências sazonais e com relação ao habitat (MOURA *et al.*, 1997), além de estar relacionada aos primeiros dias de decomposição (estágios fresco e gasoso) (BARBOSA, 2008; CAETANO, 2012).

As duas espécies representantes do gênero *Hemilucilia* apresentam comportamento e morfologia bastante semelhantes, compartilhando os mesmos recursos, mas com diferentes taxas de crescimento e maturação. *Hemilucilia semidiaphana* (Rondani, 1950) e *H. segmentaria* (Fabricius, 1805) são endêmicas das Américas do Sul e Central e estão associadas a ambientes florestais, sendo raramente encontradas em áreas urbanas, isso as torna espécies indicadoras de movimentação de cadáveres (DEAR, 1985; CARVALHO *et al.*, 2000). São espécies necrófagas e as larvas geralmente se alimentam de matéria orgânica em decomposição e fezes (LINHARES, 1981; THYSSEN & LINHARES, 2007). Outras duas espécies do gênero, *Hemilucilia benoisti* Séguy, 1925 e *Hemilucilia souzalopesi* Mello, 1972 são restritas a região Sul do país (CARVALHO & RIBEIRO, 2000).

Apesar de não existirem relatos na literatura que apontam estas espécies como causadoras de miíases, *H. segmentaria* foi coletada carregando ovos de *D. hominis*, espécie causadora de miíase primária, na Reserva Biológica do Tinguá, Rio de Janeiro, RJ (MARINHO *et al.*, 2003). Larvas desta espécie foram coletadas pela primeira vez em cadáveres humanos por KOSMANN *et al.* (2011), em Minas Gerais. Entretanto, larvas das duas espécies do gênero foram observadas colonizando carcaças de animais em regiões de mata por diversos autores (CARVALHO *et al.*, 2000; MARINHO *et al.*, 2003). VASCONCELOS *et al.* (2013) observaram que as espécies deste gênero foram encontradas visitando a carcaça suína minutos após a morte e também colonizando este recurso, correspondendo a aproximadamente 60% dos adultos emergidos oriundos da carcaça.

O gênero *Cochliomyia* é endêmico do Novo Mundo onde está representado por quatro espécies: *C. hominivorax* (Coquerel, 1858), *C. aldrichi* Del Ponte, 1938, *C. minima* Shannon, 1962 e *C. macellaria* (Fabricius, 1775) (GUIMARÃES & PAPAVERO, 1999). No Brasil, apenas *C. hominivorax* e *C. macellaria* são encontradas (GUIMARÃES & PAPAVERO, 1999).

As larvas de *C. hominivorax* são causadoras de miíases primárias, uma vez que são parasitas obrigatórias de animais pecilotérmicos. Os adultos são conhecidos por moscas das

bicheiras, pois causam feridas consideráveis em animais domésticos, selvagens e até mesmo em humanos (CRAMER-RIBEIRO *et al.*, 2002; NASCIMENTO *et al.*, 2005; THYSSEN *et al.*, 2012).

Cochliomyia macellaria é conhecida como causadora de miíase secundária, uma vez que se alimenta de tecido necrosado, contribuindo assim para o agravamento de uma infecção já estabelecida, bem como aumentando o número de infecções secundárias (GOMES *et al.*, 2000). Além disso, apresentam importância médica-veterinária, pois também foi observada carregando ovos de *D. hominis*, espécie que causa grandes perdas econômicas ao gado (GRISI *et al.*, 2002).

Como já foi relatado anteriormente, *C. macellaria* era coletada em grande frequência em experimentos utilizando-se carcaças de animais como isca, mas com a introdução das espécies do gênero *Chrysomya*, sua frequência tem sido bastante pequena nos experimentos de campo. Há relatos na literatura de imaturos desta espécie associados a cadáveres humanos em Pernambuco e na cidade de Cali, na Colômbia (BARRETO *et al.*, 2002; OLIVEIRA & VASCONCELOS, 2010).

1.10 – Família Sarcophagidae

Esta família é composta por 3.073 espécies distribuídas em 355 gêneros no mundo, catalogadas por PAPE (1996) (THOMPSON, 2008). Ainda segundo este autor, 750 espécies são encontradas na região Neotropical, a maioria delas em áreas tropicais e temperadas mais quentes. São reconhecidas três subfamílias: Miltogramminae, Paramacronychiinae e Sarcophaginae (PAPE, 1996).

Apenas os imaturos da subfamília Sarcophaginae se alimentam de excrementos e matéria orgânica em decomposição, desempenhando papel importante para a entomologia forense (BYRD & CASTNER, 2001). De um modo geral, acredita-se que as espécies da família Calliphoridae são as pioneiras a chegar a uma carcaça (SMITH, 1986), no entanto diversos autores relatam a presença de sarcófagídeos desde os primeiros dias após a morte permanecendo até estágios bem avançados de decomposição (BENECKE *et al.*, 2004; VASCONCELOS *et al.*, 2013).

As fêmeas desta família são larvíparas, em contraste com as fêmeas pertencentes ao grupo dos califorídeos que são ovíparas, isso configura uma vantagem para este grupo, pois permite que as larvas atinjam a carcaça, mesmo no caso onde barreiras físicas que impeçam a chegada do adulto (DENNO & COTHRAN, 1976). As larvas da maioria dos sarcófagídeos são bem maiores do que as de outras famílias, isso faz com que estes imaturos sejam preferencialmente coletados por peritos inexperientes que acreditam que estas sejam as larvas mais antigas da carcaça. Existem relatos de membros desta família se desenvolvendo em carcaças de animais e cadáveres humanos (SALVIANO *et al.*, 1996; BARBOSA *et al.*, 2009; CARVALHO & LINHARES, 2001).

Os sarcófagídeos apresentam alta diversidade em coletas utilizando-se carcaças de animais como isca (SALVIANO *et al.*, 1994; CARVALHO & LINHARES, 2001; OLIVEIRA-COSTA *et al.*, 2001). Ainda segundo estes autores, os gêneros *Peckia* Robineau-Desvoidy e *Oxysarcodexia* Townsed apresentam maior abundância e riqueza de espécies no Brasil.

Devido a atratividade por matéria orgânica em decomposição, além de substâncias fermentadas, sangues e feridas, alguns representantes desta família apresentam destacada importância como transmissores de patógenos (MARCHENKO, 1985). Alguns autores relatam

ainda míases em animais e humanos causados por espécies de sarcófagídeos (SOUZA *et al.*, 1990; GUIMARÃES & PAPAVERO, 1999).

As espécies desta família possuem a morfologia muito semelhante e a taxonomia é realizada através da genitália do macho; fêmeas e imaturos são muito difíceis de serem identificados. CARVALHO & MELLO-PATIU (2008) elaboraram uma chave com desenhos de genitálias de machos de diversas espécies de importância forense na América o Sul. VAIRO (2011) prepararam uma chave pictórica com fotografias de microscopia óptica de genitálias de machos da região Sul do Brasil. No entanto, a maior parte dos espécimes coletados nas carcaças correspondem aos imaturos e as fêmeas, que buscam este recurso com fonte alimentar para sua prole. Desta forma, as formas de identificação dos membros desta família ainda permanecem problemáticas.

Com o objetivo de abordar de maneira mais clara as duas metodologias utilizadas na identificação dos dípteros muscoides, este estudo foi dividido em dois capítulos. As espécies que foram utilizadas para a caracterização molecular já possuem descrições através da microscopia eletrônica de varredura (MENDONÇA *et al.*, 2008, 2010, 2012a, 2012b; SUKONTASON *et al.*, 2006; THYSSEN, 2005; THYSSEN & LINHARES, 2007).

No primeiro capítulo, foi realizada a caracterização morfológica de imaturos, através da microscopia eletrônica de varredura, de três espécies de dípteros muscoides: *Peckia (Euboettcheria) collusor* (Diptera: Sarcophagidae), *Lucilia cuprina* e *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae), espécies de importância médica-veterinária e forense.

No segundo capítulo, foi realizada a caracterização molecular de nove espécies de dípteros muscoides, através da região *barcode*. Para isso, foram analisadas as espécies *Chrysomya albiceps*, *C. megacephala*, *C. putoria*, *C. rufifacies*, *Lucilia cuprina*, *Hemilucilia segmentaria*, *H. semidiaphana*, *Chloroprocta idioidea* e *Cochliomyia macellaria*. Além disso, buscou-se diferenciar geneticamente as espécies introduzidas no Brasil do gênero *Chrysomya*, assim como avaliar os genes nucleares fator de alongação 1 alfa (EF- α 1) e white (wec) como marcadores para a identificação de dípteros das espécies da família Calliphoridae.

CAPÍTULO I

ULTRAESTRUTURA DOS ESTÁGIOS IMATUROS DE *PECKIA*
(*EUBOETTCHERIA*) *COLLUSOR* (DIPTERA: SARCOPHAGIDAE), *LUCILIA CUPRINA* E
COCHLIOMYIA MACELLARIA (DIPTERA: CALLIPHORIDAE), DÍPTEROS
MUSCOIDES DE IMPORTÂNCIA SANITÁRIA E FORENSE

RESUMO

Os dípteros caliptratos são insetos com destacada importância econômica, em saúde pública e para as ciências forenses, devido às diversas maneiras que podem se relacionar com o homem. Os adultos são conhecidos vetores de patógenos e atuam como agentes irritantes e espoliadores de animais de produção. Os imaturos de algumas espécies podem ser parasitas de diversos animais e do homem, causando míases. No entanto, as larvas também apresentam reconhecido valor na determinação do intervalo pós-morte (IPM), principal questão a ser respondida pela Entomologia Forense, uma vez que os dípteros muscoides são os primeiros a chegar ao cadáver e podem ovipor ou larvipor imediatamente. Desta forma, o conhecimento preciso da morfologia dos imaturos que colonizam as carcaças será mais uma ferramenta para auxiliar pesquisadores, peritos e investigadores. Os imaturos presentes nas carcaças possuem uma uniformidade morfológica, sendo praticamente indistinguíveis a olho nu e, em alguns casos também com microscópio de luz. Assim, a microscopia eletrônica de varredura fornece caracteres mais apurados que podem ser utilizados na identificação das espécies. Esse trabalho teve como objetivo caracterizar os imaturos de três espécies de dípteros muscoides de importância sanitária e forense: *Peckia (Euboettcheria) collusor* (larvas e pupários), *Lucilia cuprina* (larvas e pupários) e *Cochliomyia macellaria* (ovos, larvas e pupários) através da microscopia eletrônica de varredura. Foram analisados 30 exemplares de cada estágio provenientes de colônias de laboratório. Ovos e larvas foram transferidos para placas de Petri contendo hidróxido de sódio e lavados com água destilada. Depois foram fixados com solução de glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio e pós-fixados em tetróxido de ósmio, desidratados em séries crescentes de acetona e submetidos ao método de secagem pelo ponto crítico, montados em suportes metálicos e cobertos por ouro, para permitir a visualização ao microscópio eletrônico de varredura. Pupas com 48 a 72 horas de formação foram lavadas, congeladas e depois montadas em suportes metálicos e cobertas por ouro para observação. Os ovos de *C. macellaria* apresentam as células que formam o exocócion do mesmo tamanho por todo o ovo. Esta característica que permite diferenciá-los de *C. hominivorax* que apresenta células menores na região posterior do ovo. A área mediana termina afilada na região posterior e bifurcada na região anterior, além disso, foram observados orifícios nas ilhas da área mediana. Estas características combinadas distinguem *C. macellaria* de representantes de *Chrysomya*. As larvas das três espécies são muito semelhantes. As papilas do complexo do palpo maxilar em uma cavidade parecem ser específicas do subgênero *Euboettcheria*. As aberturas respiratórias do espiráculo anterior dispostas em fileiras irregulares são exclusivas da família Sarcophagidae. A presença de espinhos filamentosos no último segmento larval é característica específica do gênero *Lucilia*. Além disso, os pupários desta espécie foram os únicos que apresentaram uma linha longitudinal lateral no tórax e uma constrição no abdômen. As larvas de primeiro instar de *C. macellaria* apresentam duas aberturas respiratórias no espiráculo posterior e esta é uma característica restrita a este gênero. A ausência de espinhos no espiráculo posterior de *C. macellaria* a diferencia de *C. hominivorax*. Este estudo permitiu destacar diversas características que podem ser combinadas para identificar as espécies de importância sanitária e forense.

Palavras-chave: Moscas; Imaturos; Entomologia Médica-Veterinária

ABSTRACT

Muscoids diptera are insects with considerable importance in public health and also in forensic sciences because of how they are related to man. The imagos are known as pathogen vectors and act as irritants and spoilers of livestock. Larvae can be parasites of many animals and also humans, causing myiasis. These larvae, however, can also be useful to determine the *post-mortem* interval (PMI), the main question in Forensic Entomology, since the flies are the first insects to arrive at a dead body and can oviposit / larviposit on a dead body immediately after arrival. The knowledge of the correct morphology of the immature insects that colonize the carcasses will be an important tool to help forensic investigators and researchers. Immatures found on a carcass are morphologically similar to each other and it is impossible to distinguish among them using light microscope. Therefore, scanning electron microscopy gives detailed information on the morphological characters, which can help identify the immature forms of the flies. The aim of this study is to identify immature of three muscoids with forensic and sanitary importance using this methodology: *Peckia (Euboettcheria) collusor* (larvae and puparia), *Lucilia cuprina* (larvae and puparia) e *Cochliomyia macellaria* (eggs, larvae and puparia). Thirty samples from each instar were observed and observed in a scanning electron microscope. The chorionic structure showed an hexagonal pattern and regular size in eggs of *C. macellaria*. This characteristic could discern from *C. hominivorax*, where the size of chorionic cells is smaller at the posterior end of the egg. The median area end is tapered at the posterior region, and bifurcated at anterior region, in addition, some perforations could be observed in the islands inside the median area. The combination of these characters could distinguish *C. macellaria* from other species of the genus *Chrysomya*. The larvae of the three studied species were very similar. The papillae found on the maxillary palp complex seem to be specific to the subgenus *Euboettcheria*. The respiratory openings of the anterior spiracle disposed in irregular rows are exclusively found in Sarcophagidae. The presence of filamentous spines on the last anal segment are only found in the genus *Lucilia*. Additionally, the puparia of this species were the only ones to display a longitudinal ridge, which is a continuous lateral line along the thoracic segments, and a constriction of the abdomen. The first instar larvae of *C. macellaria* present two respiratory openings at the posterior spiracle, which is a feature restricted to this genus. The absence of spines on the posterior spiracle also can distinguish between *C. macellaria* from *C. hominivorax*. This study helped to highlight many features that can be used to identify the species of sanitary and forensic importance.

Key Words. Fly, Immature, Veterinary Entomology

1. INTRODUÇÃO

Os dípteros muscoides estão entre os grupos de insetos com maior diversidade de espécies do planeta (GRIMALDI & ENGEL, 2005). Esses insetos apresentam destacada importância para a medicina humana, veterinária e para as ciências criminais, devido, principalmente a diferença de habitats onde os adultos e imaturos vivem. Essa diferença faz com que estes insetos sejam conhecidos vetores de patógenos e causadores de míases, além de serem coletados em abundância colonizando cadáveres.

As larvas de moscas podem se desenvolver em matéria orgânica de origem animal e vegetal em diferentes estágios de decomposição. Assim, os adultos que buscam estes ambientes como locais de cópula e para postura de seus imaturos podem carrear patógenos aderidos a superfície corporal que é recoberta por cerdas. Diversos autores analisaram não só a parte externa do corpo, bem como o conteúdo intestinal dessas moscas e relataram a presença de patógenos causadores de doenças nos homens e em outros animais (FURLANETTO *et al.*, 1984; QUEIROZ *et al.*, 1999; OLIVEIRA *et al.*, 2002). Além da visita a locais insalubres, algumas espécies de muscoides apresentam altos índices de sinantropia e endofilia, ou seja, são espécies que vivem em contato direto com o homem e com a sua residência, o que pode aumentar significativamente a transmissão de patógenos (MALDONADO & CENTENO, 2003).

Além de vetores mecânicos de patógenos, as fêmeas de algumas espécies procuram o tecido animal para a postura de seus ovos ou larvas, onde elas evoluem como parasitos, levando a destruição do tecido. Algumas espécies só se desenvolvem em tecido vivo, como é o caso de *Dermatobia hominis* (Linnaeus Jr., 1781) (Diptera: Oestridae) e *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel, 1858) (Diptera: Calliphoridae). Estas larvas são denominadas biontófagas e são capazes de causar míases primárias. Outras espécies apresentam preferência por tecido necrosado que pode estar em um organismo vivo ou não. Neste caso, as larvas são consideradas parasitas facultativas e são denominadas necrobiontófagas ou necrófagas. Como exemplo desse último tipo, podemos citar: *Cochliomyia macellaria* (Fabricius, 1775) e representantes dos gêneros *Chrysomya*, *Lucilia*, *Fannia* e *Muscina* (Diptera: Calliphoridae, Fanniidae e Muscidae), além de alguns membros da família Sarcophagidae (GUIMARÃES & PAPAVERO, 1999; REY, 2010).

As espécies que apresentam preferência por se desenvolver em tecido necrosado, algumas vezes também são encontradas colonizando cadáveres. Estes grupos apresentam importância para a Entomologia Forense, que é a ciência que se caracteriza por estudar a fauna de insetos e outros artrópodes associados a eventos criminais (NUORTEVA, 1977; KEH, 1985; SMITH, 1986; CATTS & GOFF, 1992).

Segundo alguns autores, os dípteros muscoides são os primeiros insetos a chegar aos cadáveres e possuem a habilidade de ovipor ou larvipor logo após encontrá-lo (SMITH, 1986; CARVALHO *et al.*, 2000). A aplicação mais comum dos insetos na entomologia forense é a estimativa do intervalo pós-morte (IPM), que é o intervalo de tempo entre a morte e quando o corpo é encontrado. Isso pode ser determinado através do período mínimo de atividade do inseto no corpo em decomposição.

Algumas espécies possuem hábitos mais específicos e uma distribuição geográfica mais restrita, sugerindo assim, movimentação de cadáveres e permitindo a comparação de um suspeito a cena do crime. É possível, também a detecção de substâncias tóxicas, assim como drogas lícitas e ilícitas em imaturos de dípteros muscoides, auxiliando em casos de intoxicação acidental ou overdose (CATTS & GOFF, 1992; BENECKE, 1998; ANDERSON, 1999; CARVALHO *et al.*, 2001). Além disso, o conhecimento dos recursos alimentares preferenciais pode auxiliar a determinar casos de maus tratos (BENECKE & LESSIG 2001; BENECKE *et al.*, 2004).

Geralmente, as moscas da família Calliphoridae são os primeiros insetos a chegar ao cadáver e ovipor (SMITH, 1986). Essa primeira postura é a mais importante para determinar o intervalo pós-morte, no entanto, existem estudos que apontam membros da família Sarcophagidae também atuando como pioneiros em carcaças (BENECKE, 1998). Além disso, em contraste com os califorídeos, as fêmeas de sarcófagídeos são larvíparas, o que facilita a colonização por esses insetos, caso haja alguma barreira física, por exemplo.

Os sarcófagídeos, em geral, são adultos grandes e suas larvas e pupários também são grandes. Esta característica pode confundir um investigador menos experiente que pode assumir que estas larvas maiores do que as outras fazem parte das primeiras posturas realizadas no cadáver (PAPE, 1996; SALVIANO *et al.*, 1996). O sarcófagídeo *Peckia (Euboettcheria) collusor* é uma espécie necrófaga e segundo diversos autores, possui papel importante na entomologia forense (SALVIANO *et al.*, 1996; CARVALHO & LINHARES, 2001; BARROS *et al.*, 2008; BARBOSA *et al.*, 2009).

A espécie *Lucilia cuprina* faz parte da família Calliphoridae, e assim como a maioria dos membros desta família, é uma espécie pioneira nas carcaças (SMITH, 1986). EARLY & GOFF (1986) relataram esta espécie como dominante durante os estágios ativos de decomposição, no Haváí e, assim, responsáveis pela remoção de grande parte do tecido.

Essa espécie também apresenta hábito sinantrópico típico, estando intimamente ligada ao homem e ao seu ambiente. Isso a torna importante transmissora de patógenos e causadora de miíases no homem e em animais (NORRIS, 1965; LINHARES, 1981; STEVENS & WALL, 1996; FERREIRA & LACERDA, 1993).

O outro representante da família Calliphoridae estudado é *Cochliomyia macellaria*, conhecida por ser causadora de miíase secundária ou facultativa em homens e animais, pois possui nítida preferência por tecido necrosado (GUIMARÃES & PAPAVERO, 1999). Esta espécie apresenta muita semelhança com imaturos de *Cochliomyia hominivorax*, que é a principal causadora de miíases primária em animais no Brasil (ANZIANI *et al.*, 2000)

Além disso, os imaturos desta espécie se criam em carcaças de animais e de humanos (CATTS & GOFF, 1992; OLIVA, 2001), sendo facilmente confundidas com imaturos do gênero *Chrysomya*. Segundo ORTLOFF *et al.* (2012), as espécies *C. macellaria* e *L. cuprina* foram as espécies mais coletadas em carcaças de porcos na cidade de Temuco, Chile.

O conhecimento da biologia, da ecologia e principalmente da morfologia dos imaturos é primordial para que estes insetos possam auxiliar peritos e investigadores criminais. Tradicionalmente, a identificação dos dípteros muscoides é baseada na morfologia do adulto. No entanto, da fase de desenvolvimento mais encontrada em cadáveres corresponde aos imaturos e a diferenciação neste estágio é bastante difícil. Isso acontece porque as espécies possuem características muito semelhantes, sendo indistinguíveis a olho nu e em muitos casos, até mesmo com o auxílio de microscopia de luz.

Sendo assim, rotineiramente, as larvas são criadas até que atinjam a fase adulta para que seja realizada a identificação baseada em chaves taxonômicas que são bem estabelecidas (ALBUQUERQUE *et al.*, 1981; CARVALHO, 2002; CARVALHO *et al.*, 2002; MELLO, 2003; CARVALHO & MELLO-PATIU, 2008; FLOREZ & WOLFF, 2009). Entretanto, é necessário que fatores abióticos semelhantes àqueles encontrados no local de coleta, bem como substrato no estágio adequado de putrefação sejam mantidos para que os cálculos do intervalo pós-morte sejam realizados de maneira correta.

Em muitos casos, se faz necessário a identificação rápida e precisa das espécies ainda na fase de imaturos e a microscopia eletrônica de varredura pode auxiliar neste processo. A microscopia eletrônica de varredura permite a visualização mais acurada de caracteres que podem ser diagnósticos. Diversos autores descrevem imaturos de dípteros muscoides de importância sanitária e forense no Brasil (THYSSEN, 2005; CARVALHO, 2006; THYSSEN & LINHARES, 2007; MENDONÇA *et al.*, 2008; MENDONÇA *et al.*, 2010; MENDONÇA *et al.*, 2012a, 2012b; MENDONÇA *et al.*, 2013; MENDONÇA *et al.*, 2014a, 2014b).

No entanto, segundo GREENBERG & SINGH (1995) podem ocorrer algumas variações morfológicas entre populações de dípteros de regiões geográficas e biomas diferentes. Sendo assim, é importante que haja uma tentativa de descrever os imaturos de dípteros coletados em diferentes regiões com o objetivo de abranger a diversidade de espécies de importância forense no país.

Assim, este capítulo teve como objetivo fornecer subsídios para a identificação de imaturos de três espécies de dípteros caliptratos de importância médica-veterinária e forense através da microscopia eletrônica de varredura. De maneira mais específica foi realizado:

- a) descrição de larvas de primeiro, segundo e terceiro instar e pupários da espécie *Peckia (Euboettcheria) collusor* (Diptera: Sarcophagidae);
- b) descrição de larvas de primeiro, segundo e terceiro instar e pupários da espécie *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae);
- c) descrição dos ovos, larvas de primeiro, segundo e terceiro instar e pupários da espécie *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae);
- d) comparação os caracteres morfológicos diagnósticos entre membros de famílias diferentes (Sarcophagidae e Calliphoridae), bem como de gêneros diferentes dentro da mesma família (*Lucilia* e *Cochliomyia*).

2. METODOLOGIA

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Transmissores de Leishmanioses, Setor de Entomologia Médica e Forense do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ. As imagens foram obtidas no microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM 6390LV da Plataforma de Microscopia Eletrônica Rudolf Barth, do Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz.

Os muscoides foram provenientes das colônias mantidas em laboratório, a partir de adultos capturados seguindo a metodologia de coleta descrita em BARBOSA *et al.* (2009). *Peckia (E.) collusor* foi coletada no campus da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), no bairro de Manguinhos, Rio de Janeiro (22°52'33''S 43°14'47''W), RJ; e *Lucilia cuprina* e *Cochliomyia macellaria* foram coletadas no campus da Universidade Federal do Amapá (Unifap), no bairro Jardim Marco Zero, Macapá (0°00'22.5''S 51°05'04.3''W), AP.

Os insetos foram capturados utilizando-se como isca para atrair as moscas, carcaças de porcos domésticos (*Sus scrofa* L.), com aproximadamente 15 kg. O porco recém-morto foi adquirido de comerciantes que vendem diretamente para o consumo humano e colocado dentro da armadilha, já utilizada em experimentos de Entomologia Forense no campus da Fiocruz e da Unifap. A armadilha consistia em uma estrutura metálica, confeccionada com vergalhão de ferro, sob a forma piramidal, com 1,50m de altura e 1,00m de base, coberta por um tecido de algodão preto, com a parte inferior confeccionada com tecido de náilon branco, para permitir a entrada de luz. Na parte superior da pirâmide, foi encaixado um tubo de PVC com uma janela central coberta por náilon que serviu como coletor dos insetos. Sob a armadilha, diretamente no chão era colocada a carcaça do porco e sobre esta, uma grade metálica cúbica (70 cm x 70 cm x 50 cm) a fim de evitar a ação de animais carniceiros que pudessem remover a carcaça (Figura 1).



Figura 1: Armadilha utilizada para coleta de dípteros muscoides.

Imagem: Margareth M. C. Queiroz

Os insetos adultos capturados foram levados ao laboratório, anestesiados em congelador por cinco minutos e posteriormente identificados através de análise morfológica utilizando chaves dicotômicas clássicas (MELLO, 2003; CARVALHO & MELLO-PATIU, 2008).

Depois, os imagos de *Peckia (Euboettcheria) collusor*, *Lucilia cuprina* e *Cochliomyia macellaria* foram transferidas para gaiolas de madeira (30 cm x 30 cm x 30 cm) revestidas com tela de náilon para criação dos insetos (Figura 2). Durante três dias, os dípteros receberam somente água e açúcar que foram mantidos nas gaiolas por todo o tempo da criação. A partir do quarto dia, foi introduzida a carne bovina moída putrefata que serviu como fonte de alimentação, estimulante para postura e substrato para a oviposição/larviposição. As gaiolas eram mantidas em estantes ventiladas com temperatura entre 24 – 28 °C e com umidade relativa entre 60 ± 10% (Figura 3).



Figura 2: Gaiola utilizada na manutenção de dípteros muscoides no laboratório. Imagem: Paloma M. Mendonça



Figura 3: Estante ventilada na manutenção de dípteros muscoides no laboratório.

Imagem: Paloma M. Mendonça

As posturas obtidas foram transferidas para uma dieta que consistia de carne bovina moída em início de decomposição, na proporção de 1g de dieta para cada larva para os califorídeos e 2g de dieta para cada larva de sarcófagídeo. Esta dieta foi colocada em recipientes plásticos (10 cm x 10 cm) e estes foram introduzidos em outros recipientes maiores (15 cm x 15 cm), contendo vermiculita como substrato de pupação. Este último foi coberto com tecido de náilon preso por elástico (Figura 4). Após a emergência, os adultos foram sexados e alocados em gaiolas como as descritas anteriormente.



Figura 4: Recipientes plásticos (500 mL) para criação de imaturos de dípteros muscoides: menor (100 mL) contendo dieta e maior contendo a vermiculita.

Imagem: Paloma M. Mendonça

Aos novos indivíduos emergidos foram oferecidos água e açúcar e a partir do quarto dia de vida dos adultos, também foi acrescentada a carne bovina moída putrefata, durante quatro dias, visando o desenvolvimento dos ovariolos. A carne foi reintroduzida no 14º dia pós-emergência para servir como substrato para oviposição/larviposição. Os experimentos foram realizados com imaturos pertencentes a segunda e terceira geração (F₂ e F₃) criadas em laboratório.

No caso da espécie *P. (E.) collusor*, cujas fêmeas são larvíparas apenas as larvas e os pupários foram submetidos à fixação e observação ao microscópio. As duas outras espécies, *L. cuprina* e *C. macellaria*, são ovíparas e todos os estágios imaturos foram observados através da microscopia eletrônica de varredura. Entretanto, os ovos de *L. cuprina* já haviam sido analisados anteriormente (MENDONÇA *et al.*, 2008).

As larvas de primeiro instar foram coletadas de 12-24h após a eclosão das larvas. Os imaturos de segundo instar 48-72h após a eclosão e as larvas de terceiro instar foram

coletadas após estas abandonarem a dieta. As larvas foram mantidas em água quente (75-80°C) por cinco minutos, até a morte. Ovos, larvas de todos os instares e pupários foram lavados em solução de hidróxido de sódio a 2% durante cinco minutos com o objetivo de remover todos os resíduos de dieta ou vermiculita presente na superfície dos espécimes.

Os ovos e as larvas foram fixados com uma solução de glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7.2, posteriormente foram lavadas três vezes durante cinco minutos neste mesmo tampão. Depois, foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1% no mesmo tampão, mantidas por uma hora no escuro, em seguida o excesso do tetróxido de ósmio foi retirado através de lavagens no tampão cacodilato de sódio 0,1M. Após este procedimento, as amostras foram desidratadas em séries crescentes de acetona (7,5, 15, 30, 50, 70, 90 e 100%) permanecendo 10 minutos em cada concentração. Ao final desta etapa, as amostras foram submetidas ao método de secagem pelo ponto crítico, utilizando CO₂ superseco em aparelho de Balzers (HAYAT, 1970).

Os pupários com 48-72h de formação foram mantidos em refrigerador por aproximadamente dez minutos, para que as pupas em seu interior morressem e não foram submetidos a nenhum processo de fixação, pós-fixação e secagem, uma vez que a cutícula é formada por quitina que é uma substância rígida, dispensando a necessidade da fixação.

Em seguida, todos os imaturos (ovos, larvas e pupários) foram aderidos em fita dupla-face, montados em suportes metálicos e cobertos por uma fina camada de ouro ou platina (20-30nm) para que permitisse a visualização em microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM 6390LV da Plataforma de Microscopia Eletrônica Rudolf Barth do Instituto Oswaldo Cruz.

Devido ao grande tamanho do terceiro instar larval e do pupário de *P. (E.) collusor*, estes imaturos foram cortados em três partes (região anterior, corpo e anal) antes do início da fixação a fim de facilitar este processo e permitir a observação ao microscópio mais facilmente. Estes imaturos não foram medidos.

Neste experimento foram utilizados aproximadamente 30 exemplares de cada estágio correspondente a cada espécie de dípteros muscoides. As micrografias obtidas no microscópio foram transferidas diretamente ao computador. A nomenclatura utilizada para a identificação dos imaturos segue a proposta por MCALPINE (1981) e MARGARITIS (1985). As medidas dos imaturos foram realizadas utilizando o programa disponível juntamente com o microscópio eletrônico de varredura (Scanning Electron Microscope Control User Interface - Versão 8.24, Jeol Techniques Ltda, 2005/2007).

3. RESULTADOS

Os resultados referentes aos instares larvais encontram-se resumidos nos quadros a seguir, onde é possível observar as características que são compartilhadas entre os representantes de cada família, aquelas que são restritas aos gêneros e as características espécie-específicas (Quadros 1, 2 e 3). A caracterização morfológica das espécies *P. (E.) collusor*, *L. cuprina* e *C. macellaria* resultaram na publicação de três artigos científicos (MENDONÇA *et al.*, 2013, 2014a, 2014b).

3.1– *Peckia (Euboettcheria) collusor*

3.1.1 - Larvas de Primeiro Instar

O corpo da larva de primeiro instar de *P. (E.) collusor* é vermiforme, típico de outros muscoides, com região cefálica afilada e posterior truncada (Figura 5A). O corpo é composto por 12 segmentos, sendo um cefálico, três torácicos e oito abdominais delimitados por um grupo de espinhos cônicos (Figuras 5A, B). A larva de *P. (E.) collusor* apresenta $4,27 \pm 0,05$ mm de comprimento médio e $635,36 \pm 150,12$ µm de largura média.

A região cefálica é composta por dois lobos e comporta as estruturas sensoriais: antenas ou órgãos dorsais, com forma abaulada; e um conjunto de papilas que formam o complexo de palpos maxilares ou órgãos terminais. No caso da larva de primeiro instar de *P. (E.) collusor*, estas papilas se apresentam dentro de uma cavidade (Figura 5C). As peças bucais nesse estágio larval são muito pequenas e não puderam ser visualizadas com clareza. Os espinhos que delimitam a região cefálica e o primeiro segmento torácico formam uma estrutura conhecida como colar cefálico e no caso de *P. (E.) collusor*, os espinhos são finos e direcionados à região posterior do corpo da larva.

As larvas de todos os muscoides são anfipnêusticas, ou seja, o par de espiráculos anteriores está localizado no primeiro segmento torácico e o par posterior pode se localizar na porção mais distal da larva. No caso das larvas de primeiro instar, o par de espiráculos anteriores ainda não pode ser visualizado.

O tegumento da larva de primeiro instar é liso, sem a presença de tubérculos ou projeções. Os espinhos que delimitam os outros segmentos são denominados intersegmentais e são estruturas finas e também direcionadas para a região posterior da larva (Figura 5D).

A região posterior é truncada e possui os tubérculos dorsais e ventrais pouco visíveis, apenas o par de tubérculos anais apresenta destacada visualização. A placa espiracular encontra-se localizada em uma profunda depressão, no último segmento larval, circundada por estes tubérculos (Figuras 5E, F).

3.1.2 - Larvas de Segundo Instar

O corpo da larva de segundo instar é bastante semelhante ao da larva de primeiro instar, com a região anterior afilada e a posterior truncada (Figura 6A). A larva de *P. (E.) collusor* apresenta $7,4 \pm 0,1$ mm de comprimento médio e $1,42 \pm 0,35$ mm de largura média.

As estruturas da região cefálica são mais desenvolvidas, com as antenas e os palpos maxilares bem visíveis e com formato e estruturação bastante semelhantes àqueles observado no instar anterior (Figura 6B). Os espinhos do colar cefálico são bem afilados, enquanto os espinhos intersegmentais são mais robustos com ponta única e bem fina (Figura 6C), voltados para a região posterior da larva.

O espiráculo anterior é facilmente visualizado neste instar e está localizado no segundo segmento larval ou primeiro torácico, bem próximo a fileira de espinhos. Esta estrutura é composta por uma fileira irregular de 11-14 ramificações espiraculares, cada uma delas com uma abertura na porção apical (Figuras 6B, D).

O tegumento é liso, com a presença de pequenas dobras. Os tubérculos dorsais (dorsal interno, mediano e externo) e ventrais (ventral interno, mediano e externo) estão localizados no último segmento e são bem mais visíveis, com o par de tubérculos anais mais destacados do que os demais (Figura 6E). O conjunto de placas espiraculares está localizado em uma profunda cavidade formada por estes tubérculos.

Dentro desta cavidade, pode ser observado um par de espiráculos posteriores, com duas aberturas em cada um deles, com orientação radial. O peritrema é aberto e sem a presença da cicatriz ecdisial e a placa espiracular encontra-se em uma ligeira depressão (Figura 6F).

3.1.3 - Larvas de Terceiro Instar

Todas as estruturas da larva de terceiro instar são mais visíveis do que nos outros instares. Na região cefálica, as antenas, os palpos maxilares, as cristas orais e os espinhos do colar cefálico são claramente visíveis. As cristas orais envolvem toda a região cefálica e estão localizadas logo abaixo da cápsula cefálica (Figuras 7A, B). O órgão ventral está localizado no meio das cristas orais, muito próximos as peças bucais (Figura 7C).

Os espinhos do colar cefálico são afilados, ligeiramente achatados e voltados para a região posterior da larva. Enquanto, os espinhos intersegmentais são robustos e achatados, se assemelhando a placas com apenas uma extremidade afilada (Figura 7D). O espiráculo anterior apresenta uma fileira de 15-16 ramificações espiraculares dispostas de maneira irregular com as aberturas na região apical (Figura 7D).

Na porção latero-ventral dos segmentos torácicos é possível visualizar três sensilas agrupadas formando uma estrutura sensorial denominada órgão de Keilin (Figura 8A).

O tegumento larval não é liso e, além das dobras também apresenta algumas protuberâncias em formato arredondado (Figura 8B). Os tubérculos do último segmento são visíveis, assim como na larva de segundo instar, onde o tubérculo anal ainda se destaca com relação aos outros (Figura 8C). O conjunto de placas espiraculares da larva de terceiro instar também encontra-se localizado na cavidade formada pelos tubérculos. Cada placa espiracular é composta por um peritrema aberto com três aberturas espiraculares dispostas em orientação radial (Figuras 8C, D).

3.1.4- Pupários

O pupário apresenta características muito semelhantes à larva de terceiro instar, uma vez que, no caso de dípteros muscoides, é formado a partir do endurecimento da cutícula da larva de último estágio. O segmento cefálico é totalmente retraído, levando ao deslocamento do espiráculo anterior à porção mais anterior do pupário. Desta forma, nenhuma das estruturas da região cefálica pode ser visualizada (Figura 9A).

O espiráculo anterior, de maneira semelhante ao observado no terceiro instar, apresenta as aberturas espiraculares dispostas em uma fileira irregular, com 15-16 ramificações e com aberturas na região apical (Figuras 9A, B).

Os espinhos intersegmentais são robustos e achatados, exibindo um formato triangular e voltados para a região posterior do pupário. O tegumento não é completamente liso e possui as dobras resultantes do enrugamento da cutícula bem marcadas, e também como consequência deste processo, as protuberâncias estão enrugadas (Figura 9C).

Os tubérculos do último segmento são bem visíveis e, apesar do encolhimento geral do corpo da larva para a formação do pupário, estes tubérculos não se mostram retraídos. O par de tubérculos anais é bastante destacado. Estas estruturas circundam a cavidade que abriga as placas espiraculares que são muito semelhantes às aquelas observadas nas larvas de terceiro instar (Figuras 9D, E). Entretanto, a disposição radial das três aberturas espiraculares é bem mais visível do que no instar anterior (Figura 9F). O peritrema também é aberto e não apresenta a cicatriz ecdisial. Devido ao enrugamento do tecido, o peritrema não se encontra em depressão, entretanto a estrutura completa encontra-se dentro de uma cavidade formada pelo segmento anal (Figuras 9E, F).

Quadro 1: Resumo comparativo dos resultados referentes a larvas de primeiro, segundo e terceiro instar de *Peckia (Euboettcheria) collusor* (Diptera: Sarcophagidae) através da microscopia eletrônica de varredura.

Legenda

Característica restrita a família

Característica restrita ao gênero

Característica restrita ao subgênero

Característica restrita a espécie

| Instar | Região cefálica | | | Tegumento | Espinhos entre segmentos | Espiráculo | | Peritrema | Tubérculos |
|-------------------|-------------------|----------------------|-------------------|-----------------------------------|--------------------------|-------------------|-------------|--------------|----------------|
| | Antenas | Palpos maxilares | Espinhos do colar | | | Anterior | Posterior | | |
| 1º | abaulada | cavidade | filiformes | liso | filiformes | x | em cavidade | x | pouco visíveis |
| 2º | abaulada | cavidade | filiformes | liso com dobras | robustos | 11-14 aberturas | em cavidade | aberto | bem visíveis |
| | | | | | | fileira irregular | 2 aberturas | sem cicatriz | |
| fileira irregular | orientação radial | placa em depressão | | | | | | | |
| 3º | abaulada | cavidade | filiformes | dobras e protuberâncias | robustos e achatado | 15-16 aberturas | em cavidade | aberto | bem visíveis |
| | | | | | | fileira irregular | 3 aberturas | sem cicatriz | |
| fileira irregular | orientação radial | placa em depressão | | | | | | | |
| Pupário | x | x | x | dobras e protuberâncias enrugadas | robustos e achatado | 15-16 aberturas | em cavidade | aberto | bem visíveis |
| | | | | | | fileira irregular | 3 aberturas | sem cicatriz | |
| fileira irregular | orientação radial | placa no mesmo nível | | | | | | | |

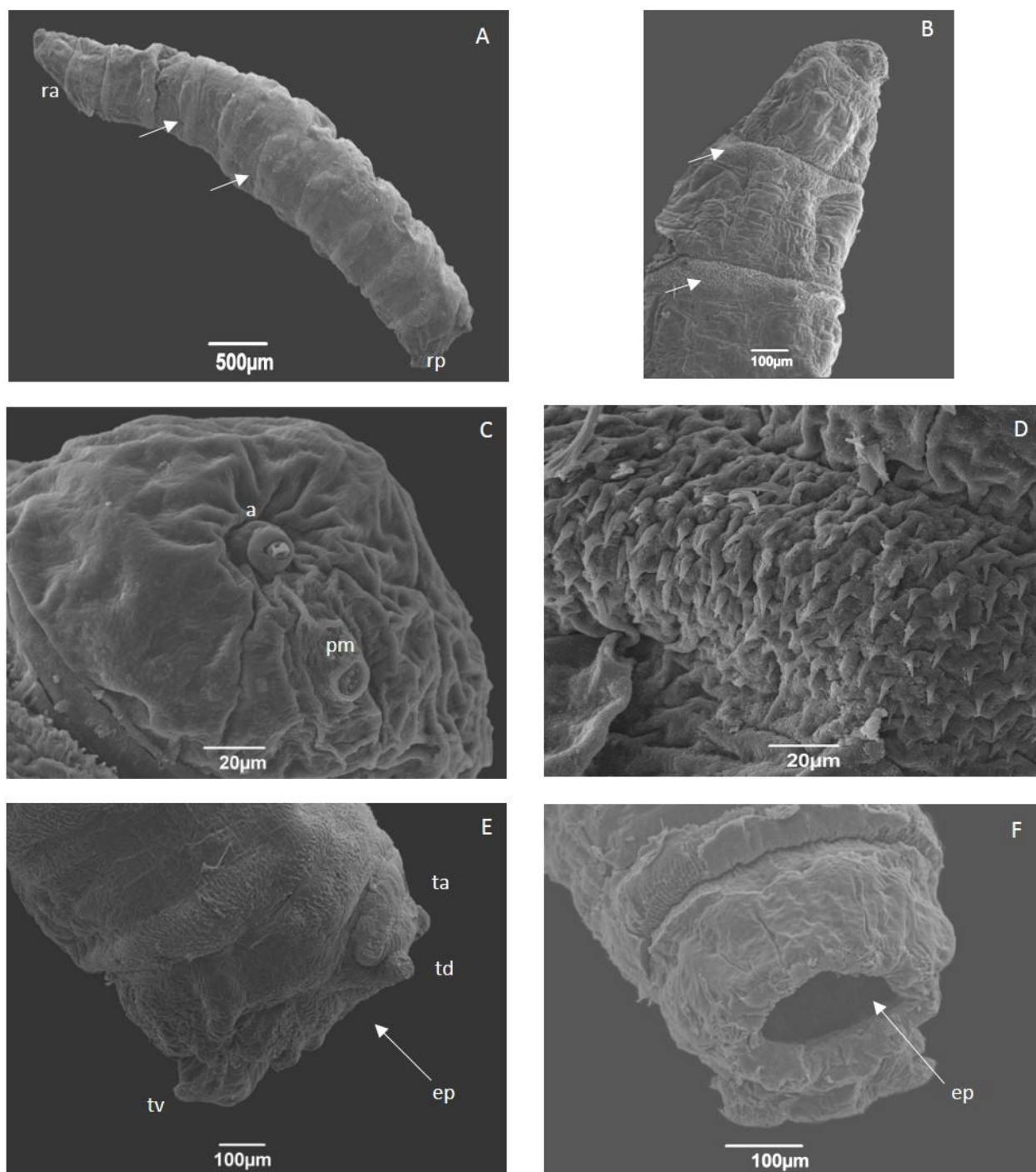


Figura 5: Micrografia eletrônica de varredura da larva de primeiro instar de *Peckia (Euboettcheria) collusor* (Diptera: Sarcophagidae).

A – Corpo da larva composto por grupos de espinhos localizados entre os segmentos (setas); região anterior (ra) e região posterior (rp) do corpo larval (x30); **B** – Região cefálica com os espinhos entre os segmentos (setas) (x130); **C** – Região cefálica com antena (a) e palpo maxilar (pm) (x800); **D** – Espinhos do collar cefálico entre a região cefálica e o primeiro segmento torácico (x800); **E** – Segmento anal com tubérculos anais (ta), dorsais (td) e ventrais (tv) e espiráculos posteriores localizados em cavidade (ep) (x130); **F** – Espiráculo posterior (ep) localizado em cavidade (x200).

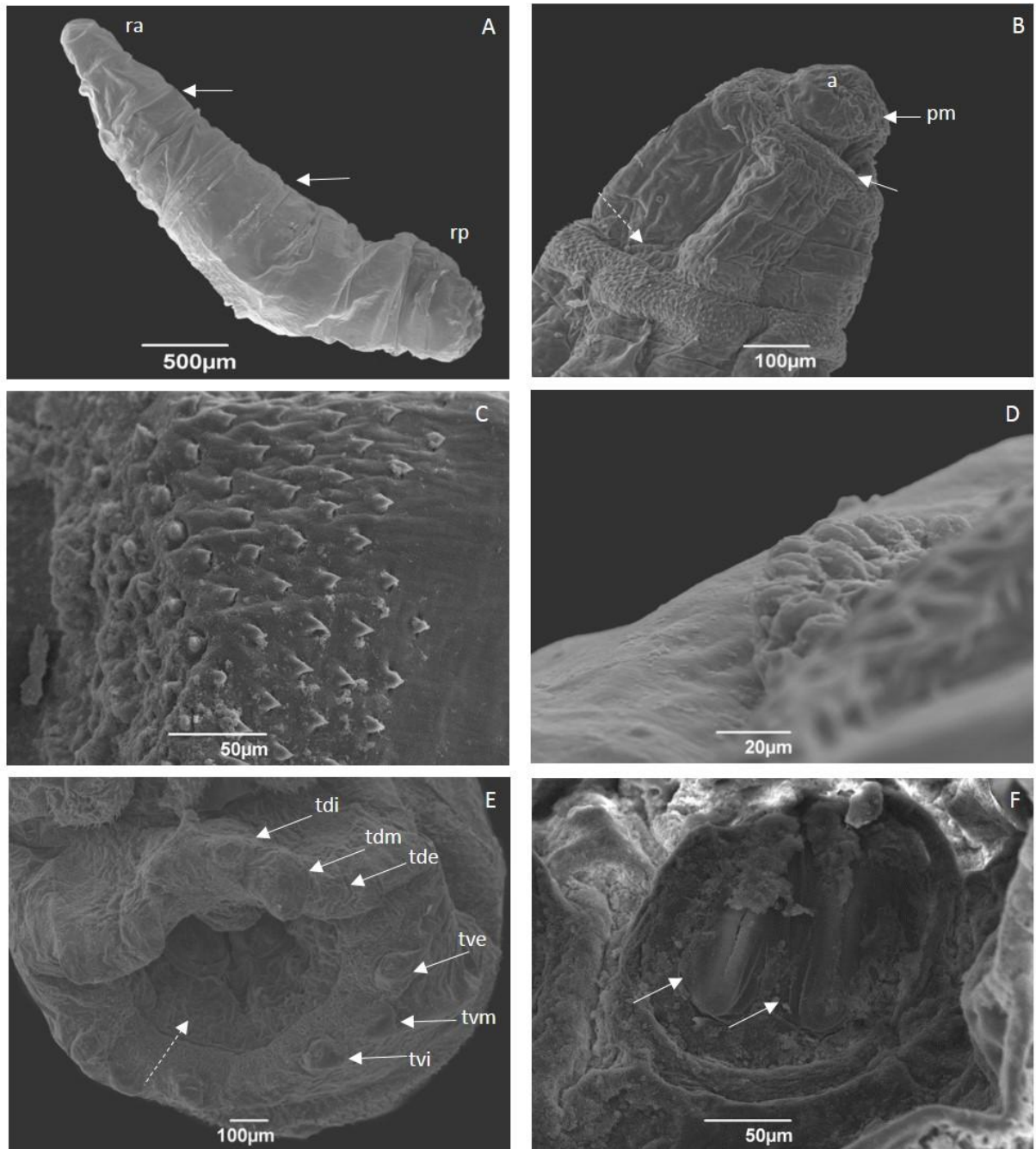


Figura 6: Micrografia eletrônica de varredura da larva de segundo instar de *Peckia (Euboettcheria) collusor* (Diptera: Sarcophagidae).

A – Corpo da larva composto por grupos de espinhos localizados entre os segmentos (setas); região anterior (ra) e região posterior (rp) do corpo larval (x35); **B** – Região cefálica com antena (a), palpos maxilares (pm) e espinhos do colar cefálico localizado entre a região cefálica e o primeiro segmento torácico (seta) e espiráculo anterior (seta pontilhada) (x160); **C** – Espinhos entre os segmentos (x500); **D** – Detalhe do espiráculo anterior, com as aberturas espiraculares dispostas em fileira (x950); **E** – Segmento anal com espiráculos posteriores em uma cavidade (seta pontilhada), envolto por tubérculos dorsais internos (tdi), mediano (tdm) e externo (tde) e tubérculos ventrais internos (tvi), mediano (tvm) e externo (tve) (x100); **F** – Espiráculo posterior dentro de uma cavidade com duas aberturas espiraculares (setas) (x450).

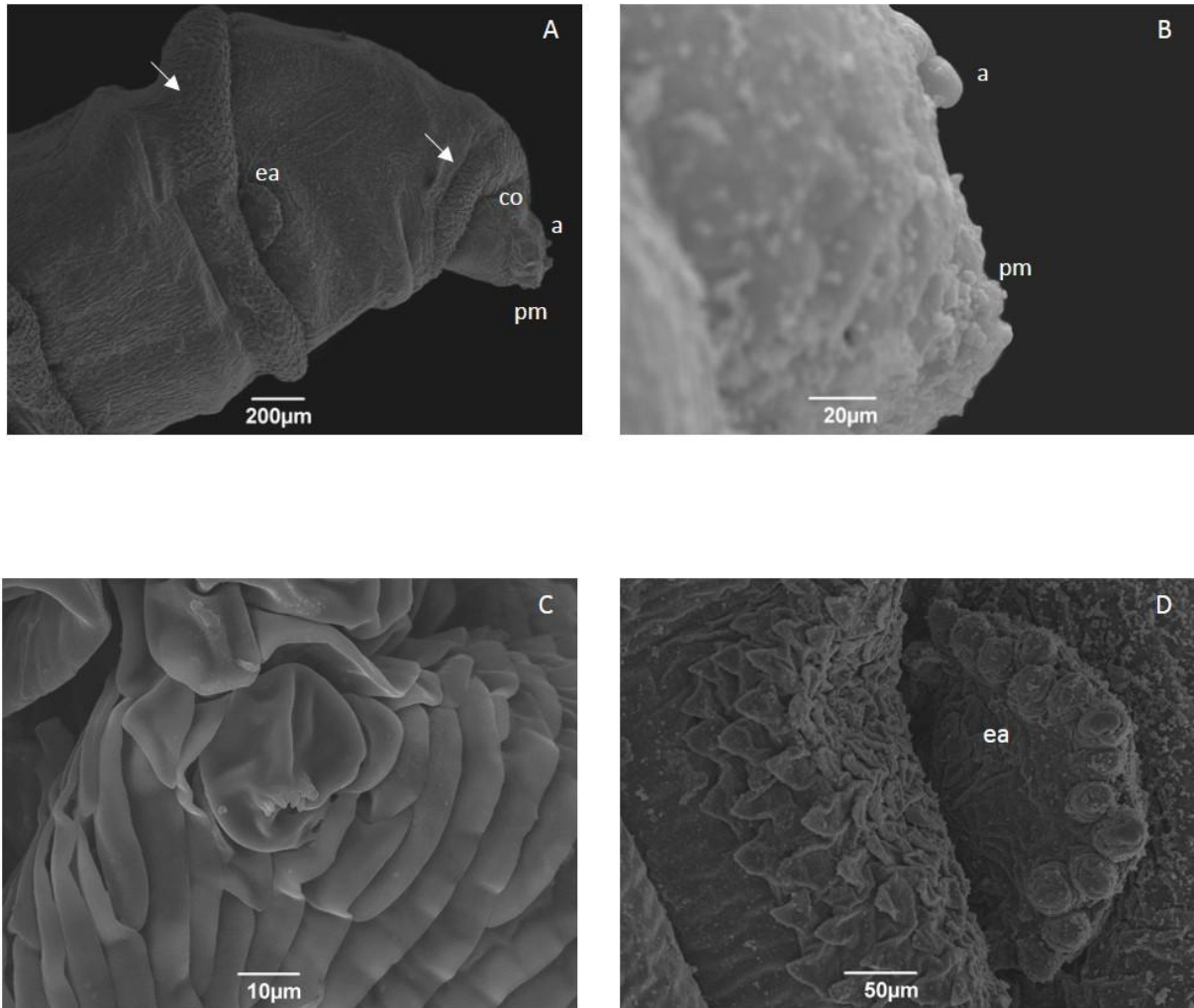


Figura 7: Micrografia eletrônica de varredura da larva de terceiro instar de *Peckia* (*Euboettcheria*) *collusor* (Diptera: Sarcophagidae).

A – Região cefálica com espinhos entre os segmentos (setas); antenas (a), palpos maxilares (pm) e cristas orais (co) (x60); **B** – Região cefálica com antenas (a) e palpos maxilares (pm) (x750); **C** – Órgão Ventral (x3000); **D** – Detalhes do espiráculo anterior com aberturas espiraculares dispostas em fileiras (ea) (x330).

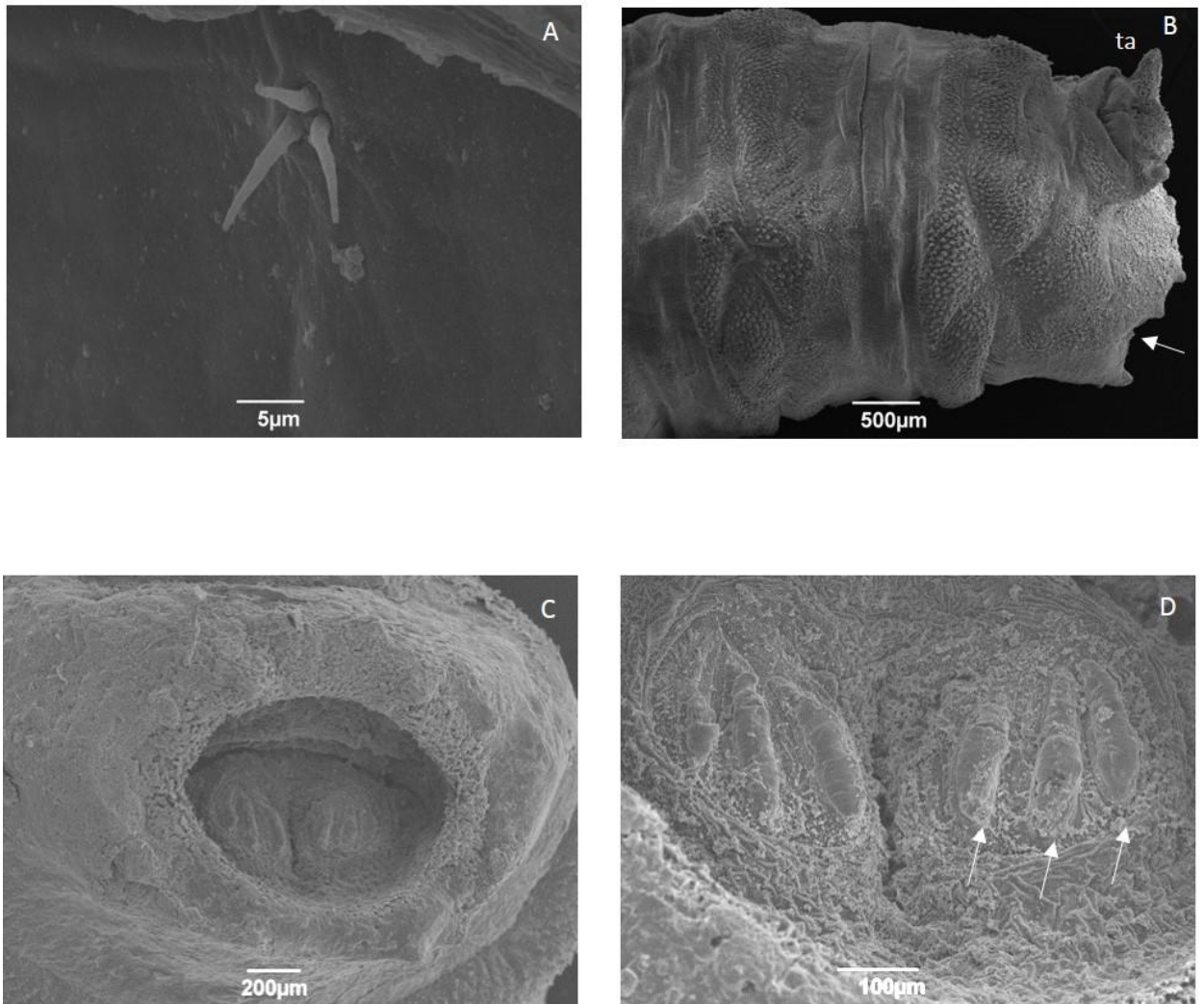


Figura 8: Micrografia eletrônica de varredura da larva de terceiro instar de *Peckia (Euboettcheria) collusor* (Diptera: Sarcophagidae).

A – Órgão de Keilin (x1400); **B** – Tubérculo anal (ta) com espiráculo posterior localizado em uma cavidade (seta) (x30); **C** – Espiráculo posterior localizado em uma cavidade (x60); **D** – Espiráculo posterior com três aberturas espiraculares (setas) (x180).

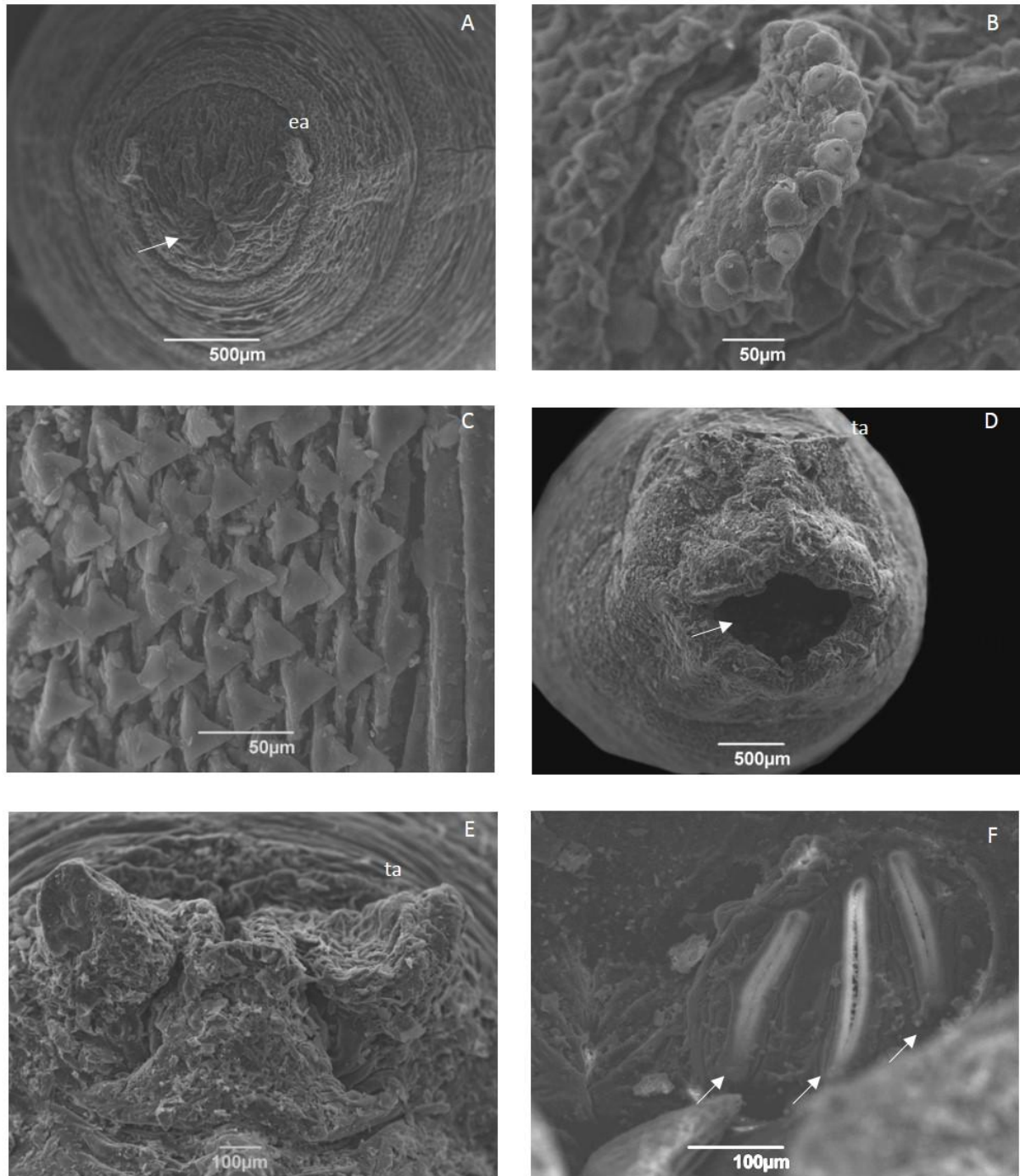


Figura 9 Micrografia eletrônica de varredura do pupário de *Peckia (Euboettcheria) collusor* (Diptera: Sarcophagidae).

A – Região cefálica retraída (seta) e espiráculo anterior (ea) (x50); **B** – Detalhes do espiráculo anterior com as aberturas espiraculares em fileira (x330); **C** – Espinhos entre os segmentos e dobras do tegumento (x550); **D** – Segmento anal com o espiráculo posterior em uma cavidade (seta) e tubérculos anais (ta) (x35); **E** – Detalhes dos tubérculos anais (ta) (x110); **F** – Espiráculo posterior com três aberturas espiraculares (setas) (x250).

3.2 - *Lucilia cuprina*

3.2.1 – Larvas de Primeiro Instar

O corpo da larva de primeiro instar de *L. cuprina* é vermiforme, típico de outros muscoides, com região cefálica afilada e posterior truncada (Figura 7A). O corpo também é composto por 12 segmentos delimitados por um grupo de espinhos afilados (Figura 10A). A larva de *L. cuprina* apresenta média de $3,76 \pm 0,27$ mm de comprimento e $0,199 \pm 0,037$ mm de largura.

A região cefálica é ligeiramente bilobada e, em cada lobo, é possível visualizar as antenas com o seu formato abaulado e os palpos maxilares em uma ligeira elevação (Figura 10B). A região cefálica também inclui as peças bucais e as cristas orais, mas neste primeiro instar, estas estruturas ainda não estão completamente desenvolvidas (Figura 10B).

Os espinhos que formam o colar cefálico apresentam dois formatos diferentes. Os espinhos mais achatados com a extremidade afilada estão localizados nas fileiras superiores (mais próximo à região cefálica) e os mais afilados e filiformes estão concentrados nas fileiras inferiores do colar cefálico (mais próximo ao primeiro segmento torácico) (Figura 10C). Todos os espinhos são direcionados para a região posterior da larva.

O tegumento que recobre o corpo da larva é liso, mas apresenta os espinhos intersegmentais estreitos e espaçados, com a extremidade afilada e voltados para a região posterior do corpo da larva (Figura 10D). Os espiráculos anteriores ainda estão em formação e por isso não podem ser visualizados no primeiro instar.

Apesar do tegumento larval ser liso, de maneira geral, o último segmento abdominal ou segmento anal é recoberto por espinhos filiformes e os tubérculos anais se destacam. Os tubérculos dorsais e ventrais não são visíveis (Figura 10E). Neste segmento, também é possível visualizar os espiráculos posteriores que estão na parte superior de uma elevação. Cada espiráculo contém apenas uma abertura espiracular em formato de fenda transversal, envolta por músculos de sustentação que têm como função permitir a abertura e fechamento da abertura respiratória (Figura 10F).

3.2.2 – Larvas de Segundo Instar

O aspecto geral da larva de segundo instar é semelhante ao da larva de primeiro instar, com a região anterior afilada e a posterior truncada (Figura 11A). O tamanho médio das larvas neste instar é de $4,35 \pm 0,27$ mm de comprimento e $0,624 \pm 0,085$ mm de largura.

Na região cefálica, o aspecto bilobado é mais pronunciado e as estruturas sensoriais e as peças bucais são bem mais desenvolvidas. Nas antenas, é possível visualizar o formato abaulado comum a outras espécies, assim como o complexo do palpo maxilar, composto por papilas sensoriais dispostas em formato circular (Figura 11B, C). As cristas orais apresentam formato de lâminas paralelas e circundam a região cefálica. Os espinhos que constituem o colar cefálico são ligeiramente diferentes daqueles observados no primeiro instar, os espinhos são achatados com a ponta robusta. Além disso, os espinhos filiformes presentes no colar não são encontrados neste instar (Figura 11D).

O espiráculo anterior já pode ser completamente visualizado e é composto por 6-7 ramificações espiraculares alinhadas. Em cada ramificação é possível observar uma fenda na porção apical (Figura 12A).

O tegumento que recobre o corpo da larva é liso, mas assim como no instar anterior, o último segmento é recoberto por espinhos filiformes. Os espinhos intersegmentais são espaçados e com a extremidade afilada e voltados para a região posterior do corpo da larva (Figura 12B). Os tubérculos dorsais e ventrais permanecem pouco desenvolvidos, enquanto o tubérculo anal é ligeiramente maior (Figura 12C).

Neste último segmento, também é encontrado o par de espiráculos posteriores. Cada um deles com duas aberturas espiraculares em uma elevação, envolvidas pelos músculos de sustentação, com peritrema aberto e com a cicatriz ecdisial (Figura 12D).

3.2.3 – Larvas de Terceiro Instar

A larva de terceiro instar é bastante similar aos instares anteriores e todas as estruturas se desenvolveram completamente. A região anterior é afilada e a região posterior truncada se torna bem mais visível (Figura 13A). A larva apresenta comprimento médio de $9,18 \pm 0,19$ mm e $1,43 \pm 0,70$ mm de largura.

Na região cefálica, todas as estruturas são muito semelhantes ao instar anterior (Figura 13B). As antenas apresentam a forma abaulada, os palpos maxilares são compostos por papilas sensoriais dispostas em um arranjo circular, localizados em uma pequena elevação. As cristas orais são estruturas em formato de lâminas paralelas e os espinhos do colar cefálico apresentam formato achatado com extremidades pouco pronunciadas, voltadas para a região posterior da larva, mas dispostos em orientação diagonal (Figuras 13B, C). Nesta região, também são visíveis os órgãos ventrais, em formato de papilas (Figura 13D).

Os espinhos intersegmentais são semelhantes aos espinhos do colar cefálico. Os espinhos intersegmentais são grandes e achatados com extremidades pouco afiladas e, em alguns deles, as extremidades são quase arredondadas (Figura 13E, F). O espiráculo anterior apresenta o mesmo número e disposição de aberturas espiraculares encontrados nos instares anteriores (Figura 14A).

No tórax, na porção latero-ventral é possível visualizar as sensilas que formam o órgão de Keilin, um par em cada segmento torácico (Figura 14B).

O tegumento larval é liso e sem a presença de espinhos, exceto pelos espinhos filiformes concentrados no último segmento abdominal. Neste, os tubérculos dorsais (externo, mediano e interno) e ventrais (externo, mediano e interno) são visíveis, entretanto, o par de tubérculos anais se destaca (Figura 14C). Ainda neste segmento, os espiráculos posteriores encontram-se em uma elevação com as três aberturas espiraculares dispostas em orientação radial. O peritrema é aberto, além disso, é possível observar a cicatriz ecdisial, entretanto, os músculos de sustentação das aberturas espiraculares são bem visíveis (Figura 14D).

3.2.4 – Pupários

O pupário apresenta a região cefálica totalmente retraída e a região posterior ligeiramente truncada, com comprimento médio de $7,74 \pm 0,67$ mm e $2,18 \pm 0,62$ mm de largura. O tegumento que forma o pupário contém dobras e as bandas de espinhos intersegmentais são formadas por um número maior de fileiras de espinhos na região anterior, enquanto na região posterior, as bandas são mais finas (Figura 15A). Os espinhos são grandes, achatados e com as extremidades bastante afiladas.

No pupário de *L. cuprina* é possível observar uma linha longitudinal contínua ao longo do segundo e terceiro segmentos torácicos. Pode ser observada também uma constrição transversal ao longo do primeiro segmento abdominal (Figura 15A).

O espiráculo anterior também é composto por 6-7 aberturas espiraculares alinhadas, assim como nos estágios larvais (Figuras 15B, C). Além desta estrutura com função respiratória, os pupários de *L. cuprina* apresentam também tubérculos respiratórios localizados no final do primeiro segmento abdominal. Estes tubérculos possuem uma abertura apical (Figura 15D).

Os tubérculos dorsais, anais e ventrais estão atrofiados (Figura 10A). O par de espiráculos posteriores é semelhante ao observado na larva de terceiro instar, pois apresenta três aberturas espiraculares, está localizado em uma elevação, o peritrema é dito aberto e apresenta a cicatriz espiracular (Figura 15E).

Quadro 2: Resumo comparativo dos resultados referentes a larvas de primeiro, segundo e terceiro instar de *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae) através da microscopia eletrônica de varredura.

Legenda

Característica restrita a família

Característica restrita ao gênero

Característica restrita ao subgênero

Característica restrita a espécie

| Instar | Região cefálica | | | Tegumento | Espinhos entre segmentos | Espiráculo | | Peritrema | Tubérculos |
|---------|-----------------|------------------|-----------------------------|---------------------------------------|--------------------------|---------------|-------------------|-------------------|------------------------------------|
| | Antenas | Palpos maxilares | Espinhos do colar | | | Anterior | Posterior | | |
| 1º | abaulada | elevação | achatado com ponta fina | liso | estreitos e espaçados | x | 1 abertura | elevado | tubérculos anais mais destacados |
| | | | afilado | segmento anal com espinhos filiformes | | | | | |
| 2º | abaulada | elevação | achatado com pontas robusta | liso | afilados e espaçados | 6-7 aberturas | 2 aberturas | aberto | tubérculos anais mais destacados |
| | | | | segmento anal com espinhos filiformes | | alinhadas | orientação radial | com cicatriz | |
| 3º | abaulada | elevação | achatado com pontas robusta | liso | achatados | 6-7 aberturas | 3 aberturas | aberto | bem visíveis |
| | | | | segmento anal com espinhos filiformes | | alinhadas | orientação radial | com cicatriz | |
| Pupário | x | x | x | dobras | achatados | 6-7 aberturas | 3 aberturas | aberto | tubérculos respiratórios presentes |
| | | | | constricção e linha longitudinal | | alinhadas | orientação radial | com cicatriz | |
| | | | | | | | | placa em elevação | |

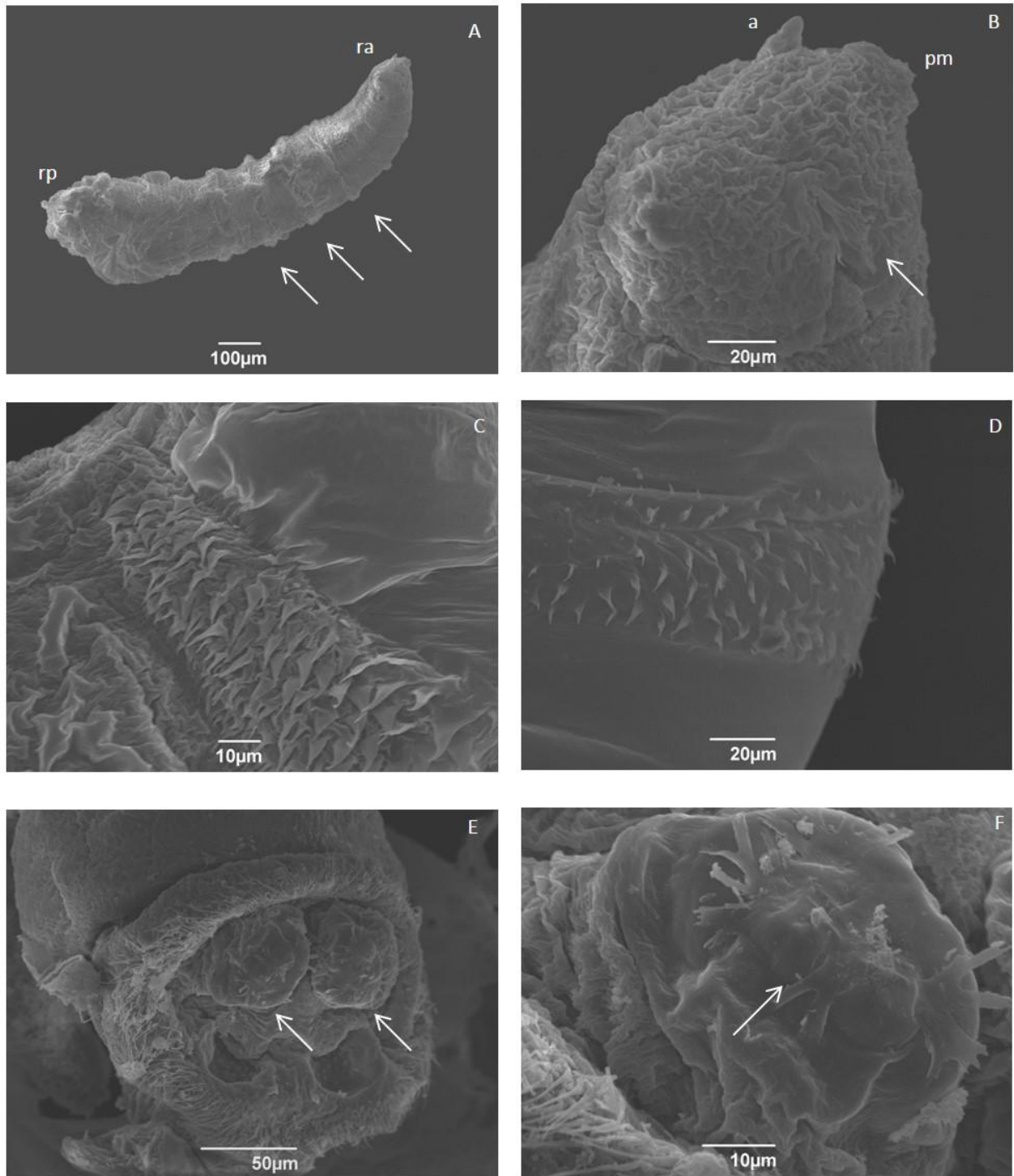


Figura 10: Micrografia eletrônica de varredura da larva de primeiro instar de *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae).

A – Corpo da larva composto por grupos de espinhos localizados entre os segmentos (setas); região anterior (ra) e região posterior (rp) do corpo (x110); **B** – Região cefálica com antena (a), palpo maxilar (pm) e peças bucais (seta) (x900); **C** – Detalhe dos espinhos do collar cefálico entre a região cefálica e o primeiro segmento torácico (x1100); **D** – Detalhe dos espinhos entre os segmentos do corpo (x1100); **E** – Segmento anal com tubérculos anais e espiráculos posteriores (setas) (x500); **F** – Espiráculo posterior (seta) (x1900).

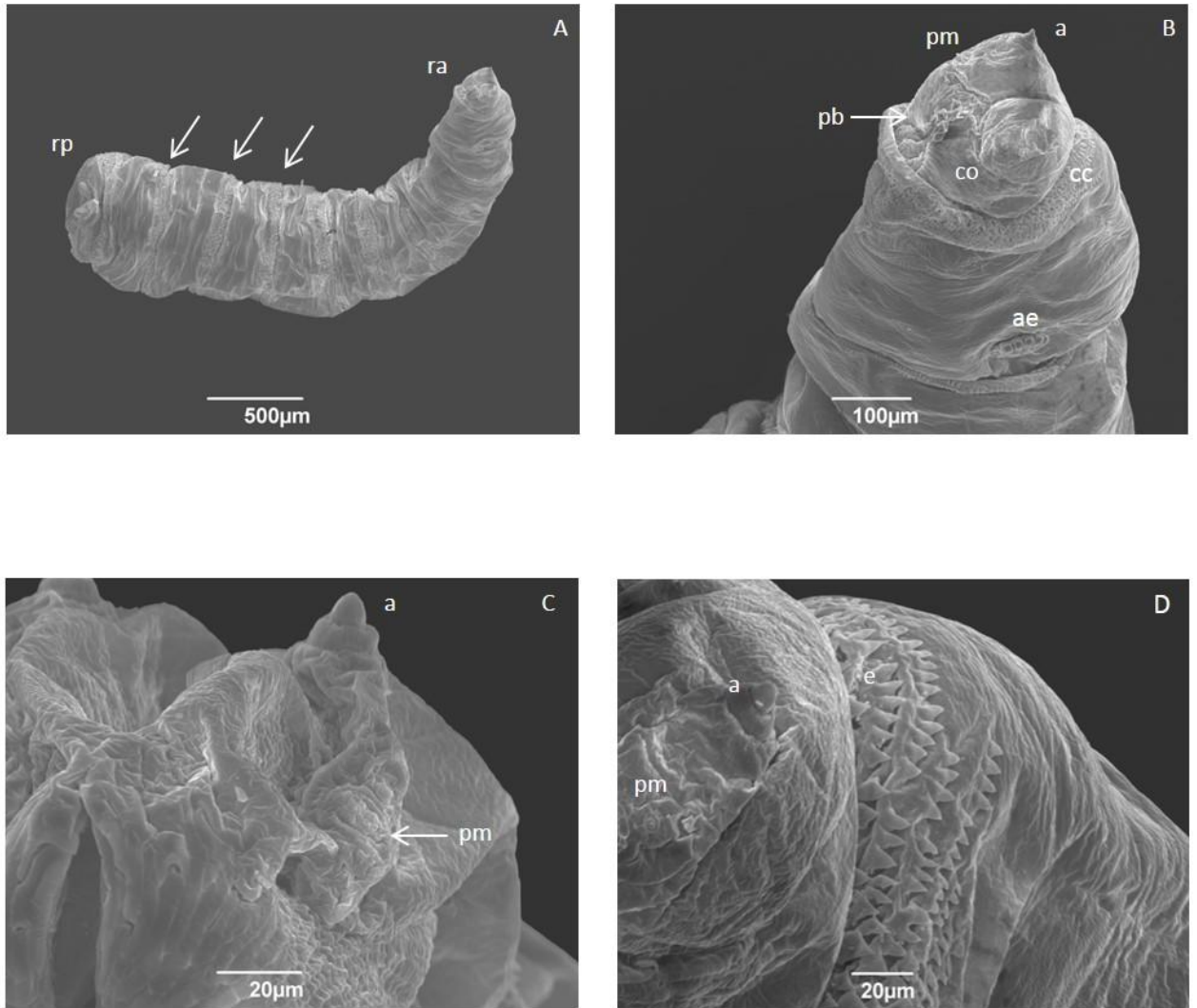


Figura 11: Micrografia eletrônica de varredura da larva de segundo instar de *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae).

A – Corpo da larva composto por grupos de espinhos localizados entre os segmentos (setas); região anterior (ra) e região posterior (rp) do corpo (x43); **B** – Região cefálica com antena (a), palpo maxilar (pm), peças bucais (pb), cristas orais (co), espinhos do collar cefálico (cc), espiráculo anterior (ea) (x180); **C** – Detalhes da antena (a) e do palpo maxilar (pm) (x950); **D** – Antena (a), palpo maxilar (pm), espinhos entre os segmentos do corpo (e) (x700).

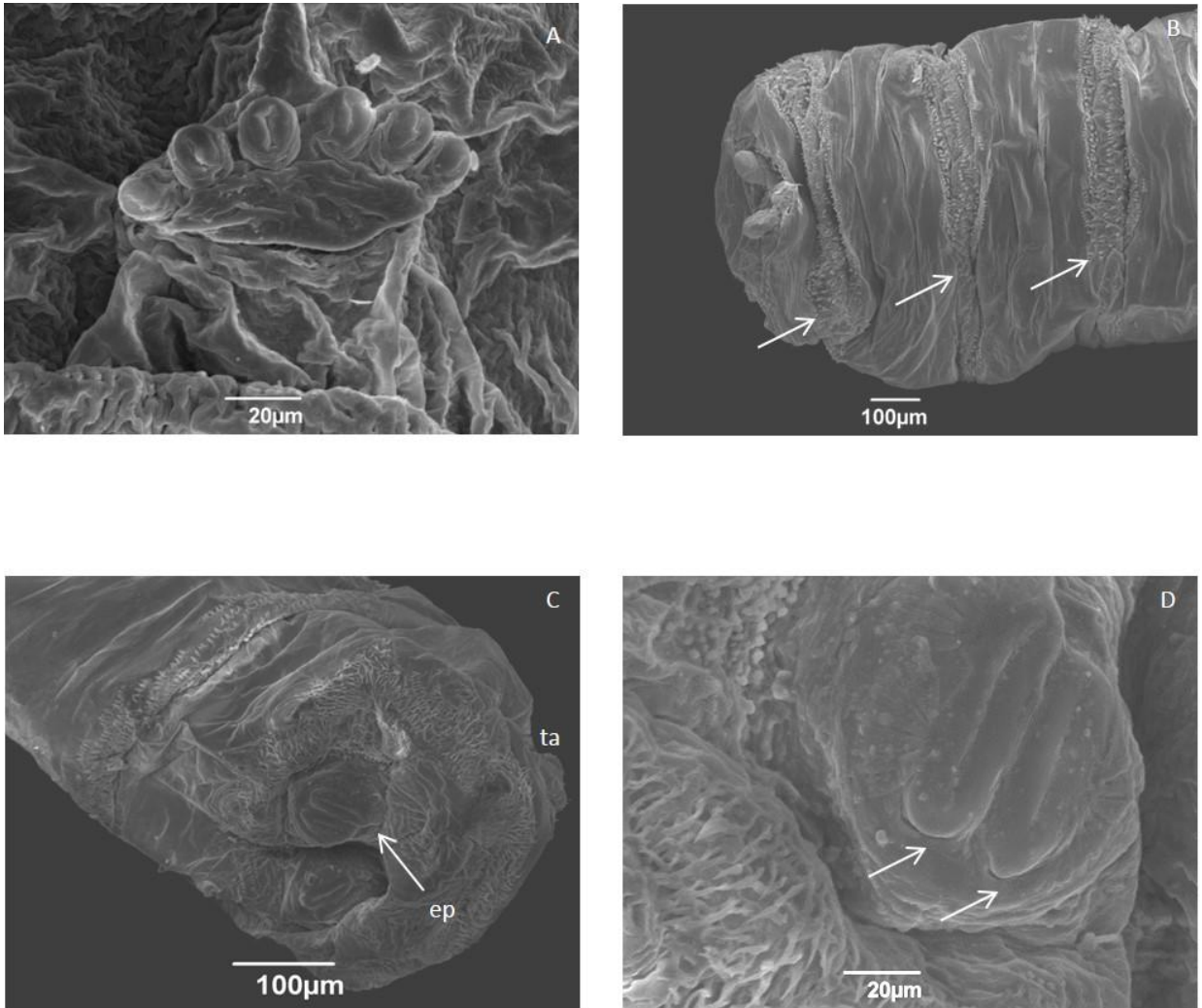


Figura 12: Micrografia eletrônica de varredura da larva de segundo instar de *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae).

A – Detalhe do espiráculo anterior disposto em fileira (x850); **B** – Espinhos intersegmentais (setas) (x110); **C** – Segmento anal com espiráculo posterior (ep) e tubérculos anais (ta); **D** – Espiráculo posterior com duas aberturas espiraculares (setas) (x430).

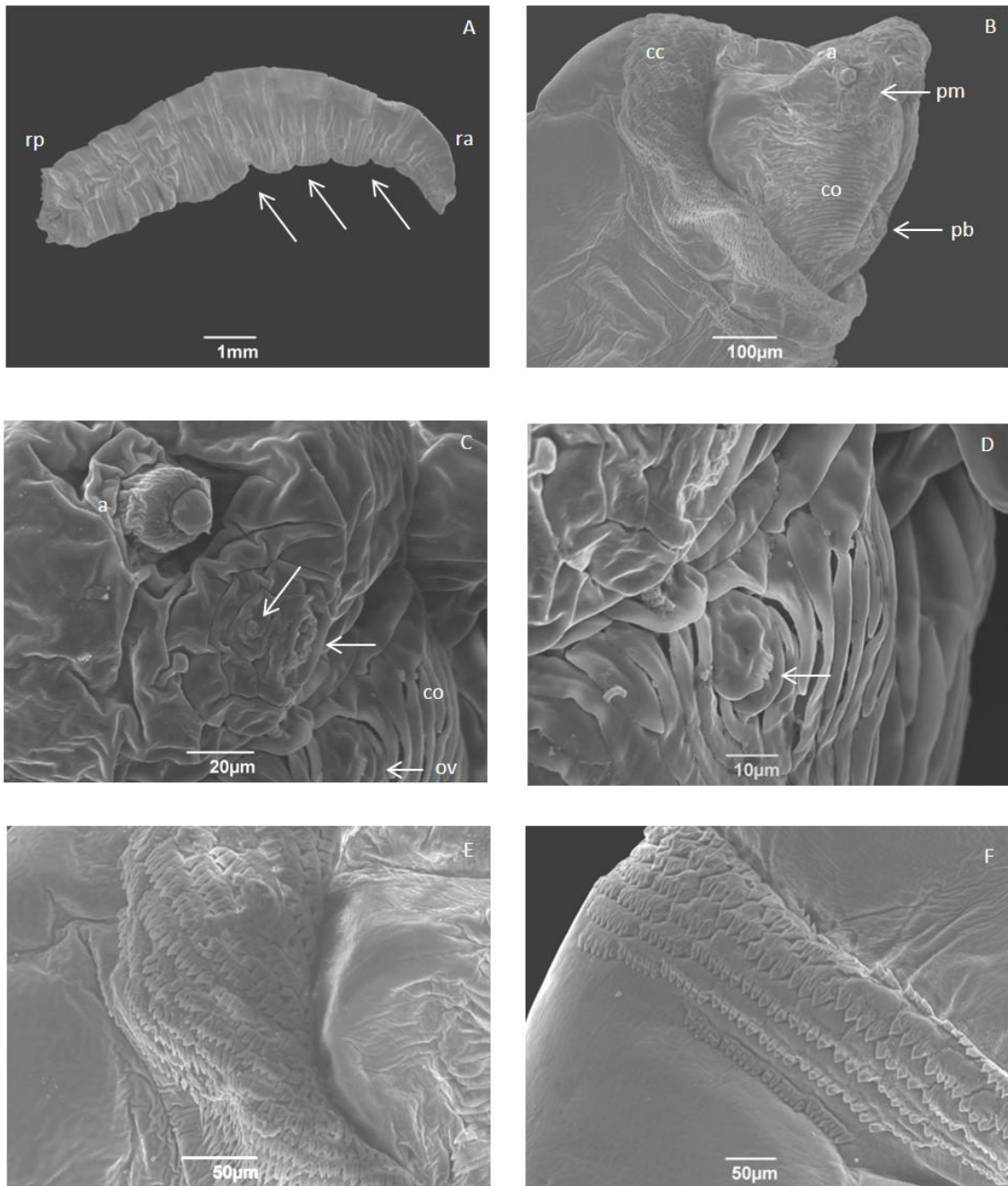


Figura 13: Micrografia eletrônica de varredura da larva de terceiro instar de *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae).

A – Corpo da larva composto por grupos de espinhos localizados entre os segmentos (setas); região anterior (ra) e região posterior (rp) do corpo (x14); **B** - Região cefálica com antena (a), palpo maxilar (pm), peças bucais (pb), cristas orais (co) e espinhos do collar cefálico (cc) (x170); **C** – Detalhe dos órgãos sensoriais com antena (a), palpo maxilar (setas), cristas orais (co), órgão ventral (ov) (x900); **D** – Detalhe do órgão ventral (ov) (x1400); **E** – Detalhe dos espinhos do collar cefálico, entre a região cefálica e primeiro segmento torácico (x400); **F** – Detalhe dos espinhos entre os segmentos do corpo (x280).

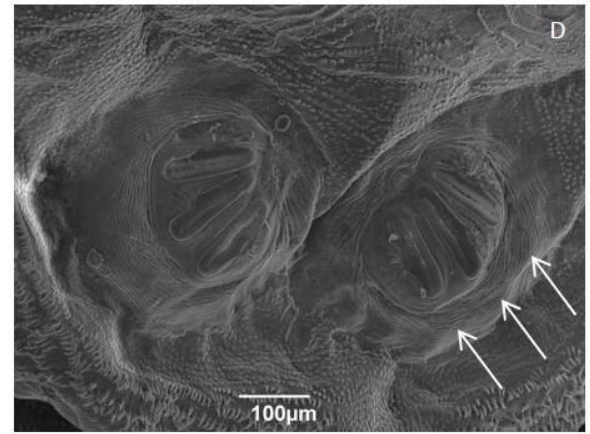
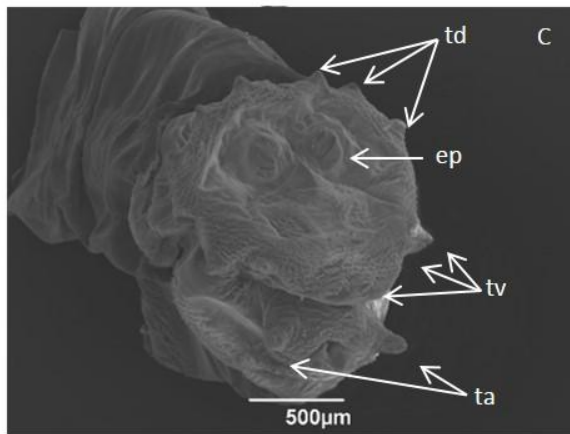
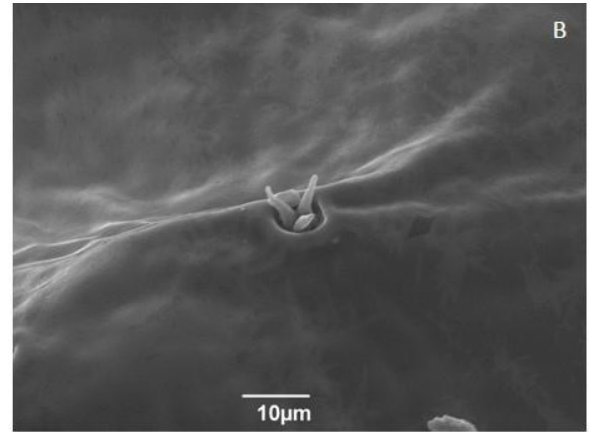
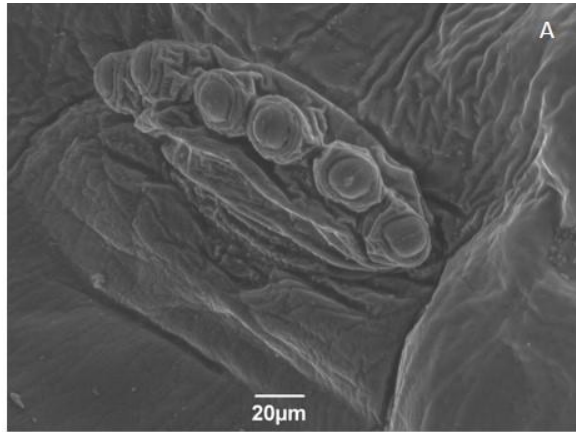


Figura 14:. Micrografia eletrônica de varredura da larva de terceiro instar de *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae). **A** – Detalhe do espiráculo anterior disposto em fileiras (x550); **B** – Órgão de Keilin (x1500); **C** – Segmento anal com espiráculo posterior (ep), tubérculos dorsais (td), ventrais (tv) e anais (ta) (x43); **D** – Espiráculos posteriores com três aberturas espiraculares (setas) (x160).

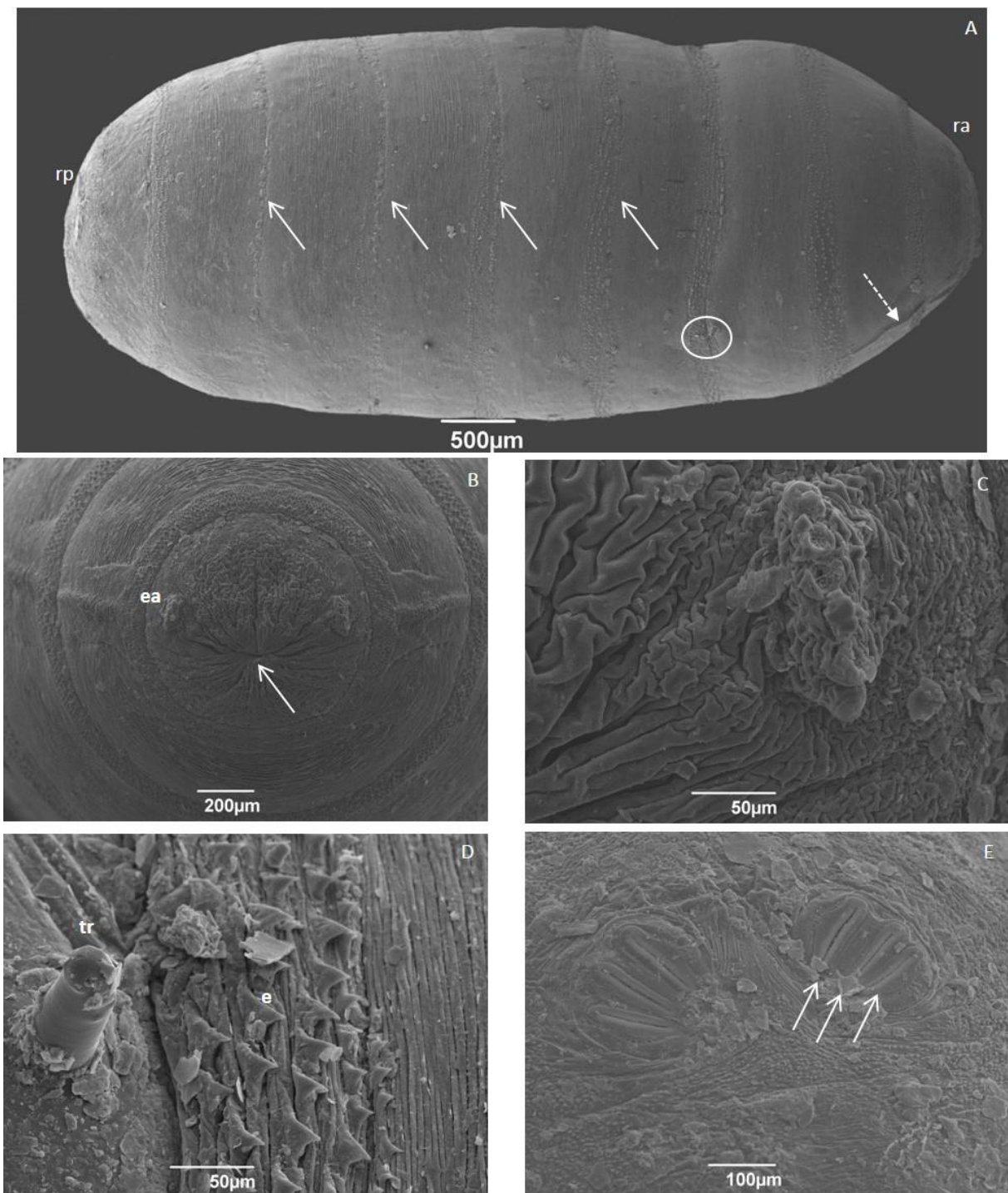


Figura 15: Micrografia eletrônica de varredura do pupário de *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae).

A – Pupário composto por grupos de espinhos localizados entre os segmentos (setas); região anterior (ra) e região posterior (rp); linha longitudinal (seta pontilhada); tubérculo respiratório (círculo) (x30); **B** – Região anterior retraída (seta) e espiráculo anterior (ea) (x75); **C** – Detalhe do espiráculo anterior disposto em fileiras (x450); **D** – Detalhe dos espinhos entre os segmentos do corpo (e) e tubérculo respiratório (tr) (x450); **E** – Espiráculos posteriores com três aberturas espiraculares (setas) (x120).

3.3- *Cochliomyia macellaria*

3.3.1– Ovos

Os ovos são alongados e de forma elipsoide, com a extremidade anterior mais afilada. A superfície dorsal é côncava e comporta a área mediana que se estende ao longo do comprimento do ovo (Figura 16A). O tamanho médio dos ovos de *C. macellaria* é de $1,31 \pm 0,06$ mm de comprimento e $324,33 \pm 51,5$ μ m de largura.

Além do formato afilado, a região anterior também é caracterizada pela presença da micrópila. Esta estrutura é composta pelo orifício de penetração do espermatozoide, em posição central, rodeado por pequenas projeções (Figura 16B).

A área mediana termina de maneira bifurcada ou em formato de “Y” próximo a micrópila e, na região posterior, a área mediana termina de maneira afilada (Figuras 16C, D). As ilhas localizadas dentro da área mediana são projeções individuais e não apresentam junções ou anastomoses, mas orifícios podem ser observados (Figura 16E). O exocórior é formado por células coriônicas com formato hexagonal e bordas pouco delimitadas (Figuras 16C, F).

3.3.2– Larvas de Primeiro Instar

O corpo da larva de primeiro instar de *C. macellaria* é típico de muscoides, com a região anterior afilada e a região posterior truncada. O tamanho médio destas larvas é de $1,79 \pm 0,23$ mm de comprimento e $230,19 \pm 98,01$ μ m de largura. O corpo da larva é composto por 12 segmentos (o primeiro que corresponde à cápsula cefálica, três torácicos e oito abdominais) delimitados por espinhos intersegmentais com formatos e tamanhos diferentes (Figura 17A).

A região cefálica é dividida em dois lobos que comportam as estruturas sensoriais (Figura 17B). Em cada lado, observa-se uma antena e o palpo maxilar (Figura 17C). A antena possui formato abaulado, formado por dois segmentos, comum às larvas de outros dípteros muscoides. O palpo maxilar é formado por um complexo de papilas sensoriais com arranjo circular e uma papila ou sensila localizada fora deste conjunto. Toda a estrutura que forma o complexo de palpo encontra-se em uma ligeira elevação (Figura 17C).

Ainda na região cefálica é possível visualizar os escleritos dentais que possuem aspecto frangeado. As cristas orais são reduzidas a duas linhas transversais à região cefálica. Os espinhos do colar cefálico apresentam dois formatos diferentes: nas fileiras mais próximas a região cefálica, os espinhos são achatados, formando placas com a extremidade afilada. Nas fileiras mais próximas ao primeiro segmento torácico, os espinhos são delgados com a extremidade bem afilada (Figura 17D).

O tegumento da larva é liso e os espinhos intersegmentais são facilmente visualizados. Estas estruturas também possuem forma semelhante a placas com a ponta bem afilada (Figura 17E). No último segmento larval, os tubérculos dorsais e ventrais são pouco visíveis, entretanto, o par de tubérculos anais se destaca (Figura 17F). Neste segmento, está localizado também o par de espiráculos posteriores, com duas aberturas espiraculares ligadas aos músculos de sustentação e o peritrema aberto sem a presença de cicatriz espiracular.

3.3.3– Larvas de Segundo Instar

A larva de segundo instar possui $2,08 \pm 0,22$ mm de comprimento médio e $368,62 \pm 65,11$ µm de largura média e tem aspecto geral semelhante ao instar anterior (Figura 18A). A região cefálica é maior e as estruturas são mais visíveis (Figuras 18B, C). A antena é composta por duas partes e as quatro papilas que formam o complexo do palpo maxilar estão dispostas dentro de uma elevação circular e uma delas se encontra fora desta estrutura (Figura 18C). As cristas orais são formadas por um grupo de lâminas paralelas, bem mais desenvolvidas do que as estruturas observadas no primeiro instar. Os escleritos dentais permanecem com o formato frangeado encontrado no instar anterior (Figura 18B). O órgão ventral está localizado nas cristas orais, logo abaixo do complexo de palpos maxilares (Figura 18D).

Os espinhos do colar cefálico são achatados, porém mais robustos e com a extremidade afilada. O segundo tipo de espinhos delgados encontrados no instar anterior não está presente na larva de segundo instar (Figura 18E). O espiráculo anterior é composto por 11-12 aberturas espiraculares dispostas em uma fileira única, com as fendas respiratórias bem visíveis (Figura 18F). Um par de órgãos de Keilin pode ser observado na região ventral dos segmentos torácicos (Figura 19A).

Os espinhos intersegmentais são achatados, como aqueles observados no instar anterior. No entanto, é possível observar uma segunda banda com espinhos menores, semelhantes àqueles intersegmentais, na região abdominal (Figura 19B).

No último segmento larval, os tubérculos ainda não estão bem desenvolvidos e são muito pequenos, exceto pelos tubérculos anais que se destacam neste segmento (Figura 19C). O peritrema é aberto e se localiza em uma ligeira elevação. O espiráculo posterior é composto por duas aberturas espiraculares rodeadas pelos músculos de sustentação (Figura 19D).

3.3.4– Larvas de Terceiro Instar

O aspecto da larva de terceiro instar é muito semelhante aos instares anteriores, exceto pelo tamanho (comprimento médio de $10,86 \pm 1,25$ mm e $1,62 \pm 0,49$ mm de largura). O corpo é mais robusto e as fileiras de espinhos intersegmentais e a segunda banda de espinhos são bem destacadas (Figura 20A).

O segmento cefálico também é mais desenvolvido e as estruturas apresentam o mesmo aspecto já observado no segundo instar (Figura 20B). As antenas são bastante semelhantes ao instar anterior, no entanto, as cinco papilas continuam reunidas, próximas umas das outras, mas não estão mais encerradas em uma elevação (Figura 20C).

Os espinhos do colar cefálico são bastante variados. Alguns apresentam aspecto achatado com três ou mais extremidades, enquanto outros são delgados (Figura 20D). No entanto, os espinhos intersegmentais são achatados com duas extremidades direcionadas para a região posterior da larva, enquanto no segundo grupo de bandas de espinhos, os mesmos apresentam aspecto similar, porém são menores e mais robustos (Figura 20E). A fileira de espinhos intersegmentais é incompleta nos segmentos abdominais 6 e 7 (Figura 20A, 21A).

O espiráculo anterior é composto por 12 aberturas espiraculares alinhadas e com uma fenda respiratória em cada uma (Figura 21B). O espiráculo posterior é protegido por uma ligeira cavidade formada pelo segmento anal. No entanto, a diferenciação dos tubérculos dorsais e ventrais é difícil, mesmo na larva de terceiro instar (Figura 21C). O espiráculo posterior tem o peritrema aberto, localizado em uma ligeira elevação. Neste é possível

observar as três aberturas espiraculares, com orientação radial e a ausência da cicatriz espiracular também pode ser percebida (Figura 21D).

3.3.5– Pupários

O pupário de *C. macellaria* possui comprimento médio de $4,92 \pm 0,62$ mm e largura média de $2,78 \pm 0,38$ mm. Assim como nas outras espécies de dípteros muscoides, a região cefálica é atrofiada e a posterior é truncada (Figura 22A). Apenas os escleritos dentais reduzidos podem ser visualizados (Figuras 22B, C). O espiráculo anterior ocupa a posição mais extrema da região anterior e é composto por 12 ramificações espiraculares dispostas em fileira única (Figura 22C, D).

O tegumento do pupário é formado pelo enrijecimento da cutícula da larva de terceiro instar, por isso, ele assume um aspecto enrugado. As dobras são facilmente visualizadas, intercaladas pelos espinhos intersegmentais que apresentam forma de placas, com as extremidades bifurcadas (Figura 22E, F).

Ainda devido ao processo de esclerotização para a formação do pupário, o par de espiráculos posteriores não se localiza em uma cavidade, como observado na larva de terceiro instar (Figura 22G). Cada espiráculo apresenta o peritrema aberto sem a cicatriz espiracular, localizado em uma ligeira elevação e com três aberturas espiraculares com orientação radial (Figura 22G).

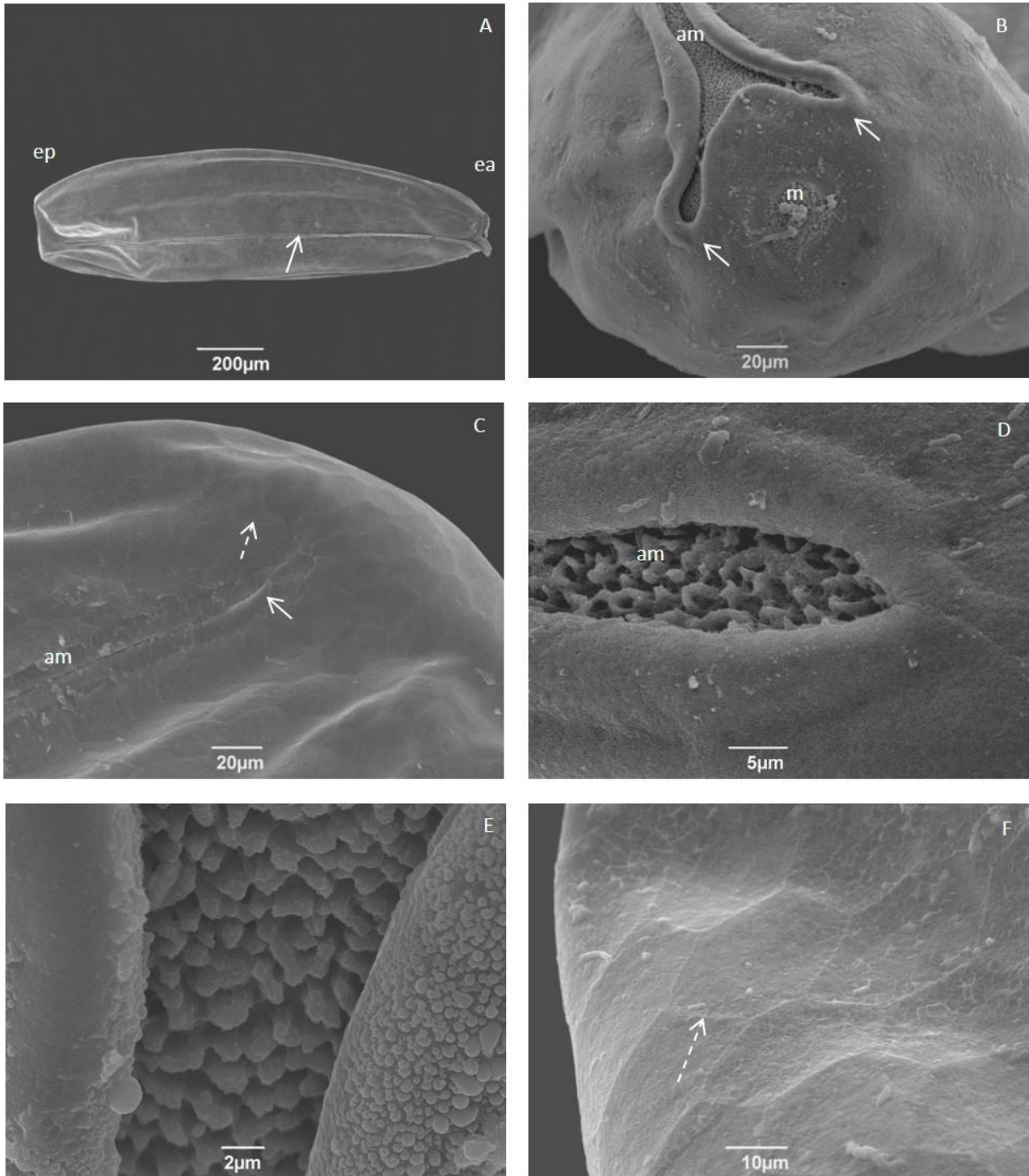


Figura 16: Micrografia eletrônica de varredura dos ovos de *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae).

A – Visão dorsal do ovo, extremidade anterior localizada a direita (ea), extremidade posterior localizada a esquerda (ep); área mediana ao longo do comprimento do ovo (seta) (x650); **B** – Área mediana (am) terminando em forma de “Y” próxima a região anterior (seta) e a micrópila (m) (x650); **C** – Visão dorsal, área mediana (ma) terminando de maneira afilada (seta), células coriônicas (seta pontilhada) (650x); **D** – Visão dorsal, detalhe da área mediana (am), terminando de maneira afilada (3000x); **E** – Ilhas da área mediana sem anastomoses (x5500); **F** – Detalhe das bordas das células coriônicas (seta pontilhada) (x1600).

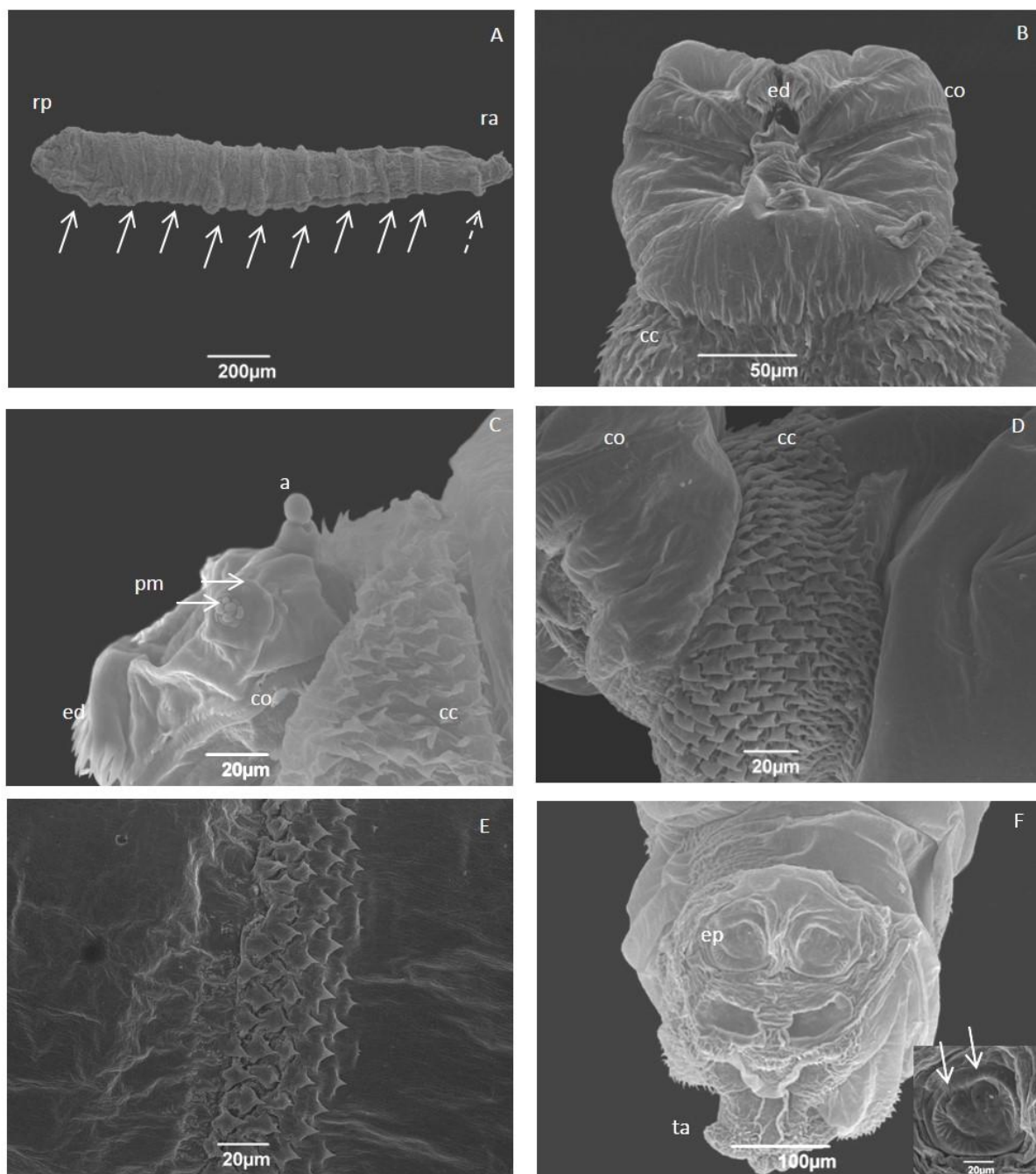


Figura 17: Micrografia eletrônica de varredura das larvas de primeiro instar de *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae).

A – Corpo da larva composto por grupos de espinhos localizados entre os segmentos (setas); região anterior (ra) e região posterior (rp) do corpo larval, espinhos do colar cefálico (setas pontilhadas) (x80); **B** – Região cefálica com escleritos dentais (ed), cristas orais (co) e espinhos do colar cefálico (cc) (x500); **C** – Detalhe da região cefálica com antena (a), palpo maxilar (pm, setas), escleritos dentais (ed), cristas orais (co) e espinhos do colar cefálico (cc) (800x); **D** – Espinhos do colar cefálico (cc) e cristas orais (co) (x700); **E** – Espinhos localizado entre os segmentos torácicos (x650); **F** – Segmento anal com tubérculos anais (ta) e espiráculo posterior (ep): Detalhe: Espiráculo posterior com duas aberturas espiraculares (setas) (x700).

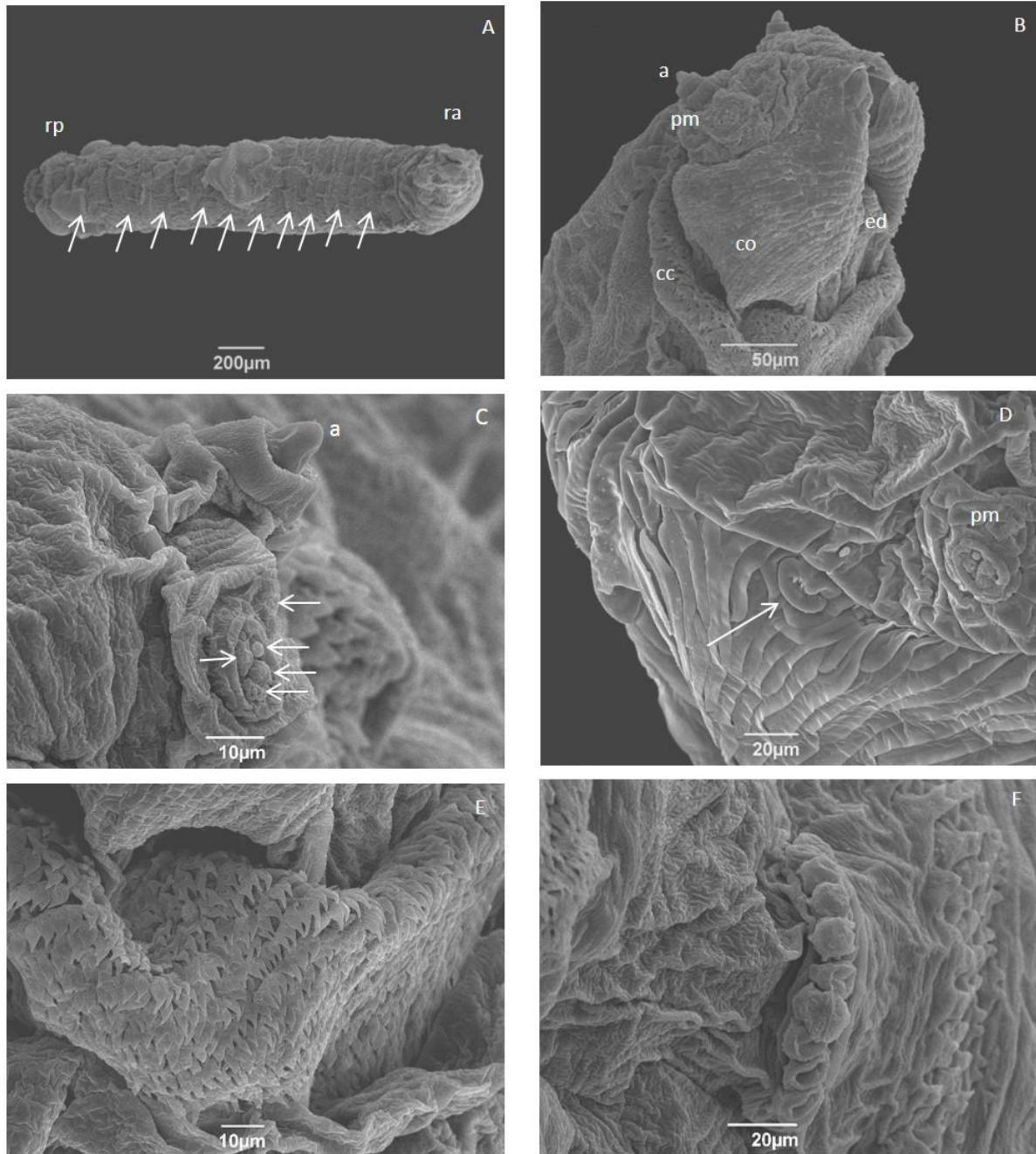


Figura 18: Micrografia eletrônica de varredura da larva de segundo instar de *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae).

A – Corpo da larva composto por grupos de espinhos localizados entre os segmentos (setas); região anterior (ra) e região posterior (rp) do corpo larval (x60); **B** – Região cefálica com antena (a), palpo maxilar (pm), escleritos dentais (ed), cristas orais (co) e espinhos do colar cefálico (cc) (x400); **C** – Detalhe da região cefálica com antena (a) e palpo maxilar com cinco papilas (setas) (1500x); **D** – Órgão ventral (seta) próximo ao complexo do palpo maxilar (pm) (x700); **E** – Espinhos do colar cefálico, localizado entre a região cefálica e o primeiro segmento torácico (x1200); **F** – Espiráculo anterior com as aberturas espiraculares dispostas em fileira (x900).

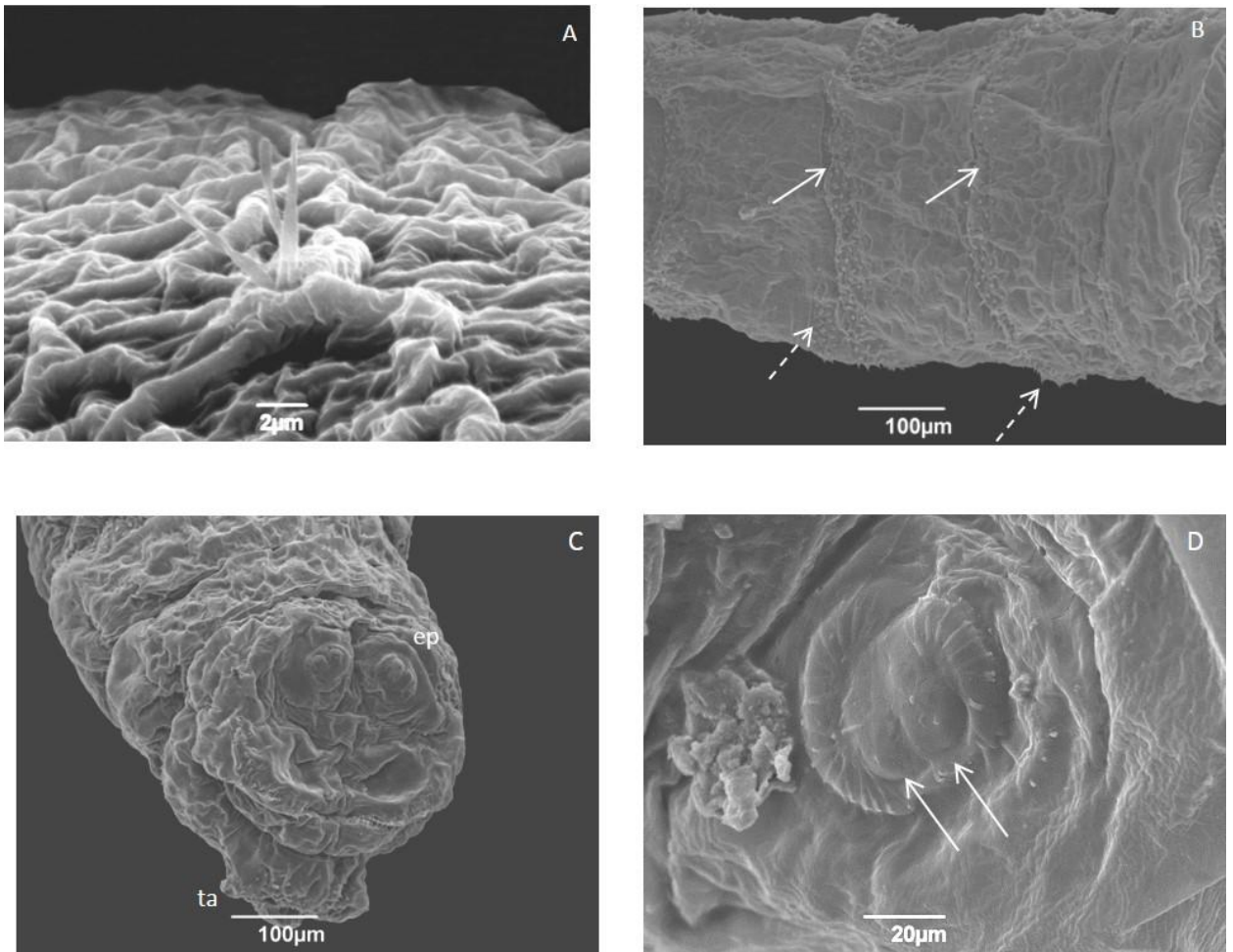


Figura 19: Micrografia eletrônica de varredura da larva de segundo instar de *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae).

A – Órgão de Keilin (x5500); **B** – Espinhos entre os segmentos do corpo (setas) e banda de espinhos (setas pontilhadas) (x190); **C** – Segmento anal com tubérculos anais (ta) e espiráculos posteriores (ep) (x190); **D** – Espiráculo posterior com duas aberturas espiraculares (setas) (x500).

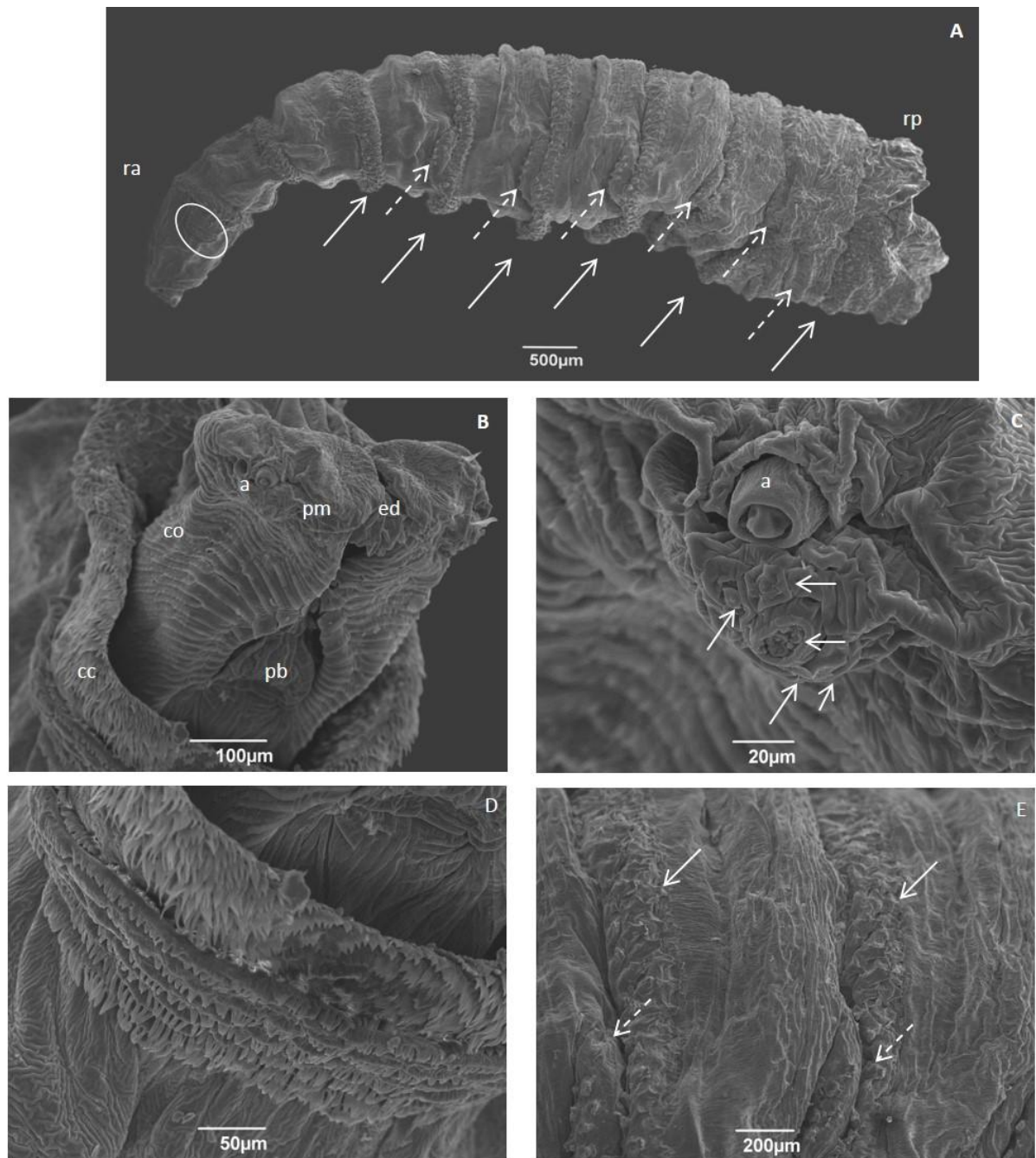


Figura 20: Micrografia eletrônica de varredura da larva de terceiro instar de *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae).

A – Corpo da larva composto por grupos de espinhos entre os segmentos (setas) e bandas de espinhos (setas pontilhadas); região anterior (ra) e região posterior do corpo da larva (rp); espiráculo anterior (círculo) (x30); **B** – Região cefálica com antena (a), palpo maxilar (pm), esclerito dental (ed), peças bucais (pb), cristas orais (co) e espinhos do collar cefálico (cc) (x200); **C** – Detalhe da região cefálica com antena (a) e palpo maxilar com cinco papilas (setas) (800x); **D** – Espinhos do collar cefálico localizado entre a região cefálica e o primeiro segmento torácico (x350); **E** – Espinhos entre os segmentos (setas) e banda de espinhos (setas pontilhadas) (x75).

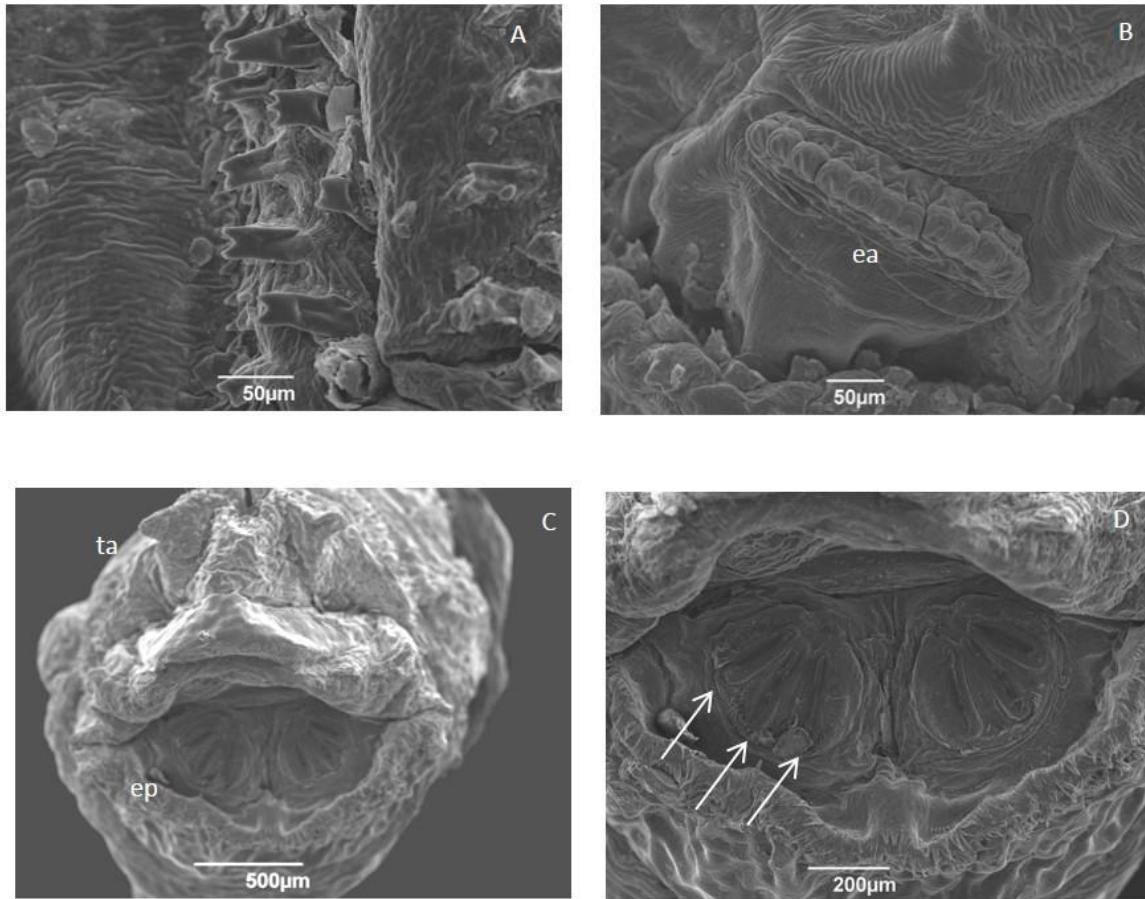


Figura 21: Micrografia eletrônica de varredura da larva de terceiro instar de *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae).

A – Detalhe dos espinhos entre os segmentos, com 2-3 pontas (x350); **B** – Espiráculo anterior (ea) com aberturas espiraculares dispostas em fileiras (x270); **C** – Segmento anal com tubérculos anais (ta) e espiráculo posterior (ep) (x50); **D** – Espiráculo posterior com três aberturas espiraculares (setas) (x95).

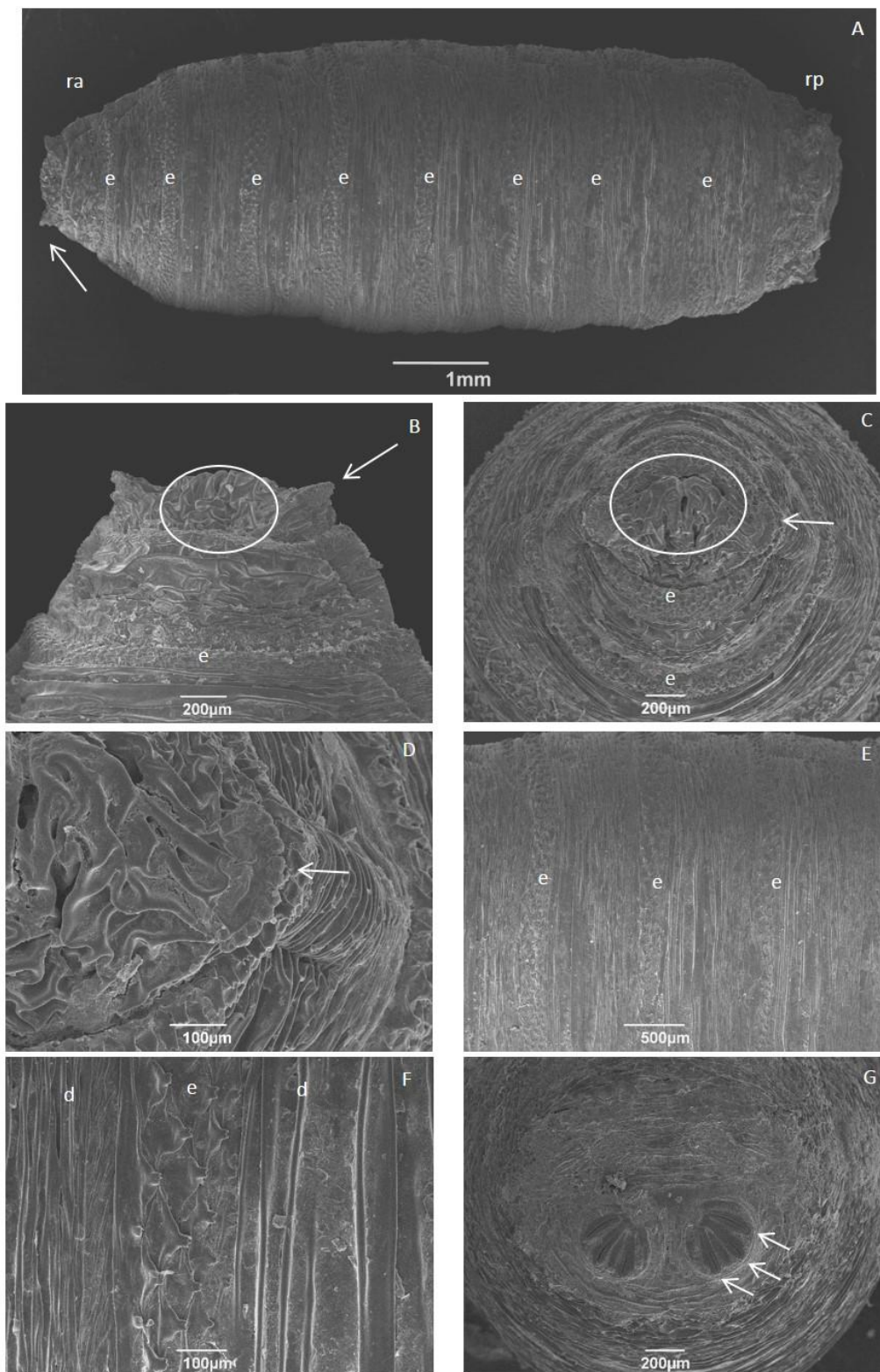


Figura 22: Micrografia eletrônica de varredura do pupário de *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae). **A** – Visão ventral do pupário terminando de forma abrupta na região posterior (rp) e afilado na região anterior (ra); espiráculo anterior (seta) e espinhos entre os segmentos (e) (x23); **B** – Região cefálica com espiráculo anterior (seta), escleritos dentais (círculo) e espinhos (e) (x70); **C** – Visão frontal da região cefálica com espiráculo anterior (seta), escleritos dentais (círculo) e espinhos (e) (60x); **D** – Visão frontal do espiráculo anterior (seta) (x170); **E** – Espinhos entre os segmentos (e) (x37); **F** – Detalhe dos espinhos entre os segmentos e dobras do tegumento (d) (x150); **G** – Espiráculo posterior com três aberturas espiraculares (setas) (x60).

4. DISCUSSÃO

Imaturos de diversas espécies de dípteros muscoides encontram-se descritos na literatura, através de técnicas de microscopia de luz e microscopia eletrônica. No início, a proposta da maioria dos autores era a descrição dos espécimes, mas com o passar do tempo, foi surgindo a necessidade de comparar caracteres taxonômicos com o objetivo de facilitar a identificação das espécies. Neste trabalho, foram encontradas algumas similaridades em relação à forma e a outros caracteres observados nas espécies estudadas quando comparadas entre elas e aos dados da literatura.

HINTON (1960) descreveu os ovos de dípteros muscoides como estruturas alongadas, revestidas por células coriônicas que se apresentam distintas de acordo com a sua localização, se na porção interna da área mediana ou recobrimdo o restante do ovo.

A área mediana apresenta-se diferenciada sob a forma de uma abertura dorsal que vai da extremidade anterior a posterior do ovo, formada por estruturas interconectadas, denominadas ilhas, e por pilares, gerando espaços abertos denominados aerópilos (ERZINLIOGLU, 1989; GREENBERG & KUNICH, 2002). A organização dessas estruturas faz com que o interior da área mediana se assemelhe a uma esponja, retendo o ar nos aerópilos e permitindo as trocas gasosas do embrião com o meio. Além da função de facilitar a respiração do embrião, a linha mediana também oferece menor resistência para a eclosão da larva. A larva pressiona esta região de descontinuidade para que o ovo se rompa e assim, possa ir para o ambiente externo. A área mediana está presente em diversas famílias de dípteros ciclorrhafos terrestres.

LIU & GREENBERG (1989) fizeram uma breve descrição dos ovos de *C. macellaria* coletados em Chicago, Estados Unidos da América. Estes autores relatam que os braços da área mediana se estendem, no máximo, até a metade da micrópila. Além disso, os mesmos referem-se, ainda, as ilhas da área mediana como estruturas em formato afilado, semelhante a estacas. Esta caracterização também foi encontrada nas amostras coletadas no Brasil.

No entanto, tais informações não são suficientes para identificar os ovos de *C. macellaria*, uma vez que estas também podem ser observadas em outras espécies coletadas na Região Neotropical. MENDONÇA *et al.* (2008) e SUKONTASON *et al.* (2007) relataram a mesma combinação de caracteres em ovos de *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794), *Lucilia eximia* e *L. cuprina*, representantes de dois gêneros da mesma família a qual pertence *C. macellaria*. Além disso, estas espécies possuem hábitos ecológicos muito parecidos, podem causar miíases secundárias e são frequentemente coletadas em carcaças (GUIMARÃES & PAPAVERO, 1999; BARBOSA *et al.*, 2010), o que poderia dificultar ainda mais a diferenciação entre as espécies.

A camada mais externa do ovo ou exocórrion é rígida o suficiente para proteger o embrião do ressecamento. Os limites das células foliculares que deram origem ao exocórrion tornaram-se visíveis através de um processo chamado densificação, que provoca um aumento da densidade do exocórrion ainda durante a fase embrionária (MAZUR *et al.*, 1989; CHAPMAN, 1998).

O padrão das células foliculares em *C. macellaria* é muito semelhante à de *Cochliomyia hominivorax* e *C. megacephala*. Entretanto, PETERSON & NEWMAN (1991) observaram que as células do exocórrion de *C. hominivorax* diminuem seu tamanho a medida

que estão mais próximas da região posterior do ovo. O exocócion de *C. macellaria* apresenta células com o mesmo tamanho ao longo de todo o ovo.

MENDONÇA *et al.* (2008) relataram a presença de bordas elevadas e destacadas apenas em *Chrysomya putoria* (Wiedemann, 1818). No muscídeo *Ophyra aenescens* (Wiedemann, 1830), esses autores descrevem o exocócion todo ornamentado, não somente nas bordas das células como também por toda a superfície. Na espécie *C. macellaria*, as células do exocócion possuem formato hexagonal com bordas lisas. Infelizmente, a maioria dos autores se limitou a observar estruturas relacionadas ao comprimento e forma da micrópila e da área mediana, não destacando as células do exocócion (LIU & GREENBERG, 1989; GREENBERG & SINGH, 1995).

A micrópila é o orifício pelo qual os espermatozoides penetram até atingir o oviduto, local onde ocorre a fertilização. A ornamentação ao redor deste orifício foi relatada por diversos estudos, mas somente através da microscopia eletrônica de varredura o tipo de ornamentação fica evidenciado. As principais ornamentações são do tipo projeção, encontradas em *C. megacephala*, *Chrysomya albiceps*, *Chrysomya nigripes* (Aubertin, 1932); e do tipo depressões, como relatadas em *C. putoria*; ou ainda sem nenhum tipo de adorno, como observado em *L. cuprina* (SUKONTASON *et al.*, 2004; 2007; MENDONÇA *et al.*, 2008; 2010). Tanto em ovos de *C. macellaria* observados neste estudo, quanto naqueles coletados por LIU & GREENBERG (1989), nos Estados Unidos, as ornamentações são do tipo projeções.

Os caracteres da área mediana, quando combinados entre si, podem fornecer informações importantes para distinguir os ovos dos membros da família Calliphoridae (GREENBERG & KUNICH, 2002; MENDONÇA *et al.*, 2008). Segundo MENDONÇA *et al.* (2008), na região posterior, a área mediana termina de forma arredondada em *C. megacephala*, enquanto em *C. macellaria* observadas neste estudo, termina de maneira afilada. Além disso, as ilhas da área mediana apresentam orifícios em *C. macellaria*, entretanto, são lisas em *C. megacephala*. A combinação destes caracteres permite diferenciar os ovos de *C. macellaria* das outras espécies com as quais esse muscoide apresenta maior semelhança.

Os estudos com larvas de dípteros muscoides são mais frequentes do que com ovos e geralmente oferecem uma riqueza maior de caracteres a serem explorados.

Assim como ocorre com os adultos da ordem Diptera, os imaturos também apresentam características muito distintas quando comparados com outras ordens de insetos. O caráter que melhor define os imaturos desta ordem é ausência de pernas torácicas articuladas combinada com a movimentação direcionada ativa (TESKEY, 1981). Geralmente, os imaturos de insetos que são ápodos são imóveis ou se movem lentamente, com movimentos erráticos. Entretanto, os imaturos de dípteros se movem com desenvoltura através de movimentos peristálticos do corpo (TESKEY, 1981).

As larvas de Muscomorpha possuem o corpo dividido em 12 segmentos, sendo o primeiro considerado por alguns autores como pseudo-cefálico devido a redução e retração quase total da cabeça para dentro do primeiro segmento torácico, seguido de três segmentos torácicos e oito segmentos abdominais (TESKEY, 1981; GUIMARÃES & AMORIM, 2006). De acordo com GUIMARÃES & AMORIM (2006), o corpo das larvas assemelha-se a um cone, com a abertura bucal na extremidade afilada e com o segmento anal e o espiráculo posterior situados na extremidade truncada. Segundo GREENBERG & KUNICH (2002), esta forma de corpo é ergonomicamente a mais eficiente para alimentação no tecido e no enterramento para pupação.

As larvas estudadas apresentam o mesmo aspecto geral do corpo descrito anteriormente. Todas as fases larvais possuem a região anterior do corpo afilada e a posterior truncada.

Ainda segundo GUIMARÃES & AMORIM (2006), em Muscomorpha não existe evidência de cabeça esclerotizada, sendo o aparelho bucal constituído apenas por um par de ganchos curvos, denominados mandíbulas onde podem ser observados dentes em algumas espécies. De acordo com TESKEY (1981), a caracterização de Muscomorpha é a presença do segmento pseudo-cefálico membranoso e sensorial, juntamente com o desenvolvimento do esqueleto cefalofaríngeo interno e bastante esclerotizado.

As observações acerca dos imaturos das espécies estudadas corroboram as descrições gerais propostas por TESKEY (1981) e GUIMARÃES & AMORIM (2006) para larvas de Muscomorpha.

A região cefálica ou pseudo-cefálica dos imaturos estudados é composta por dois centros sensoriais. O primeiro deles denominado anteno-maxilar que comporta as antenas e o complexo do palpo maxilar. As antenas também conhecidas por órgãos dorsais são divididas em dois segmentos, um basal e o outro de formato abaulado. O complexo do palpo maxilar ou órgãos terminais são estruturas pequenas formadas por cinco papilas dispostas concentricamente. Acredita-se que as antenas possuam função olfativa e o complexo do palpo desempenhe função quimio e mecano-receptora, assim como relatado para *Musca domestica* Linnaeus, 1758 (CHU-WANG & AXTELL, 1971; 1972).

A organização das antenas e do complexo do palpo maxilar das espécies estudadas é muito semelhante ao proposto por outros autores. No entanto, convém ressaltar que os imaturos de *P. (E.) collusor* apresentam as papilas do complexo do palpo maxilar em uma cavidade, diferente do observado para *L. cuprina* e *C. macellaria*, onde estas estruturas estão em uma ligeira elevação. Esta disposição das papilas em uma elevação também foi observada por outros autores, em espécies de diferentes famílias, como por exemplo, em *M. domestica*, *C. hominivorax* e espécies do gênero *Chrysomya* (LEITE & GUEVARA, 1993; MENDONÇA *et al.*, 2010, 2012a,b; SZPILA *et al.*, 2014).

SINGH *et al.* (2012) descreveram as antenas e o complexo do palpo maxilar do sarcófago *Parasarcophaga ruficornis* (Fabricius, 1794) como um grupo de papilas agrupadas e envolvidas por cristas cuticulares, se assemelhando a uma flor. LEITE & LOPES (1989), estudando uma outra espécie da mesma família, *Peckia* (*Peckia*) *chrysostoma* (Wiedemann, 1830) relataram a presença de papilas formando o complexo de palpo maxilar, mas não localizados em cavidade. Este arranjo não foi observado em membros de outras famílias de Muscomorpha, acredita-se que pode ser uma característica restrita ao subgênero *Euboettcheria*.

O segundo centro sensorial é composto por um órgão bem pequeno, localizado no meio das cristas orais denominado órgão ventral. Estas estruturas são enervação oriundas do nervo maxilar e são difíceis de serem encontradas (TESKEY, 1981). Segundo CHU-WANG & AXTELL (1972), estas estruturas são formadas por uma sensila quase imperceptível (V_2), com função quimio-receptora e um conjunto de três sensilas mais visíveis (V_1 , V_3 , V_4) que desempenha função mecano-receptora. Essa estrutura não apresentou diferença entre as espécies observadas neste estudo, assim como com algumas espécies já descritas por outros autores (CHU-WANG & AXTELL, 1972; SINGH *et al.*, 2012; SZPILA *et al.*, 2014).

Na porção latero-ventral dos segmentos torácicos é possível visualizar um conjunto de três sensilas que possuem função mecano-receptora na larva. No entanto, através de estudos de anatomia e fisiologia dos neurônios presentes na base destas sensilas, foi possível determinar que os órgãos de Keilin irão dar origem as pernas dos insetos adultos (LAKES-HARLAN *et al.*, 1991). Essa estrutura é muito semelhante entre as espécies estudadas e quando comparadas com a literatura (SZPILA *et al.*, 2013; 2014).

O sistema respiratório dos dípteros é composto pelo sistema de traqueias internas e sistema de espiráculos externos (TESKEY, 1981). Diversos autores destacam a importância do número e da localização das aberturas espiraculares em Diptera. O número pode variar de 10 pares (larvas holopnêusticas) a ausência de espiráculos (apnêusticas), onde a respiração é feita através de filamentos espiraculares conectados ao tegumento larval. As larvas do grupo dos Cyclorrhapha, subdivisão dentro do grupo de Muscomorpha, são anfipnêusticas, isto é, um par de espiráculos digitados localizado na área dorso-lateral do primeiro segmento torácico e um par localizado no último segmento abdominal.

O espiráculo anterior só pode ser visualizado a partir do segundo instar larval, desta forma, as larvas de primeiro instar podem ser consideradas metapnêusticas. Esta estrutura é composta por ramificações espiraculares dispostas em fileiras alinhadas ou de forma irregular. O número de ramificações ou aberturas pode variar de um a quatro ou 30 até mais, sendo esta a característica mais importante e mais utilizada na diferenciação de espécies (GUIMARÃES & AMORIM, 2006).

SUKONTASON *et al.* (2010) relataram 4-7 aberturas espiraculares em *L. cuprina* na Tailândia, através da microscopia óptica. SANDEMAN *et al.* (1987) observaram insetos coletados na Austrália, mas não descreveram esta estrutura. SUKONTASON *et al.* (2006) observaram 5-7 aberturas nos pupários desta espécie coletados na Tailândia. GREENBERG & SZYSKA (1984) observaram 5-6 ramificações em *L. cuprina* e 6-8 aberturas em *L. eximia* coletadas no Peru.

Segundo GREENBERG & SINGH (1995) pode haver diferenças morfológicas entre as populações de dípteros estudados. Essas variações refletem as alterações sofridas pelas espécies como forma de adaptação ao novo habitat.

As larvas e os pupários de *L. cuprina* coletadas neste estudo apresentam 6-7 ramificações espiraculares. No Brasil, CARVALHO (2006) redescobriu larvas de terceiro instar de espécies de importância forense através da microscopia óptica e observou 7 aberturas espiraculares tanto para *L. eximia* quanto para *L. cuprina*.

A outra espécie da família Calliphoridae estudada, *C. macellaria* apresentou 11-12 aberturas respiratórias. GREENBERG & SZYSKA (1984) relataram 8-12 aberturas no espiráculo anterior desta espécie coletadas no Peru, enquanto outros autores observaram 8-11 ramificações em amostras da Colômbia (GUIMARÃES & PAPAVERO, 1999; FLOREZ & WOLFF, 2009). LEITE & GUEVARA (1993) descreveram os imaturos de *C. hominivorax* coletadas no Brasil e observaram apenas 9 aberturas espiraculares. A alteração no número de aberturas no espiráculo anterior pode ser efeito de variações populacionais (GREENBERG & SZYSKA, 1984).

No representante da família Sarcophagidae estudado, foi observada uma variação 11-14 aberturas espiraculares na larva de segundo instar de *P. (E.) collusor*, enquanto nas larvas de terceiro instar, o número de aberturas foi maior, de 15-16. Isso corrobora as observações realizadas por ERZINCLIOGLU (1985) que indicou o frequente aumento na quantidade de aberturas espiraculares em larvas de terceiro instar com relação ao instar anterior.

Além disso, ISHIJIMA (1967) e SUKONTASON *et al.* (2003a) observaram um grande número de aberturas espiraculares em algumas espécies desta família, acima de 20 aberturas. No entanto, LOPES & LEITE (1987) relataram uma considerável redução neste número para espécies coletadas no Brasil. Estes autores descreveram imaturos de quatro espécies de sarcófagídeos e o número de aberturas espiraculares variou de 8-14, dispostas em fileiras irregulares. PEREZ-MORENO *et al.* (2006) fizeram um levantamento das espécies do gênero *Sarcophaga* da região Paleártica e observaram que todas as espécies apresentam as aberturas espiraculares dispostas em fileiras irregulares. Essa organização não foi relatada por nenhum

autor em outras espécies de importância forense, assim, sugere-se que esta pode ser uma característica que permita a identificação de representantes da família Sarcophagidae.

O espiráculo posterior está localizado no último segmento abdominal, na porção terminal do segmento anal. Esta estrutura é composta por aberturas espiraculares em forma de fenda que aumentam em número com a maturação da larva, entretanto, no caso de *Muscomorpha*, pode variar de uma até três aberturas.

A região que circunda essas aberturas recebe o nome de peritrema que pode ser aberto, também conhecido por incompleto, ou fechado, chamado de completo. Além disso, ainda pode ser encontrada uma cicatriz do instar anterior no ponto de convergência das aberturas respiratórias denominada cicatriz ecdisial ou espiracular (TESKEY, 1981). GUIMARÃES & AMORIM (2006) afirmam que a estrutura e a posição dos espiráculos posteriores são muito úteis na separação de gêneros e espécies de *Cyclorrhapha*.

O espiráculo posterior de *P. (E.) collusor* é típico dos membros de *Muscomorpha* e está localizado em uma cavidade formada pelos tubérculos do segmento anal, característica típica dos membros da família Sarcophagidae (LEITE & LOPES, 1989; SUKONTASON *et al.*, 2003a; VAIRO, 2011; SINGH *et al.*, 2012). Dentro desta cavidade, o peritrema aberto e sem a cicatriz espiracular está em uma ligeira depressão. O número de aberturas espiraculares é correspondente ao instar de desenvolvimento da larva.

LEITE & LOPES (1989) descreveram as larvas de primeiro instar de *P. chrysostoma* e observaram espinhos filiformes, semelhantes a pelos localizados lateralmente as aberturas espiraculares. BUENAVENTURA (2013) descreveu larvas de primeiro e segundo instar desta mesma espécie através da microscopia óptica e destacou espinhos afilados circundando o espiráculo posterior aberto e sem a cicatriz ecdisial. Estes espinhos ou pelos não são observados nos imaturos de *P. (E.) collusor*.

Dentro da família Calliphoridae, a placa espiracular não está em cavidade, ou seja, está no mesmo nível do tegumento do segmento anal. Em outras famílias, como por exemplo, espécies do gênero *Ophyra* (Muscidae), os espiráculos podem estar em elevações projetadas do segmento anal (COURI & ARAUJO, 1991; SUKONTASON *et al.*, 2003a).

O espiráculo posterior de *L. cuprina* está localizado em um peritrema aberto com a cicatriz ecdisial visível. O número de aberturas espiraculares nesta espécie é correspondente ao instar de desenvolvimento. Essas observações corroboram estudos anteriores utilizando a microscopia eletrônica de varredura para descrever pupários desta espécie na Tailândia (SUKONTASON *et al.*, 2006) e imaturos retirados de lesão na Austrália (SANDEMAN *et al.*, 1987). Entretanto, o grupo de pesquisa tailandês, ao observar larvas de terceiro instar desta espécie, através da microscopia óptica, descreveu o espiráculo posterior fechado (SUKONTASON *et al.*, 2004). Tal diferença na observação pode ser devido a técnica utilizada pelos grupos de pesquisa acima citados, uma vez que através da microscopia eletrônica de varredura é possível observar as estruturas com maior detalhamento e fazer afirmações mais precisas.

No outro membro da família Calliphoridae, o espiráculo posterior de *C. macellaria* é aberto e não apresenta a cicatriz espiracular, corroborando os relatos de LIU & GREENBERG (1989) e GREENBERG & SZYSKA (1984) através da microscopia óptica.

Nas outras duas espécies estudadas, a correspondência entre o número de aberturas espiraculares e o instar de desenvolvimento da larva foi observada. GUIMARÃES & AMORIM (2006) afirmaram que o número de aberturas pode auxiliar na determinação dos instares larvais. No caso do gênero *Cochliomyia* esta afirmação não pode ser aplicada completamente, pois nas larvas de primeiro e segundo instar de *C. macellaria* foram observadas duas aberturas espiraculares. A confirmação do instar ao qual a larva pertencia foi feita através verificação

do espiráculo anterior, somente encontrado em larvas a partir do segundo instar. A larva de terceiro instar e o pupário apresentaram três aberturas espiraculares. LEITE & GUEVARA (1993) estudaram imaturos de *C. hominivorax* através da microscopia eletrônica de varredura e também relataram a presença de duas aberturas espiraculares no primeiro instar.

Acredita-se que esta característica pode ser específica para o gênero *Cochliomyia*, uma vez que diversos estudos de representantes da família Calliphoridae foram realizados e não há relatos deste fato ocorrendo em outros gêneros estudados (QUEIROZ *et al.*, 1997; SUKONTASON *et al.*, 2003b; THYSSEN, 2005; CARVALHO, 2006; FLOREZ & WOLFF, 2009; MENDONÇA *et al.*, 2010, 2012a,b; 2014b).

O peritrema de *C. hominivorax* apresenta grupos de espinhos em forma de placas com a ponta afilada envolvendo-o (LEITE & GUEVARA, 1993). Estes espinhos não foram observados em *C. macellaria*, onde apenas os músculos de abertura da fenda estão presentes.

Nos pupários de *L. cuprina* foram observados tubérculos respiratórios na região próxima ao primeiro segmento abdominal. Estas estruturas foram relatadas também por SUKONTASON *et al.* (2006). GREENBERG & KUNICH (2002) explicam que estes tubérculos respiratórios estão presentes na pupa encerrada dentro do pupário e são projetados para fora através de um aumento de pressão da hemolinfa. De acordo com estes autores, o rompimento ocorre em uma região recoberta por membrana e pode ocorrer aproximadamente 24 horas depois da formação da pupa.

Entretanto, em algumas espécies, as membranas que permitem a saída dos tubérculos respiratórios não existem e assim, os mesmos se mantêm dentro o pupário, como é o caso de *C. macellaria*. Em sarcófagídeos, os tubérculos são pouco esclerotizados e não possuem força suficiente para romper as membranas e sair do pupário (LIU & GREENBERG, 1989; GREENBERG, 1991; GREENBERG & KUNICH, 2002).

O tegumento da maioria das espécies de dípteros muscoides é liso, com a presença de pequenos pelos microscópicos ou cerdas que revestem parte ou totalmente o tegumento (TESKEY, 1981; GUIMARÃES & AMORIM, 2006). O tegumento de *P. (E.) collusor* não é completamente liso, apresentando dobras e protuberâncias em formato arredondado na larva de terceiro instar e no pupário. Não há relatos deste tipo de tegumento em outras espécies de sarcófagídeos. Entretanto, esta estrutura foi observada a partir do segundo instar larval de *C. albiceps* (MENDONÇA *et al.*, 2010), sugerindo que esta característica não é restrita a estes grupos.

Nos califorídeos foi observada uma pequena diferença com relação a tegumento. Em *L. cuprina*, o tegumento é liso ao longo de todo o corpo, mas o último segmento abdominal é totalmente recoberto por espinhos filiformes em todos os instares larvais. Entretanto, em *C. macellaria*, os espinhos não estão presentes. Estes espinhos foram observados em outras espécies do gênero *Lucilia*, mas não em outras espécies desta família, evidenciando que os espinhos podem ser utilizados para distinguir os representantes do gênero *Lucilia* (ERZINCLIOGLU, 1989; SUKONTASON *et al.*, 2006, 2010; THYSSEN, 2005; MENDONÇA *et al.*, 2010, 2012a,b; SZPILA *et al.*, 2013; SZPILA *et al.*, 2014).

Nos pupários de *L. cuprina*, foi observada uma linha longitudinal continua ao longo do segundo e terceiro segmentos torácicos e uma ligeira constrição no primeiro segmento abdominal. Estas estruturas também foram relatadas por SUKONTASON *et al.* (2006) ao descreverem este muscoide e foram relacionadas com o local de abertura do pupário para a emergência do adulto.

O tegumento da larva contém fileiras ou bandas de espinhos localizadas na linha que divide os segmentos. Essas fileiras podem circundar todo o corpo ou ficar restrita apenas a região ventral ou lateral do corpo (GUIMARÃES & AMORIM, 2006). O número, o formato e a

disposição dos espinhos pode ser um caráter diagnóstico para gêneros ou espécies de Muscomorpha (GREENBERG & SZYSKA, 1984; FLOREZ & WOLFF, 2009).

Na região cefálica, entre o primeiro e o segundo segmento pode ser encontrado um conjunto de espinhos que formam o colar cefálico. Segundo alguns autores, essa região fornece caracteres diagnósticos em dípteros muscoides (SUKONTASON *et al.*, 2010; SHINONAGA & KANO, 1974).

Em *P. (E.) collusor*, estes espinhos são afilados em todos os estágios, entretanto nas larvas de terceiro instar, eles se tornam ligeiramente achatados. SZPILA *et al.* (2014) descreveram os espinhos do colar cefálico de *Wohlfahrtia magnifica* (Schiner, 1862) como largos, cônicos, alongados e ligeiramente curvados, diminuindo de tamanho a medida em que se encontram mais próximos da região posterior do corpo. SUKONTASON *et al.* (2003a) consideraram o colar cefálico como parte dos espinhos intersegmentais e não descreveram esta estrutura especificamente.

O colar cefálico das larvas de primeiro instar de *L. cuprina* apresenta disposição semelhante ao descrito por SZPILA *et al.* (2014) para *W. magnifica*. Na porção próxima a região cefálica, os espinhos são achatados com as extremidades afiladas, enquanto na região próxima ao segmento torácico, os espinhos são filiformes. Esta diferença só é observada na larva de primeiro instar. SZPILA *et al.* (2013), relataram esse arranjo em todas as seis espécies do gênero *Lucilia* descritas por eles. Acredita-se que seja uma característica comum a todos os representantes desse gênero.

Entretanto, não é exclusiva deste gênero, pois MENDONÇA *et al.* (2010) descreveram esta mesma disposição dos espinhos do colar cefálico de *C. albiceps*. Além disso, as larvas de primeiro instar de *C. macellaria* também apresentaram espinhos mais robustos próximos a região cefálica e espinhos mais afilados próximos a região torácica.

FLOREZ & WOLF (2009) descreveram, através da microscopia óptica, os espinhos de *C. macellaria* como fortemente pigmentados com uma ou duas pontas. LEITE & GUEVARA (1993) descreveram imaturos de *C. hominivorax* e não relataram a diferença de formato nos espinhos do colar cefálico, como observado em *C. macellaria*.

ASPOAS (1991) ressaltou a importância dos espinhos intersegmentais para diferenciar imaturos de sarcófagídeos. Em *P. (E.) collusor*, o formato dos espinhos variou durante o desenvolvimento da larva, passou de filiformes em larvas de primeiro instar a robustos e achatados, nas larvas de terceiro instar e pupários. SINGH *et al.* (2012) também observaram mudanças no formato destas estruturas em *P. ruficornis*. Os espinhos encontrados nas larvas de primeiro instar eram triangulares com a ponta afilada; no segundo instar, os espinhos eram mais afilados, enquanto no instar seguinte, os mesmos eram bem menores. Entretanto, esta mudança não pode ser considerada um padrão dentro dos membros desta família, pois SUKONTASON *et al.* (2003a) e SZPILA *et al.* (2014) não relataram esta alteração no padrão de espinhos de *P. dux* e *W. magnifica*, respectivamente.

Os espinhos intersegmentais de *L. cuprina* são muito semelhantes nas larvas de primeiro e segundo instar, mas ligeiramente diferente das larvas de terceiro instar e pupários. Nas larvas mais jovens os espinhos são mais estreitos e nos instares mais superiores, estes são mais achatados, semelhantes a placas. SZPILA *et al.* (2013) descreveram imaturos de seis espécies do gênero *Lucilia* na Europa, com enfoque nas larvas de primeiro instar. Estes autores não descreveram o formato dos espinhos e utilizaram apenas a disposição dos mesmos como maneira de diferenciar os imaturos. Ainda segundo estes autores, baseado na disposição dos espinhos do segmento A7 do abdômen é possível diferenciar *L. cuprina* de *L. sericata*, que são espécies que compreendem questões taxonômicas importantes na Europa. No entanto, no Brasil, *L. sericata* é restrita ao sul do país e a taxonomia do adulto é bem estabelecida.

Nas larvas de *L. cuprina* coletadas no Brasil, a banda de espinhos intersegmentais A7 é incompleta, como observado por SZPILA *et al.* (2013). Entretanto, não existem estudos comparando as três espécies de importância forense (*L. cuprina*, *L. sericata* e *L. eximia*) no Brasil, assim, permanecendo a dúvida com relação a esta estrutura. Além disso, há possibilidade de outras composições nos espinhos intersegmentais, uma vez que a existência de espécies crípticas neste gênero é plausível (WALLMAN *et al.* 2005).

Em *C. macellaria*, os espinhos intersegmentais são achatados e com a ponta afilada em larvas de primeiro instar; nas larvas de segundo e terceiro instar e no pupário, os espinhos apresentam a ponta mais robusta. Essa alteração no padrão dos espinhos intersegmentais já foi observada também em outras espécies, inclusive em *P. (E.) collusor*. Entretanto, nos segmentos abdominais desse califórideo é possível observar uma segunda banda de espinhos menores e mais robustos do que aqueles encontrados entre os segmentos. FLOREZ & WOLF (2009) também relataram essa segunda banda de espinhos, mas não a caracterizaram. GREENBERG & SZYSKA (1984) descreveram estes espinhos como largos, fortes e com pontas bifurcadas, muito semelhantes ao observado em *C. macellaria* coletada no Brasil. SZPILA *et al.* (2014) observaram estas estruturas em *C. hominivorax*, mas também não descreveram o formato dos espinhos da banda abdominal.

A caracterização dos imaturos de muscoides fornece subsídios para auxiliar pesquisadores e profissionais da área criminal nas investigações. Entretanto, convém ressaltar que o número de espécies descritas na literatura é pequeno, assim como, a elaboração de chaves dicotômicas que não correspondem a totalidade dos insetos de importância médica-veterinária e forense no Brasil. Desta forma, é recomendável que a identificação taxonômica se dê através da combinação de caracteres e não somente elegendo um caráter diagnóstico.

5. Conclusões

A- O tamanho das células do exocórrion, próximo a extremidade posterior do ovo, permite diferenciar as espécies do gênero *Cochliomyia* encontradas no Brasil.

B- A combinação do formato da área mediana próximo a região posterior (afilada) com a presença de orifícios nas ilhas dentro da área mediana permitem distinguir *Cochliomyia macellaria* de outra espécie de Calliphoridae muito semelhante, como por exemplo, *Chrysomya megacephala*.

C- As papilas que formam o palpo maxilar localizadas em uma cavidade pode ser restrito a larvas do subgênero *Euboettcheria*, uma vez que não há relatos desta disposição em outras espécies.

D- O número de aberturas do espiráculo anterior variando de 11-12 aberturas em *Cochliomyia macellaria* pode ser utilizado para distinguir as espécies do gênero *Cochliomyia* no Brasil.

E- A combinação de espinhos achatados e filiformes nas larvas de primeiro instar de *Lucilia cuprina* e *Cochliomyia macellaria* é uma característica que pode ser utilizada para diferenciar indivíduos da família Calliphoridae

F- A disposição dos espiráculos anteriores em fileiras irregulares é restrita a família Sarcophagidae e pode ser considerada um caráter diagnóstico para esta família.

G- A ausência de pelos ou de espinhos localizados lateralmente às aberturas do espiráculo posterior pode ser específica para *Peckia (E.) collusor* ou, provavelmente, restrito ao subgênero *Euboettcheria*.

H- Duas aberturas espiraculares no espiráculo posterior da larva de primeiro instar é uma característica específica para o gênero *Cochliomyia*.

I- A ausência de espinhos no espiráculo posterior de *C. macellaria* é um caráter diagnóstico para imaturos deste gênero.

J- A diferença no formato dos espinhos do colar cefálico de *C. macellaria* também pode ser mais uma característica específica para esta espécie, pois os espinhos de *C. hominivorax* apresentam um formato padrão.

K- Os espinhos filiformes encontrados recobrimdo o último segmento larval em *Lucilia cuprina* podem ser considerados característicos deste gênero, uma vez que foram encontrados em várias espécies deste grupo e não foram relatados em outros gêneros.

6. Referências Bibliográficas

- ALBUQUERQUE, D. O.; PAMPLONA, D.; CARVALHO, C. B. J. Contribuição ao conhecimento dos *Fannia* R. D., 1830 da região neotropical (Diptera, Fanniidae). *Arquivos do Museu Nacional do Rio de Janeiro*, v. 56, p.9-34, 1981.
- ANDERSON, G. S. Wildlife forensic entomology: determining time of death in two illegally killed black bear cubs. *Journal of Forensic Science*, v. 44, p. 856-859, 1999.
- ANZIANI, O. S.; FLORES, S. G.; MOLTEDO, H.; DEROZIER, C.; GUGLIELMONE, A. A.; ZIMMERMANN, G. A.; WANKER, O. Persistent activity of doramectin and ivermectin in the prevention of cutaneous myiasis in cattle experimentally infested with *Cochliomyia hominivorax*. *Veterinary Parasitology*, v. 87, p. 243-247, 2000.
- ASPOAS, B. R. Comparative micromorphology of third instar larvae and the breeding biology of some Afrotropical *Sarcophaga* (Diptera: Sarcophagidae). *Medical and Veterinary Entomology*, v. 5, p. 437-445, 1991.
- BARBOSA, R. R.; MELLO-PATIU, C. A.; MELLO, R. P.; QUEIROZ, M. M. C. New records of calyptate dipterans (Fanniidae, Muscidae and Sarcophagidae) associated with the decomposition of domestic pigs in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.104, p. 923-926, 2009.
- BARBOSA, R. R.; MELLO-PATIU, C. A.; URURAHY-RODRIGUES, A.; BARBOSA, C. G.; QUEIROZ, M. M. C. Temporal distribution of ten calyptate dipteran species of medicolegal importance in Rio de Janeiro, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 105, p. 191-198, 2010.
- BARROS, R. M.; MELLO-PATIU, C. A.; PUJOL-LUZ, J. R. Sarcophagidae (Insecta, Diptera) associados à decomposição de carcaças de *Sus scrofa* Linnaeus (Suidae) em área de cerrado do Distrito Federal, Brasil. *Revista Brasileira de Entomologia*, v. 52, p. 606-609, 2008.
- BENECKE M. Six forensic entomology cases: description and commentary. *Journal of Forensic Science*, v. 43, p. 797-805, 1998; Erratum: *Journal of Forensic Science*, v. 46, p.1303.
- BENECKE, M.; JOSEPHI, E.; ZWEIHOFF, R. Neglect of Elderly: Forensic Entomology Cases and Considerations. *Forensic Science International*, v. 165, p. 195-199, 2004.
- BENECKE, M.; LESSIG, R. Child neglect and forensic entomology. *Forensic Science International*, v. 120, p. 155–159, 2001.
- BUENAVENTURA, E. Morphology of the first and second instars larvae of *Peckia* (*Peckia*) *chrysostoma* (Wiedemann, 1830) (Diptera: Sarcophagidae). *Acta Zoologica Mexicana*, v. 29, p. 96-104, 2013.
- CARVALHO, C. J. B.; MELLO-PATIU, C. A. Key to the adults of the most common forensic species of Diptera in South America. *Revista Brasileira de Entomologia*, v. 52, p. 390-406, 2008.

- CARVALHO, C. J. B.; MOURA, M. O.; RIBEIRO, P. B. Chave para adultos de dípteros (Muscidae, Fanniidae, Anthomyiidae) associados ao ambiente humano no Brasil. *Revista Brasileira de Entomologia*, v. 46, n. 2, p. 107-114, 2002.
- CARVALHO, C. J. B. Muscidae (Diptera) of the Neotropical Region: Taxonomy. UFPR, Curitiba. 2002.
- CARVALHO, L. M. L.; LINHARES, A. X. Seasonality of insect successions and pig carcass decomposition on a natural forest area in southeastern Brazil. *Journal of Forensic Science*, v. 46, p. 604-608, 2001.
- CARVALHO, L. M. L.; THYSEN, P. J.; LINHARES, A. X.; PALHARES, F. A. B. A Checklist of Arthropods Associated with Pig Carrion and Human Corpses in Southeastern Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 95, p. 135-138, 2000.
- CARVALHO, L. M. L.; LINHARES, A. X.; TRIGO, J. R. Determination of Drugs Levels and the Effect of Diazepam on the Growth of Necrophagous Flies of Forensic Importance in Southeastern Brazil. *Forensic Science International*, v. 120, p. 140-144, 2001.
- CARVALHO, L. S. *Redescrição das larvas de terceiro instar de cinco espécies de dípteros califórídeos (Insecta: Diptera) de importância para a Entomologia Forense*. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Universidade de Brasília, 67p., 2006.
- CATTS, E. P.; GOFF, M. L. Forensic entomology in criminal investigations. *Annual Review of Entomology*, v. 37, p. 253-272, 1992.
- CHAPMAN, R. F. *The Insects: Structure and function*. UK. Cambridge Uni Press. 1998.
- CHU-WANG, I. W.; AXTELL, R. C. Fine structure of the dorsal organ of the house fly larva, *Musca domestica*. *L Z Zellforsch*, v. 117, p. 17-34, 1971.
- CHU-WANG, I. W.; AXTELL, R. C. Fine structure of the ventral organ of the house fly larva, *Musca domestica*. *L Z Zellforsch*, v. 130, p. 489-495, 1972.
- COURI, M. S.; ARAÚJO, P. F. Contribuição ao conhecimento das fases imaturas de *Ophyra aenescens* (Wiedemann, 1830) e *Ophyra chalcogaster* (Wiedemann, 1824) (Diptera-Muscidae). *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 7, p.525-529, 1991.
- EARLY, M.; GOFF, M. L. Arthropod succession patters in exposed carrion on the Island of O'Ahw, Hawaiian Island, USA. *Journal of Medical Entomology*, v. 23, p. 520-531, 1986.
- ERZINCLIOGLU, Y. Z. Immature stages of British *Calliphora* and *Cynomya*, with a re-evaluation of the taxonomic characters of larval Calliphoridae (Diptera). *Journal of Natural History*, v. 19, p.69-96, 1985.
- ERZINCLIOGLU, Y. Z. The value of chorionic structure and size in the diagnosis of blowfly eggs. *Medical and Veterinary Entomology*, v. 3, p. 281-285, 1989.
- FERREIRA, M. J. M.; LACERDA, P. V. Muscoides Sinantrópicos Associados ao Lixo Urbano de Goiânia – GO. *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 10, p. 185-195, 1993.
- FLOREZ, E.; WOLFF, M. Descripción y Clave de los Estadios Inmaduros de las Principales Especies de Calliphoridae (Diptera) de Importancia Forense en Colombia. *Neotropical Entomology*, v. 38, p. 418-429, 2009.

- FURLANETTO, S. M. P.; CAMPOS, M. L. C.; HARSI, C. M.; BURALLI, G. M.; ISHIHATA, G. K. Microrganismos enteropatogênicos em moscas africanas pertencentes ao gênero *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) no Brasil. *Revista Microbiology*, v. 15, p. 170-174, 1984.
- GREENBERG, B. Flies as forensic indicators. *Journal of Medical Entomology*, v. 28, p. 565-577. 1991.
- GREENBERG, B.; KUNICH, J. C. Entomology and the law: Flies as forensic indicators. Inglaterra: Cambridge University Press; 2002.
- GREENBERG, B.; SINGH, D. Species identification of calliphorid (Diptera) eggs. *Journal of Medical Entomology*, v. 32, p. 21-26, 1995.
- GREENBERG, B.; SZYSKA, M. L. Immature stages and biology of fifteen species of Peruvian Calliphoridae (Diptera). *Annals of the Entomological Society of America*, v. 77, p. 488-517, 1984.
- GRIMALDI, D.; ENGEL, M. S. *Evolution of the Insects*. New York/Cambridge: Cambridge University Press, 2005, 755p.
- GUIMARÃES, J. H.; AMORIM, D. S. *Diptera*. In: COSTA, C.; IDE, S.; SIMONKA, C. E.; orgs. Insetos imaturos: metamorfose e identificação. São Paulo: Holos 2006.
- GUIMARÃES, J. H.; PAPAVERO, N. *Myiasis in Man and Animals in the Neotropical Region*. NY. Ed. Plêiade. 1999.
- HAYAT, M. A. *Principles and Techniques of Electron Microscopy. Biological Applications*. Van Nostrand Reinhold Company, New York. 1970.
- HINTON, H. E. A fly larva that tolerates dehydration and temperatures of -270°C to +102°C. *Nature*, v. 188, p. 336-337, 1960.
- ISHIJIMA, H. Revision of the third stage larvae of synanthropic flies of Japan (Diptera: Anthomyiidae, Muscidae, Calliphoridae and Sarcophagidae). *Japanese Journal of Sanitary Zoology*, v. 18, p. 47-100, 1967.
- KEH, B. Scope and applications of Forensic Entomology. *Annual Review of Entomology*, v. 30, p. 137-154, 1985.
- LAKES-HARLAN, R.; BAILLEY, W. J.; SCHIKORSKI, T. The auditory system of an atympanate buchcricket *Phasmodes ranatriliformes* (Westwood) (Tettigoniidae, Orthoptera). *Journal of Experimental Biology*, v.158, p. 307-324, 1991.
- LEITE, A. C. R.; GUEVARA, J. D. E. Scanning electron microscopy of the larval instars of *Cochliomyia hominivorax*. *Medical and Veterinary Entomology*, v. 7, p. 263-270, 1993.
- LEITE, A.C.R.; LOPES, H.S. Scanning electron microscopy of the first instar larvae of *Sarcodexia lambens* and *Peckia chrysostoma* (Diptera: Sarcophagidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 84, p. 303-307, 1989.
- LINHARES, A. X. Sinanthropy of calliphoridae and Sarcophagidae (Diptera) in the city of Campinas, São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira de Entomologia*, v. 25; p. 189-215, 1981.
- LIU, D.; GREENBERG, B. Immature stages of some flies of forensic importance. *Annals Entomological Society of America*, v. 82, p. 80-93, 1989.

- LOPES, H. S.; LEITE, A. C. R. Third contribution to the knowledge of the Raviniini (Diptera: Sarcophagidae), based on observations of the larvae, using scanning electron microscopy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 82, p. 407-413, 1987.
- MALDONADO, M. A.; CENTENO, N. Quantifying the potential pathogens transmission of the blowflies (Diptera: Calliphoridae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 98, p. 213-216, 2003.
- MARGARITIS, L. H. *Structure and Physiology of Eggshell*. In: KERKUT, G. A.; GILBERT, L. I. org. *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. v. I. Embryogenesis and Reproduction. Pergamon Press, Oxford, UK. 1985.
- MAZUR, G. D.; REGIER, J. C., MAFATOS, C. F. Morphogenesis of silkmoth chorion sequential modification of an early helicoidal framework through expansion and densification. *Tissue Cell*, v. 21, p. 227-242, 1989.
- MCALPINE, J. F.; PETERSON, B. V.; SHEWELL, G. E.; TESKEY, J. H.; VOCKEROTH, J. R.; WOOD, D. N. *Manual of Nearctic Diptera*, Ottawa, 1981.
- MELLO, R. P. Chave para identificação das formas adultas das espécies da família Calliphoridae (Diptera, Brachycera, Cyclorhapha) Encontradas no Brasil. *Entomologia y Vectores*, v. 10, p. 255-268, 2003.
- MENDONÇA, P. M.; SANTOS-MALLET, J. R.; MELLO, R. P.; GOMES, L.; QUEIROZ, M. M. C. Identification of fly eggs using scanning electron microscopy for forensic investigations. *Micron* v. 39, p. 802-807, 2008.
- MENDONÇA, P. M.; SANTOS-MALLET, J. R.; QUEIROZ, M. M. C. Ultramorphological characteristics of immature stages of *Chrysomya albiceps* (Wiedemann 1819) (Diptera: Calliphoridae), a fly specie of forensic importance. *Microscopy Research and Technique*, v. 73, p. 779-784, 2010.
- MENDONÇA, P. M.; SANTOS-MALLET, J. R.; QUEIROZ, M. M. C. Ultrastructure of immature stages of the blowfly *Chrysomya putoria* (Wiedemann, 1818) (Diptera: Calliphoridae). *Microscopy Research and Technique*, v. 75, p. 206-211, 2012a.
- MENDONÇA, P. M.; SANTOS-MALLET, J. R.; QUEIROZ, M. M. C. Ultrastructure of larvae and puparia of the blowfly *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae). *Microscopy Research and Technique*, v. 75, p. 935-939, 2012b.
- MENDONÇA, P. M.; BARBOSA, R. R.; CORTINHAS, L. B.; SANTOS-MALLET, J. R.; QUEIROZ, M. M. C. Ultrastructure of immature stages of *Peckia* (Euboettcheria) *collusor* (Diptera: Sarcophagidae). *Acta Tropica*, v. 128, p. 522-527, 2013.
- MENDONÇA, P. M.; BARBOSA, R. R.; CARRIÇO, C.; CORTINHAS, L. B.; SANTOS-MALLET, J. R.; QUEIROZ, M. M. C. Ultrastructure of immature stages of *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae) using scanning electron microscopy. *Acta Tropica*, v. 136, p. 123-128, 2014a.
- MENDONÇA, P. M.; BARBOSA, R. R.; CORTINHAS, L. B.; SANTOS-MALLET, J. R.; QUEIROZ, M. M. C. Ultrastructure of immature stages of *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae), a fly of medical and veterinary importance. *Parasitology Research*, doi: 10.1007/s00436-014-4032-4, 2014b.
- NORRIS, K. R. The Bionomics of Blowflies. *Annual Reviews of Entomology*, v. 10, p. 47-68, 1965.

NUORTEVA, P. *Sarcosaprophagous insects as forensic indicators*. In: TEDESHI, C. G.; ECKERT, W. G.; TEDESHI, L. G. org. *Forensic medicine: a study in trauma and environmental hazards*. v. II. London, 1977.

OLIVA, A. Insects of forensic significance in Argentina. *Forensic Science International*, v. 120, p.145-154, 2001.

OLIVEIRA, V. C.; MELLO, R. P.; D'ALMEIDA, J. M. Dípteros Muscoides como Vetores Mecânicos de Ovos de Helminthos em Jardim Zoológico, Brasil. *Revista de Saúde Pública*, v. 36, p. 614-620, 2002.

ORTLOFF, A.; PEÑA, P.; RIQUELME, M. Preliminary study of the succession pattern of necrobiont insects, colonising species and larvae on pig carcasses in Temuco (Chile) for forensic applications. *Forensic Science International*, v. 222, p.e36-41, 2012.

PAPE, T. Catalogue of the Sarcophagidae of the World (Insecta: Diptera). *Memoirs of Entomology International*, v. 8, p. 1-558, 1996.

PEREZ-MORENO, S.; MARCOS-GARCIA, M. A.; ROJO, S. Comparative morphology of early stages of two Mediterranean *Sarcophaga* Meigen, 1826 (Diptera; Sarcophagidae) and a review of the feeding habits of Palaearctic species. *Micron*, v. 37, p.169-179, 2006.

PETERSON, R. D.; NEWMAN JUNIOR, S. M. Chorionic structure of the egg of the screwworm *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae). *Journal of Medical Entomology*, v. 28, p. 152-160, 1991.

QUEIROZ, M. M. C.; MELLO, R. P.; LIMA, M. M. Morphological aspects of the larval instars of *Chrysomya albiceps* (Diptera: Calliphoridae) reared in the laboratory. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 92, p. 187-196, 1997.

QUEIROZ, M. M. C.; NORBERG, N. A.; MAURE, E. A. P.; TOLEDO, R. F.; GAZÊTA, G. S.; DUTRA, A. E. A.; RODRIGUES-GUIMARÃES, R. Veiculação de bactérias patogênicas por moscas sinantrópicas coletadas em restaurantes, hospitais e feiras da Baixada Fluminense, Rio de Janeiro, Brasil. [Apresentação no XIV Congresso Latinoamericano de Parasitologia; 1999. Acapulco, Guerrero; México].

REY, L. Bases da Parasitologia Médica. 3ª Edição, Guanabara-Koogan, 2010, 420p.

SALVIANO, R. J. B.; MELLO, R. P.; BECK, L. C. N. H., FERREIRA, A. Calliphoridae (Diptera) associated with human corpses in Rio de Janeiro, RJ, Brazil. *Entomologia y Vectores*, v. 3, p. 145-146, 1996.

SANDEMAN, R. M.; COLLINGS, B. J. CARNEGIE, P. R. A Scanning electron microscope study of *L. curpina* larvae and the development of blowfly strike in sheep. *International Journal for Parasitology*, v. 17, p. 758 – 765, 1987.

SHINONAGA, S.; KANO, B. Studies on the flies occurring from the excrement of pasturing cattle and other herbivorous animals. III. On the 3rd stage larvae of the genus *Morellia* R-D from Japan (Diptera: Muscidae). *Japanese Journal of Sanitary Zoology*, v. 25, p. 211-215, 1974.

SINGH, D.; GARG, R.; WADHAWAN, B. Ultramorphological characteristics of immature stages of a forensically important fly *Parasarcophaga ruficornis* (Fabricius) (Diptera: Sarcophagidae). *Parasitology Research*, v. 110, p. 821-831, 2012.

SMITH, K. G. V. *A Manual of Forensic Entomology*. British Museum (Natural History). London. Ed. Cornell University. 1986.

- STEVENS, J.; WALL, R. Species, sub-species and hybrid populations of the blowflies *Lucilia cuprina* and *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). *Proceedings of the Royal Society of London B*. v. 263, p. 1335-1341, 1996.
- SUKONTASON, K.; SUKONTASON, K. L.; PIANGJAI, S.; CHAIWONG, T.; BOONCHU, N.; KURAHASHI, H.; VOGTSBERGER, R. C. Larval ultrastructure of *Parasarcophaga dux* (Thomson) (Diptera: Sarcophagidae). *Micron*, v. 34, p. 359-364, 2003a.
- SUKONTASON, K.; SUKONTASON, K. L.; PIANGJAI, S.; CHAIWONG, T.; BOONCHU, N.; KURAHASHI, H. Hairy maggot of *Chrysomya villeneuvei* (Diptera: Calliphoridae), a fly species of forensic importance. *Journal of Medical Entomology*, v. 40, p. 983-984, 2003b.
- SUKONTASON, K.; SUKONTASON, K. L.; BOONCHU, N.; CHAIWONG, T.; PIANGJAI, S. Ultrastructure of eggshell of *Chrysomya nigripes* Aubertin (Diptera: Calliphoridae). *Parasitology Research*, v. 93, p.151-154, 2004.
- SUKONTASON, K.; SRIBANDITMONGKOL, P.; NGOEN-KLAN, R.; KLONG-KLAEW, T.; MOOPHAYAK, K.; SUKONTASON, K.L. Differentiation between *Lucilia cuprina* and *Hemipyrellia ligurriens* (Diptera: Calliphoridae) larvae for use in forensic entomology applications. *Parasitology Research*, v. 106, p. 641-646, 2010.
- SUKONTASON, K. L.; BUNCHU, N.; CHAIWONG, T.; KUNTALUE, B.; SUKONTASON, K. Fine structure of the eggshell of the blow fly, *Lucilia cuprina*. *Journal of Insect Science*, v. 7, 1- 9, 2007.
- SUKONTASON, K. L.; PIANGJAI, S.; BUNCHU, N.; CHAIWONG, T.; SRIPAKDEE, D.; BOONSRIWONG, W; VOGTSBERGER, R. C.; SUKONTASON, K. Surface ultrastructure of the puparia of the blow fly, *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae), and flesh fly, *Liosarcophaga dux* (Diptera: Sarcophagidae). *Parasitology Research*, v. 98, p. 482-487, 2006.
- SZPILA, K.; HALL, M. J. R.; PAPE, T.; GRZYWACZ, A., Morphology and Identification of first instars of the European and Mediterranean blowflies of forensic importance. Part II. Luciliinae. *Medical and Veterinary Entomology*, v. 27, p. 349-366, 2013.
- SZPILA, K.; HALL, M. J. R.; WARDHANA, A. H.; PAPE, T. Morphology of the first instar larva of obligatory traumatic myiasis agents (Diptera: Calliphoridae, Sarcophagidae). *Parasitology Research*, v. 113, p.1629-1640, 2014.
- TESKEY, H. J. *Morphology and Terminology - larvae*. In MCALPINE, J. F.; PETERSON, B. V.; SHEWELL, G. E.; TESKEY, J. H.; VOCKEROTH, J. R.; WOOD, D. M. (eds.), *Manual of Nearctic Diptera*, vol. 1. Agriculture Canada Monograph 27. Research Branch, Supply & Services Canada. 1981.
- THYSSEN, P. J. Caracterização de formas imaturas e determinação das exigências térmicas de duas espécies de califorídeos (Diptera) de importância forense. Tese de Doutorado (Parasitologia). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP. 2005.
- THYSSEN, P. J.; LINHARES, A. X. First description of the immature stages of *Hemilucilia segmentaria* (Diptera: Calliphoridae). *Biological Research*, v. 40, p. 271-80, 2007.
- VAIRO, K. P. Sarcophagidae (Diptera) de potencial interesse forense de Curitiba, Paraná: chave pictórica para as espécies e morfologia dos estágios imaturos de *Sarcodexia lambens* (Wiedemann). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná. 2011.

WALLMAN, J. F.; LEYS, R.; HOGENDOORN, K. Molecular systematics of Australian carrion-breeding blowflies (Diptera: Calliphoridae) based on mitochondrial DNA. *Invertebrate Systematics*, v. 19, p. 1–15, 2005.

CAPÍTULO II

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE DíPTEROS DA FAMÍLIA CALLIPHORIDAE DE IMPORTÂNCIA MÉDICA-VETERINÁRIA E FORENSE

RESUMO

A identificação da espécie a ser estudada é um passo primordial em qualquer tipo de pesquisa. A ordem Diptera é uma das ordens consideradas mega diversas, onde a maior parte da identificação dos espécimes é realizada através dos adultos. Em alguns casos, baseados em caracteres de difícil visualização, como a genitália, por exemplo, ou subjetivos, como coloração e tamanho. A utilização de caracteres moleculares como auxílio à taxonomia é comum em grupos onde a caracterização morfológica praticamente não pode ser aplicada, assim, alguns autores propuseram a determinação de um segmento gênico que atuasse como código de barras de identificação de todos os seres vivos. Este trabalho teve como objetivo principal elaborar um banco de dados contendo sequências gênicas de espécies de importância médica-veterinária e forense da família Calliphoridae através da região do *barcode*. Foram analisadas nove espécies de dípteros muscoides coletadas em quatro regiões do país, em um total de 346 espécimes utilizados. O sequenciamento das amostras foi bem sucedido com os iniciadores propostos na literatura, entretanto, um novo par de iniciadores mais adequados às espécies nativas da Região Neotropical foi proposto. As sequências obtidas apresentam boa qualidade e serão depositadas em um banco de dados de acesso livre, como representantes da fauna brasileira. Além disso, dois outros segmentos gênicos (fator de alongação 1 alfa e white) também foram sequenciados pela primeira vez para algumas espécies. A proposta de *barcode* foi bem sucedida em algumas espécies, como *Hemilucilia segmentaria*, *Hemilucilia semidiaphana*, *Chloroprocta idioidea*, *Cochliomyia macellaria*, *Chrysomya megacephala* e *Chrysomya albiceps*, onde a variação intraespecífica foi menor do que 3%. Em *Lucilia eximia*, com as análises da região *barcode*, houve a formação de dois grupos, com variação de 4,6% entre eles. Entretanto, as análises dos genes nucleares não repetiram esse padrão de grupos, reforçando que o valor de 3% de divergência não pode ser utilizado com padrão para estes dípteros. Na espécie *Chrysomya putoria*, a análise da região *barcode* mostrou a formação de três grupos, onde a variação intraespecífica foi maior do que a interespecífica, exemplificando um caso onde o *barcoding gap* não foi observado. Nas análises dos segmentos nucleares, a formação dos três grupos se repetiu, levando a necessidade de maiores estudos sobre a possibilidade de outro grupo taxonômico presente nestas amostras. Ao realizar uma análise conjunta das espécies do gênero *Chrysomya* introduzidas no Brasil com os três marcadores, observou-se que apenas *C. megacephala* formava um clado separado e monofilético. A espécie *C. putoria* é polifilética, pois parte das amostras formavam dois clados separados e parte formava um agrupamento único com *C. albiceps* e *C. rufifacies*. Assim, é necessária a análise de outros segmentos gênicos, bem como aumentar o número de amostras destas espécies introduzidas no Brasil para tentar esclarecer esta questão taxonômica.

Palavras-chave: citocromo oxidase I; fator de alongação; *white*; *barcode*

ABSTRACT

The correct identification of the species to be studied is an important step in all research. Diptera is considered to be a mega diverse order and most of the taxonomic identifications are done using adults. In some cases, the identification is done using characters difficult to be visualized, such as genitalia, or subjective features, such as color and size. The molecular characterization as an aid for taxonomy is common in groups where morphological characterization is difficult to achieve. Therefore, some authors proposed the determination of a genetic fragment to be used as a *barcode* identification for all living beings. The main aim of this research was to provide a database of genetic sequences from medical, veterinary and forensically important Calliphoridae flies using *barcode*. Nine fly species were collected in four regions of Brazil, corresponding to 346 samples. The samples were successfully sequenced with primers proposed in the literature; a new pair of primers, however, more appropriated to Neotropical Region native species, was proposed. The obtained sequences presented good quality and they will be deposited in a free access database, as representatives of the Brazilian fauna. Additionally, two other gene fragments (elongation factor 1 alpha and white) were sequenced for the first time for some species. The *barcode* proposal was successfully achieved for some species: *Hemilucilia segmentaria*, *Hemilucilia semidiaphana*, *Chloroprocta idioidea*, *Cochliomyia macellaria*, *Chrysomya megacephala* and *Chrysomya albiceps*, for which the intraspecific variation was less than 3%. For *Lucilia eximia*, *barcoding* analysis showed two groups, with intraspecific variation of 4.6%. However, nuclear genes did not repeat this grouping, reinforcing that the threshold of 3% divergence could not be used as pattern for all dipterans. *Barcoding* analysis of *Chrysomya putoria*, formed three groups and the intraspecific variation was greater than the interspecific variation, a case where the *barcoding gap* could not be seen. Using nuclear genes, these three groups were formed again, leading to the necessity of further studies about the possible presence of another taxonomic group among the samples. The conjunct analysis of the *Chrysomya* species introduced in Brazil using molecular and mitochondrial genes, demonstrated that only *C. megacephala* formed a separate and monophyletic clade. *Chrysomya putoria* is polyphyletic species, since part of the samples formed two different clades and another part grouped together with *C. albiceps* and *C. rufifacies*. Therefore, others gene fragments should be studied and more samples of introduced *Chrysomya* should be analyzed to explain this taxonomic problem.

Key Words: cytochrome oxidase I; elongation factor; *white*; *barcode*

1. INTRODUÇÃO

A diversidade e a riqueza dos insetos no planeta já foram discutidas por diversos autores, que relatam a quantidade de um milhão de espécies já descritas, o que seria uma pequena parte do que ainda há sem descrição (GRIMALDI & ENGEL, 2005; RAFAEL *et al.*, 2009). Estes autores relatam ainda um problema crescente, já observado há muitos anos, o da dificuldade em descrever novas espécies, seja pela quantidade enorme de trabalho, ou ainda pelo tempo necessário à formação de taxonomistas experientes.

Além da grande diversidade, um problema recorrente é a ausência de caracteres morfológicos diagnósticos para algumas espécies ou ainda, descrições baseadas em informações subjetivas como, por exemplo, coloração e tamanho do inseto. Este problema é muito comum em espécies crípticas, que são encontradas em vários grupos de insetos, o que dificulta ainda mais o conhecimento da fauna.

Dentro da ordem Diptera, estes problemas também são encontrados. Por exemplo, *Chrysomya albiceps* (Widemann, 1819) e *Chrysomya rufifacies* (Macquart, 1843) (Diptera: Calliphoridae) já foram consideradas como um único grupo taxonômico (KURAHASHI, 1989) e, posteriormente, como espécies distintas (TANTAWI & GREENBERG, 1993). Essas alterações no status taxonômico se dão devido à escassez de caracteres morfológicos que as diferenciam, tanto na fase de imaturos quanto em adultos (SUKONTASON *et al.*, 2008; MENDONÇA *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2012).

As moscas adultas são conhecidas como carreadoras de patógenos, entretanto, provavelmente os imaturos apresentam maior destaque tanto na área de medicina humana e veterinária quanto na entomologia forense (GREENBERG, 1971, 1973). Neste estágio de desenvolvimento, algumas espécies são biontófagas ou necrófagas, causando prejuízos enormes à criação de animais, através da produção de miíases (GUIMARÃES & PAPAVERO, 1999). Algumas outras espécies são saprófagas ou necrófagas e podem se desenvolver em cadáveres, sendo uma importante fonte de informação para peritos e investigadores criminais na entomologia forense. Assim, o conhecimento exato da taxonomia das espécies de dípteros muscoides é muito importante para diversas áreas de pesquisa (OLIVEIRA-COSTA, 2003).

A taxonomia clássica se baseia na combinação de caracteres morfológicos com o objetivo de identificar as espécies e como forma de compreender melhor a diversidade. Entretanto, a grande parte das chaves dicotômicas de identificação dos muscoides é baseada em caracteres morfológicos dos adultos, mesmo sendo a fase de imaturos a mais coletada, seja colonizando cadáveres ou causando miíases. Desta forma, a busca por alternativas de identificação é constante e necessária.

A utilização de caracteres moleculares como auxílio à taxonomia é bastante comum em grupos onde a caracterização morfológica praticamente não pode ser aplicada, como por exemplo em vírus e bactérias (ALLANDER *et al.*, 2001; HAMELS *et al.*, 2001). Atualmente, estas técnicas têm se tornado popular na identificação de diversos grupos de seres vivos. No entanto, para que possam ser aplicadas com objetivos taxonômicos, é necessário que regiões a serem comparadas estejam pré-estabelecidas.

Os marcadores moleculares podem ser definidos como qualquer segmento específico do DNA que pode ser utilizado para distinguir entidades geneticamente diferentes (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998; SANDOVAL, 2011). Esses marcadores, quando combinados, também podem ser utilizados em estudos de evolução molecular, filogenia e estruturação populacional (AZEREDO-ESPIN & LESSINGER, 2006).

Alguns marcadores moleculares foram propostos para fornecer identificação para algumas espécies de dípteros de difícil diagnóstico, dentre os principais podemos citar: citocromo c oxidase subunidades I e II, 28S do RNA ribossomal, espaçadores transcritos internos (ITS1 e ITS2) e microssatélites (STEVENS & WALL, 2001; HEBERT *et al.*, 2003a; BEHURA, 2006; NELSON *et al.*, 2007; MEIER & ZHANG, 2009).

Considerando a variação genética existente e com o objetivo de facilitar a identificação das espécies, HEBERT *et al.* (2003a) propuseram a utilização de uma única porção do genoma como um código para identificar as espécies, e assim, surgiu a proposta do código de barras do DNA (*DNA barcode*).

O Projeto *Barcode of Life* faz parte de uma iniciativa internacional que visa o sequenciamento de região única para identificação de todos os seres eucarióticos baseado em uma abordagem molecular padronizada (HEBERT *et al.*, 2003a; MILLER, 2007). A principal vantagem desta abordagem seria a rapidez e praticidade com que os dados são fornecidos, sem a necessidade da interferência de um taxonomista especialista no grupo estudado (MEIER & ZHANG, 2009). Além do sequenciamento, esta abordagem propõe relacionar as sequências obtidas a um conjunto de dados sobre o material testemunho, como por exemplo, fotografias, informações sobre o ponto de coleta e características do local, entre outros. Desta forma, permitir a elaboração de um banco de dados integrando sequências do genoma e informações de curadoria (HAJIBABAEI *et al.*, 2007).

Segundo HEBERT *et al.* (2003a), a região *barcode* escolhida deveria ser a mesma para todos os reinos. A princípio, a região escolhida foi a citocromo oxidase I (*coI*) localizada no genoma mitocondrial, entretanto, tal região não apresenta a mesma eficiência para plantas e fungos. Nas plantas, a taxa de evolução nesse grupo é muito baixa, gerando sequências similares em famílias com relacionamento filogenético distante (CHO *et al.*, 1998, 2004). No caso dos fungos, a região que apresenta melhores resultados foi a que codifica o gene ITS (*internal transcribed spacer*) (SCHOCH *et al.*, 2012).

Para os animais, o DNA mitocondrial foi escolhido porque apresenta herança materna exclusiva, ausência de recombinação genética e grande abundância nos tecidos (BENECKE & WELLS, 2000). Recentemente, NUNES *et al.* (2013) observaram a presença de mitocôndrias de origem paterna em *Drosophila melanogaster*, entretanto, estes autores ressaltam que ainda assim este evento pode ser considerado raro. O DNA mitocondrial pode ser facilmente isolado e possui diferentes taxas de mutações, conferindo regiões bastante variadas e outras mais conservadas (LUNT *et al.*, 1996).

O DNA mitocondrial dos animais é uma molécula de dupla-fita circular que apresenta múltiplas cópias em cada mitocôndria. Possui de 15-20kb ao longo de 37 genes, sendo 13 deles que codificam subunidades de proteínas que participam do processo de fosforilação oxidativa, 22 que codificam RNA transportadores que atuam dentro das mitocôndrias e dois genes que codificam RNA ribossomais das mitocôndrias. Além de uma região não-codificante, denominada região controle que regula a replicação e a transcrição do DNA mitocondrial (WOLSTENHOLME, 1992; SHADEL & CLAYTON, 1993).

O gene mitocondrial citocromo oxidase apresenta aproximadamente 3000 pares de bases e compõe um complexo enzimático com três subunidades que fazem parte da cadeia respiratória e participam da redução do oxigênio em água. Devido ao seu papel tão específico para o metabolismo celular, este gene é bastante conservado nos aeróbios. A subunidade I (*coI*) é a maior delas e uma das maiores codificantes do genoma mitocondrial dos metazoários (LUNT *et al.*, 1996). Nesta subunidade ocorre a combinação de regiões muito conservadas e outras variáveis (LUNT *et al.*, 1996). Esta subunidade foi eleita como *barcode* por apresentar uma alta taxa de evolução molecular, com substituições de nucleotídeos na terceira posição, permitindo a diferenciação entre espécies próximas e também sinalizando a presença de grupos filogenéticos distintos dentro da mesma espécie (COX & HEBERT, 2001). No entanto, apesar da taxa de substituição de nucleotídeos ser alta, a taxa de substituição de aminoácidos é lenta quando comparadas a outros genes, o que permite também a comparação com grupos taxonômicos superiores (HEBERT *et al.*, 2003a).

A porção 5' do gene possui iniciadores universais bem estabelecidos e testados para praticamente todos os filões de animais, facilitando e padronizando os estudos (FOLMER *et al.*, 1994; HEBERT *et al.*, 2003a). A região *barcode* corresponde ao segmento entre as bases 1490 e 2198 da porção 5' da molécula tomando-se como base o genoma mitocondrial de *Drosophila yakuba* Burla, 1954 (Diptera: Drosophilidae) (FOLMER *et al.*, 1994).

Além da premissa principal da região única de identificação para todos os seres vivos, o *barcode* propõe também que a variação nucleotídica dentro do segmento *coI* nas espécies próximas seja suficiente para garantir a diferenciação entre elas. AVISE & WALKER (1999) demonstrou que a diferença na região do gene mitocondrial citocromo b entre espécies próximas de vertebrados é maior do que 2%. Baseado nesse estudo, HEBERT *et al.* (2003b) analisaram 11 filões e, especificamente algumas ordens dentro do filo Arthropoda e observaram que cerca de 98% das espécies também divergiram mais de 2%, quando comparadas par-a-par para a região da citocromo oxidase I. Além deste, outros estudos testando a eficiência do *barcode* foram realizados com diversos grupos de seres vivos, como pássaros, peixes, aranhas e borboletas (HEBERT *et al.*, 2004b; BARRETT & HEBERT, 2005; WARD *et al.*, 2005; HAJIBABAEI *et al.*, 2006).

Desta forma, o *barcode* preconiza que a variação genética dentro da espécie estudada não deve ser maior do que a variação entre esta e as espécies próximas. Essa premissa é conhecida como *barcoding gap*, mas não é um consenso entre os pesquisadores. Em algumas situações, pode ocorrer a sobreposição da variação intraespecífica e interespecífica (MEYER & PAULAY, 2005), o que pode demonstrar um evento recente de especiação ou ainda presença de grupos polifiléticos. No entanto, segundo HEBERT *et al.* (2003b), a baixa diversidade entre espécies próximas pode ser um reflexo da introgressão mitocondrial ou ainda resultado do processo de hibridização na natureza, sendo necessária a análise de um gene de evolução mais lenta, de origem nuclear, por exemplo, para auxiliar na resolução desses problemas.

Em alguns grupos de dípteros muscoides já foram relatados a presença de híbridos naturais, como por exemplo, espécies do gênero *Lucilia* (Diptera: Calliphoridae) (STEVENS & WALL, 1996; STEVENS *et al.*, 2002). Desta forma, com o intuito de ajudar a esclarecer a possibilidade da ocorrência de cruzamentos entre espécies diferentes de dípteros calípteros, alguns autores propuseram a utilização de genes nucleares, que apresentam padrão de herança diferente do genoma mitocondrial (STEVENS *et al.*, 2002; MCDONAGH & STEVENS, 2011).

Alguns genes nucleares, como 18S e 28S, são bastante estudados na ordem Diptera e geralmente apresentam congruência com informações morfológicas (CATERINO *et al.*, 2000).

Entretanto, esses genes são utilizados principalmente em níveis hierárquicos superiores (KUTTY *et al.*, 2008; MARINHO *et al.*, 2012). O fator de alongação 1 alfa (*EF- α 1*) e o gene *white* (*wec*), são menos conservados e têm sido testados como marcadores moleculares em diversas espécies de insetos (CATERINO *et al.*, 2000). Esses genes nucleares fazem parte de vias biossintéticas importantes e por isso apresentam baixa taxa de divergência entre os dípteros. Desta forma, acredita-se que a utilização desses genes como marcadores moleculares irão auxiliar na caracterização mais apuradas das espécies de muscoides.

O fator de alongação 1 alfa (*EF- α 1*) participa do processo de tradução, sendo responsável por levar o tRNA ao sítio de ligação no ribossomo para que a tradução se inicie (ANDERSEN *et al.*, 2003). Esse gene possui mais de 1300 pares de bases, sem repetições internas, além de ser um gene de cópia única (CHO *et al.*, 1995). Ele é bastante conservado entre os mais variados organismos, inclusive em insetos e têm sido bastante utilizados em estudos filogenéticos com espécies da família Calliphoridae (DANFORTH & JI, 1998; CATERINO *et al.*, 2000; MCDONAGH & STEVENS, 2011; SINGH & WELLS, 2013). Segundo CATERINO *et al.* (2000), este gene apresenta bons resultados em comparações entre espécies, gêneros e entre subfamílias, pois apresenta muitas substituições sinônimas.

O gene *white* (*wec*) codifica proteínas que participam da captação, do transporte intracelular e do armazenamento dos pigmentos que dão cor aos olhos dos dípteros (MACKENZIE *et al.*, 1999). O gene completo possui 14kb e faz parte da família de transportadores transmembrana ABC (*ATP-binding cassette*) (GARCIA *et al.*, 1996). Ainda segundo estes autores, é composto por sete éxons, sendo o éxon 3 exclusivo da ordem Diptera e que será utilizado neste estudo, o que o torna um importante marcador para comparação nesta ordem (READY *et al.*, 2009). Esse gene apresenta vários alelos mutantes que foram bem caracterizados em dípteros muscoides (ELIZUR *et al.*, 1990; ZACHAR & BINGHAM, 1982; GARCIA *et al.*, 1996).

Neste capítulo buscou-se contribuir para a elaboração de um banco de dados de sequências do gene citocromo oxidase I de dípteros muscoides do Brasil, corroborando os dados taxonômicos. Entretanto, em casos conflitantes com a taxonomia, a análise dos genes nucleares fator de alongação e *white* foram utilizados para auxiliar a elucidar tais questionamentos. Mais especificamente, este capítulo propôs:

- a) construção de um banco de dados de sequências da região *barcode* (citocromo oxidase I) de dípteros das espécies da família Calliphoridae introduzidas e nativas da Região Neotropical;
- b) diferenciação genética das espécies introduzidas no Brasil do gênero *Chrysomya*, através da abordagem do *barcode* (*col*);
- c) avaliação da distância genética entre as sequências da região *barcode* das espécies de dípteros muscoides coletados em quatro eco-regiões do Brasil;
- d) avaliação dos marcadores nucleares fator de alongação 1 alfa (*EF- α 1*) e *white* (*wec*) na identificação de dípteros das espécies da família Calliphoridae.

2. METODOLOGIA

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Transmissores de Leishmanioses, Setor de Entomologia Médica e Forense do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ. A parte experimental foi realizada em colaboração com o Laboratório de Epidemiologia e Sistemática Molecular, através da Plataforma de Identificação Molecular de Parasitos e Vetores do Brasil do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ.

A coleta dos imaturos também ocorreu em conjunto com o Projeto de Entomologia Forense realizado pelo Laboratório de Transmissores de Leishmanioses nos estados do Rio de Janeiro, Amapá, Goiás e Mato Grosso do Sul.

No estado do Rio de Janeiro, as coletas foram realizadas no Parque Estadual da Pedra Branca (Ponto de coleta RJ: 23° 52' 23.04''S e 43° 23' 43.32''W), com autorização do Instituto Estadual do Ambiente (INEA), número 043/2011. No estado do Amapá, as coletas foram realizadas no campus da Universidade Federal do Amapá (Unifap), no bairro Jardim Marco Zero, Macapá (Ponto de coleta AP: 0° 00' 22.5''S e 51° 05' 4.3''W), AP.

Em Goiás, as coletas foram realizadas no Parque Nacional da Chapada dos Veadeiros, localizado no município de Alto Paraíso de Goiás, Distrito de Vila de São Jorge, Goiânia (Ponto de coleta GO: 14° 10' 26.48''S e 47° 49' 26.21''W). No Mato Grosso do Sul, as coletas foram realizadas na Fazenda Onoda, localizada no município de Terenos (Ponto de coleta MS: 20° 27' 42.67''S e 55° 07' 2.51''W) (figura 1).

Os insetos foram coletados seguindo a metodologia de BARBOSA *et al.* (2009), através da utilização de armadilhas tipo Shannon modificada, conforme descrito no capítulo anterior. Os insetos coletados eram mortos por resfriamento e identificados através de caracteres morfológicos diretamente em campo. Depois, eram acondicionados separadamente em tubos tipo *eppendorf* e mantidos congelados.

Ao chegar ao laboratório, os insetos tiveram sua identificação confirmada através do uso de chaves dicotômicas específicas para a família Calliphoridae (MELLO, 2003; CARVALHO & MELLO-PATIU, 2008) e receberam um código com local de coleta e número da amostra.



Figura 1: Pontos de coletas dos dípteros muscoides, nos estados do Rio de Janeiro, Mato Grosso do Sul, Goiás e Amapá.

Fonte: Software Google Earth, data da foto: 29/08/14.

O material-testemunho encontra-se acondicionado em freezer (-18°C) e será depositado na Coleção Entomológica Costa Lima do Instituto Oswaldo Cruz, da Fundação Oswaldo Cruz.

O DNA foi extraído a partir de três pernas do lado direito do inseto, a fim de preservar as características diagnósticas do inseto, caso fosse preciso confirmar a identificação taxonômica. O restante do material foi mantido à temperatura de -18°C como testemunho. A extração de DNA total foi realizada utilizando *kit* de extração (Wizard Genomic DNA Purification – Promega), seguindo as instruções do fabricante.

Com o objetivo de amplificar a porção 5' do gene citocromo oxidase I, foi utilizado um conjunto de iniciadores LCO 1490-L e HCO 2198-L. Entretanto, em algumas amostras, a amplificação com estes não foi possível, então, outro conjunto de iniciadores foi testado (LEP-F1 e LEP-R1) e um novo par de iniciadores foi desenhado (COI – Call F e COI – Call R). O novo par de iniciadores foi desenhado com o auxílio do programa Oligo 3, utilizando as sequências depositadas no GenBank e aquelas produzidas nestes experimentos como referência. Na tabela 1 encontram-se as sequências destes iniciadores.

Tabela 1: Iniciadores utilizados para a amplificação e sequenciamento da região *barcode* (gene mitocondrial citocromo oxidase subunidade I - *coI*), fator de alongação 1 alfa (EF- α 1) e do éxon 3 do gene *white* (*wec*). Os nucleotídeos seguem a nomenclatura da IUPAC (União Internacional de Química Pura e Aplicada): A – adenina; T – timina; G – guanina; C – citosina; W – adenina ou timina; R – adenina ou guanina, H – adenina, citosina ou timina.

| Iniciador | Sequência | Tamanho do Fragmento | Referência |
|----------------|----------------------------------|----------------------|------------------------------|
| coI | | | |
| LCO 1490-L | 5'-GGTCWACWAATCATAAAGATATTGG-3' | 658pb | NELSON <i>et al.</i> (2007) |
| HCO 2198-L | 5'-TAAACTTCWGGRTGWCCAAARAATCA-3' | | |
| LEP-F1 | 5'-ATTCAACCAATCATAAAGATAT-3' | 648pb | HEBERT <i>et al.</i> (2004a) |
| LEP-R1 | 5'-TAAACTTCTGGATGTCCAAAAA-3' | | |
| COI – Call F | 5'-CHAATCATAAAGATATTGGTAC-3' | 626pb | - |
| COI – Call R | 5'-KTTGRTATAAAATWGGRTCTCC-3' | 626pb | - |
| EF- α 1 | | | |
| EF-F05 | 5'-CCTGGACATCGTGATTCAT-3' | 401pb | READY <i>et al.</i> (2009) |
| EF-F06 | 5'-TTACCTTCAGCGTTACCTTC-3' | | |
| white | | | |
| WEC-F21 | 5'-GTTTGTGGCGTAGCCTATCC-3' | 617pb | READY <i>et al.</i> (2009) |
| WEC-R12 | 5'-AATGTCACTCTACCYTCGGC-3' | | |

Para os iniciadores LCO 1490-L e HCO 2198-L foram utilizados 0,25mM de dNTP, 3,0 μ M de MgCl₂, 0,4 μ M de cada iniciador e 1U de Taq Polimerase. Para os iniciadores LEP-F1e LEP-R1, as concentrações foram 0,25mM de dNTP, 2,5mM de MgCl₂, 0,4 μ M de cada iniciador e 2U de Taq Polimerase. A quantidade de DNA foi correspondente a 2 μ L (estimado 5-20 ng). Os ciclos de PCR consistiram de uma etapa inicial de desnaturação a temperatura de 94°C por dois minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 45°C por 30 segundos, alongação a 72°C por dois minutos, seguida de uma etapa de extensão final a 72°C por cinco minutos, gerando produtos com 658pb. Estas mesmas condições foram utilizadas para os outros iniciadores LEP e COI – Call.

Os iniciadores nucleares utilizados foram o EF-F05 e EF-F06 que amplificam o fator de alongação EF- α 1 e o WEC-F21 e WEC-R12 que amplificam o gene *white* (READY *et al.*, 2009) (tabela 1).

Para os iniciadores EF-F05 e EF-F06 foram utilizados 100 μ M de dNTP, 1,5 μ M de MgCl₂, 0,8 μ M de cada iniciador e 1U de Taq Polimerase. A quantidade de DNA foi correspondente a 2 μ L (5-20ng). Os ciclos de PCR consistiram de uma etapa inicial de desnaturação a temperatura de 94°C por três minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 47°C por 30 segundos, alongação a 72°C por 90 segundos, seguida de uma etapa de extensão final a 72°C por dez minutos, gerando produtos com 401pb de uma região livre de introns.

Para os iniciadores WEC-F21 e WEC-R12 foram utilizados 400 μ M de dNTP, 3,0 μ M de MgCl₂, 0,4 μ M de cada iniciador e 2U de Taq Polimerase. A quantidade de DNA foi correspondente a 2 μ L (5-20ng). Os ciclos de PCR consistiram de uma etapa inicial de desnaturação a temperatura de 94°C por três minutos, seguida de 5 ciclos iniciais de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 38°C por 30 segundos, alongação a 72°C por 90 segundos, seguidos de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 42°C por 30 segundos, alongação a 72°C por 90 segundos e uma etapa de extensão final a 72°C por dez minutos, gerando produtos com 617pb do éxon 3.

Em todas as reações de amplificação foram utilizados controles negativos e positivos para verificar a presença de possíveis contaminantes, além de inibidores às reações de amplificação.

O produto da reação de PCR para todos os genes foi visualizado em gel de agarose 1,5% corados com *Gel Red* (Biotium) e posteriormente purificados utilizando *kit GFX PCR and gel band purification* (GE Healthcare) com o objetivo de recuperar a maior quantidade possível de material.

As reações de sequenciamento foram realizadas para ambas as fitas de DNA, utilizando o *kit ABI Prism BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems), com os mesmos iniciadores usados na amplificação, sendo submetidas à 30 ciclos de 96°C durante 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C a 4 minutos.

Os produtos da reação de sequenciamento foram purificados, através da precipitação com isopropanol e etanol e posteriormente foram re-suspendidos em formamida, desnaturados a 95°C e analisados em um sequenciador automático de 48 capilares ABI 3730 XL (Applied Biosystems), pertencente à Plataforma de Sequenciamento de DNA / PDTIS – Fundação Oswaldo Cruz.

A edição das sequências foi realizada individualmente e manualmente para cada amostra utilizando o programa SeqMan Lasergene versão 7 (DNAStar Inc.). Os eletroferogramas também foram analisados individualmente com o intuito de conferir melhor qualidade às sequências consenso produzidas.

Cada sequência consenso gerada foi submetida ao BLASTn - *Basic Local Alignment Search Tool* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para conferir a identificação taxonômica com as sequências já depositadas neste banco de dados.

O alinhamento das sequências foi realizado através de Clustal W, implementado no Programa Bioedit Sequence Alignment Editor (HALL, 1999), utilizando as configurações padrão do programa. A edição do alinhamento foi realizada manualmente, utilizando-se como

base comparativa sequências da mesma espécie, coletadas em outros países e sequências de espécies próximas, além de sequências de *Drosophila melanogaster* (Meigen, 1830) (Diptera: Drosophilidae) como grupo externo. Todas estas sequências usadas como referência para a comparação foram consultadas no GenBank (tabela 1 – anexo B).

Os diferentes haplótipos foram analisados com o intuito de quantificar a divergência entre as sequências de nucleotídeos usando o método Kimura-2-parâmetros, através do programa MEGA v. 6.0 (TAMURA *et al.*, 2007), para a geração de uma matriz de distância genética.

As árvores foram construídas seguindo os métodos de Neighbor-Joining e Máxima Verossimilhança (SAITOU & NEI, 1987), implementados no programa MEGA v. 6.0 (TAMURA *et al.*, 2007). A confiabilidade das árvores filogenéticas construídas foi testada com 1000 replicações de bootstrap (FELSENSTEIN, 1985).

Os métodos de neighbor-joining e máxima verossimilhança têm a finalidade de estimar as relações evolutivas entre as espécies, o primeiro baseando-se na distância genética e o segundo no estado do caráter (NEI & KUMAR, 2000; SCHNEIDER, 2003). Assim, estes foram escolhidos por apresentarem bons resultados na separação das espécies em clados monofiléticos sem a finalidade de estabelecer relações filogenéticas entre eles, da mesma forma que o projeto *barcode* (HEBERT *et al.*, 2003a; NELSON *et al.*, 2007).

As árvores de distância foram construídas utilizando todas as sequências obtidas e também árvores individualizadas para cada espécie estudada. Entretanto, as árvores utilizando os marcadores nucleares foram realizadas em conjunto, com apenas alguns representantes de cada espécie. Os métodos de reconstrução para os genes nucleares foram os mesmos utilizados para a região *barcode*.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As coletas foram realizadas nos estados do Amapá, Goiás, Mato Grosso do Sul e Rio de Janeiro, com um total de 346 dípteros muscoides. As espécies analisadas neste estudo foram *Chrysomya albiceps*, *C. megacephala*, *C. putoria* e *C. rufifacies*, *Chloroprocta idioidea*, *Lucilia eximia*, *Cochliomyia macellaria*, *Hemilucilia segmentaria* e *H. semidiaphana*. Nas tabelas 2 e 3 – anexo B estão representadas as espécies coletadas em cada ponto e a distribuição geográfica das mesmas.

A identificação de espécies de importância médica-veterinária e forense no Brasil é realizada exclusivamente através da taxonomia clássica de adultos. Entretanto, em alguns casos, a imperícia do coletor pode danificar o material de forma que a criação do inseto até a fase adulta seja impossibilitada, gerando a busca por outras metodologias de identificação (MENDONÇA *et al.*, 2008, 2010).

Os depósitos de sequências gênicas de amostras coletadas no Brasil nos bancos de dados de acesso gratuito são muito incipientes. A maioria dos grupos de pesquisa opta por criar bancos de dados próprios e não compartilham estas informações com a comunidade científica. Desta forma, o conhecimento da diversidade gênica de dípteros muscoides coletados no Brasil ainda é muito limitado.

O banco de dados Bold Systems (*Barcode of Life Data Systems*) possui acesso livre e gratuito e tem como objetivo principal facilitar o acesso à diversidade. As sequências obtidas nestes estudos serão depositadas nesta Plataforma como representantes da fauna de dípteros muscoides nativos e introduzidos de importância sanitária e forense coletados no Brasil. Assim, será possível que pesquisadores e investigadores criminais tenham acesso a sequências da região *barcode* de nove espécies de dípteros muscoides coletados em quatro eco-regiões do Brasil (Amazônia, Cerrado, Pantanal e Mata Atlântica), abrangendo grande parte da diversidade desses insetos. As amostras obtidas geraram bandas específicas, com fragmentos aproximados de 670pb e produziram sequências de boa qualidade.

Para depósito das sequências no Bold Systems, as mesmas devem apresentar alta qualidade, picos bem definidos nos eletroferogramas, com valor de Q acima de 20, sem códons de parada e com tamanho mínimo de 550 pares de bases. As sequências obtidas nesse trabalho, além das características acima, também não apresentaram inserções ou deleções, facilitando o processo de alinhamento e indicando que estas apresentam qualidade exigida para serem depositadas na plataforma do Bold Systems. De acordo com ZHANG & HEWITT (1996), o conjunto de características observadas podem ser um indício de que não houve amplificação de pseudogenes, garantindo a mesma taxa de evolução entre as sequências *barcode* comparadas.

Para as espécies *H. semidiaphana*, *H. segmentaria*, *C. idioidea* e *C. macellaria* não foi possível a amplificação da região *barcode* com qualidade em todas as amostras com os iniciadores propostos na literatura. Para a obtenção de sequências destas espécies, um novo conjunto de iniciadores para esta região foi desenhado. Os experimentos foram realizados nas

mesmas condições já testadas para os outros iniciadores mitocondriais e foi possível obter maior sucesso na amplificação de todos os califorídeos.

A composição dos nucleotídeos da região *barcode* mostrou uma tendência de adeninas e timinas em todas as espécies estudadas, conforme visto na tabela 2. NELSON *et al.* (2007) também realizaram observações semelhantes para o gênero *Chrysomya* coletadas na Austrália e conforme é esperado para amostras de DNA mitocondrial em outros insetos, como relatado, por exemplo em TAMURA (1992), CROZIER & CROZIER (1993), SIMON *et al.* (1994), TAN *et al.* (2009).

Tabela 2: Número de amostras e de sequências, número de haplótipos e de sítios variáveis por espécie de dípteros muscoides, utilizando a região *barcode* (*coI*) como marcador.

| Espécies | Número de Amostras | Conteúdo A + T | Número de Sequências | Número de Haplótipos | Número de Sítios Variáveis |
|---------------------------------|--------------------|----------------|----------------------|----------------------|----------------------------|
| <i>Hemilucilia segmentaria</i> | 6 | 0,685 | 4 | 2 | 1 |
| <i>Hemilucilia semidiaphana</i> | 6 | 0,687 | 6 | 3 | 2 |
| <i>Chloroprocta idioidea</i> | 6 | 0,680 | 5 | 3 | 2 |
| <i>Cochliomyia macellaria</i> | 41 | 0,682 | 40 | 22 | 29 |
| <i>Lucilia eximia</i> | 41 | 0,672 | 24 | 14 | 42 |
| <i>Chrysomya putoria</i> | 39 | 0,690 | 23 | 6 | 55 |
| <i>Chrysomya megacephala</i> | 84 | 0,685 | 38 | 1 | 0 |
| <i>Chrysomya albiceps</i> | 114 | 0,694 | 83 | 6 | 7 |
| <i>Chrysomya rufifacies</i> | 9 | 0,689 | 9 | 1 | 0 |
| Total | 346 | x | 232 | x | x |

Na árvore de distância utilizando todas as sequências do gene *coI* obtidas neste estudo, foi possível observar que algumas espécies como *C. megacephala*, *C. idioidea*, *H. semidiaphana*, *H. segmentaria* e *C. macellaria* formaram agrupamentos únicos contendo todas as amostras analisadas e com suporte alto nos ramos (acima de 98%). No entanto, *C. putoria* e *L. eximia* não apresentaram esta organização. As amostras de *L. eximia* formaram dois grupos distintos com distância genética alta e suporte nos ramos (100%). *Chrysomya putoria* parece ser polifilética, com suas amostras formando três clados, sendo dois deles compostos apenas por esta espécie. O terceiro grupo de espécies se apresenta como um clado único, junto com todas as amostras de *C. rufifacies* e *C. albiceps*. Estes resultados encontram-se nas figuras 1 e 2 – anexo B.

Nos casos, onde foram observadas incongruências entre as sequências de *col* e a identificação taxonômica, a análise dos genes nucleares foi utilizada na tentativa de elucidar estas questões (figuras 2, 3 e 4). As espécies *C. megacephala*, *C. idioidea*, *H. semidiaphana* e *H. segmentaria* apresentaram a mesma organização para os genes nucleares daquela observada para *col*. Não foi possível obter sequências de boa qualidade do fator de alongação para *C. macellaria*, entretanto, as sequências do gene *white* formaram um grupamento único, assim como em *col*.

Conforme observado nas figuras 3 e 4, as sequências dos genes nucleares de *L. eximia* formaram um clado único contendo os dois grupos observados em *col*. Entretanto, a formação do agrupamento único contendo amostras das espécies *C. putoria* - parte, *C. rufifacies* e *C. albiceps*, bem como os dois cladros separados contendo amostras de *C. putoria* foi novamente observado. Assim, apesar da formação de um único haplótipo contendo representantes das três espécies, neste estudo, a nomenclatura taxonômica específica será utilizada, para que o texto fique mais claro.

Além destas análises, também foram realizadas as análises por espécie de *col*, que encontram-se expostas a seguir, permitindo melhor visualização dos resultados.

Devido ao fato de nenhuma espécie ter apresentado diferença significativa com relação ao método de construção das árvores de distância, apenas as árvores de neighbor-joining são mostradas no texto. As árvores construídas pelo método da máxima verossimilhança encontram-se em anexo (figuras 3 a 17 - anexo B).

As matrizes de distâncias genéticas entre os espécimes ou haplótipos únicos utilizando a região *barcode* também estão em anexo (tabelas 3 a 10 – anexo B).

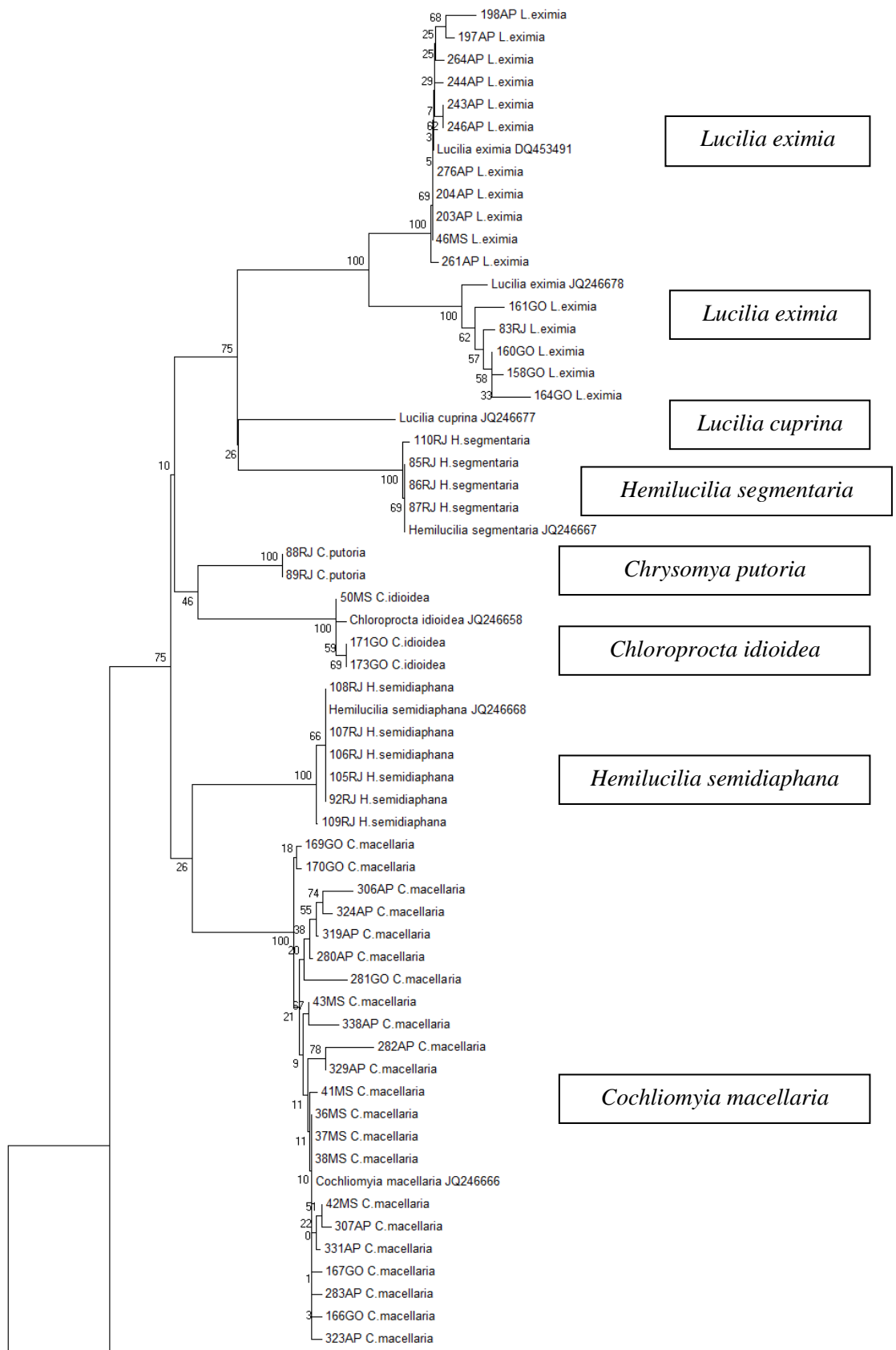


Figura 2: Árvore de distância genética construída pelo método de neighbor-joining entre os haplótipos de dípteros muscoides, utilizando o gene citocromo oxidase I (*coI*) como marcador (continua).

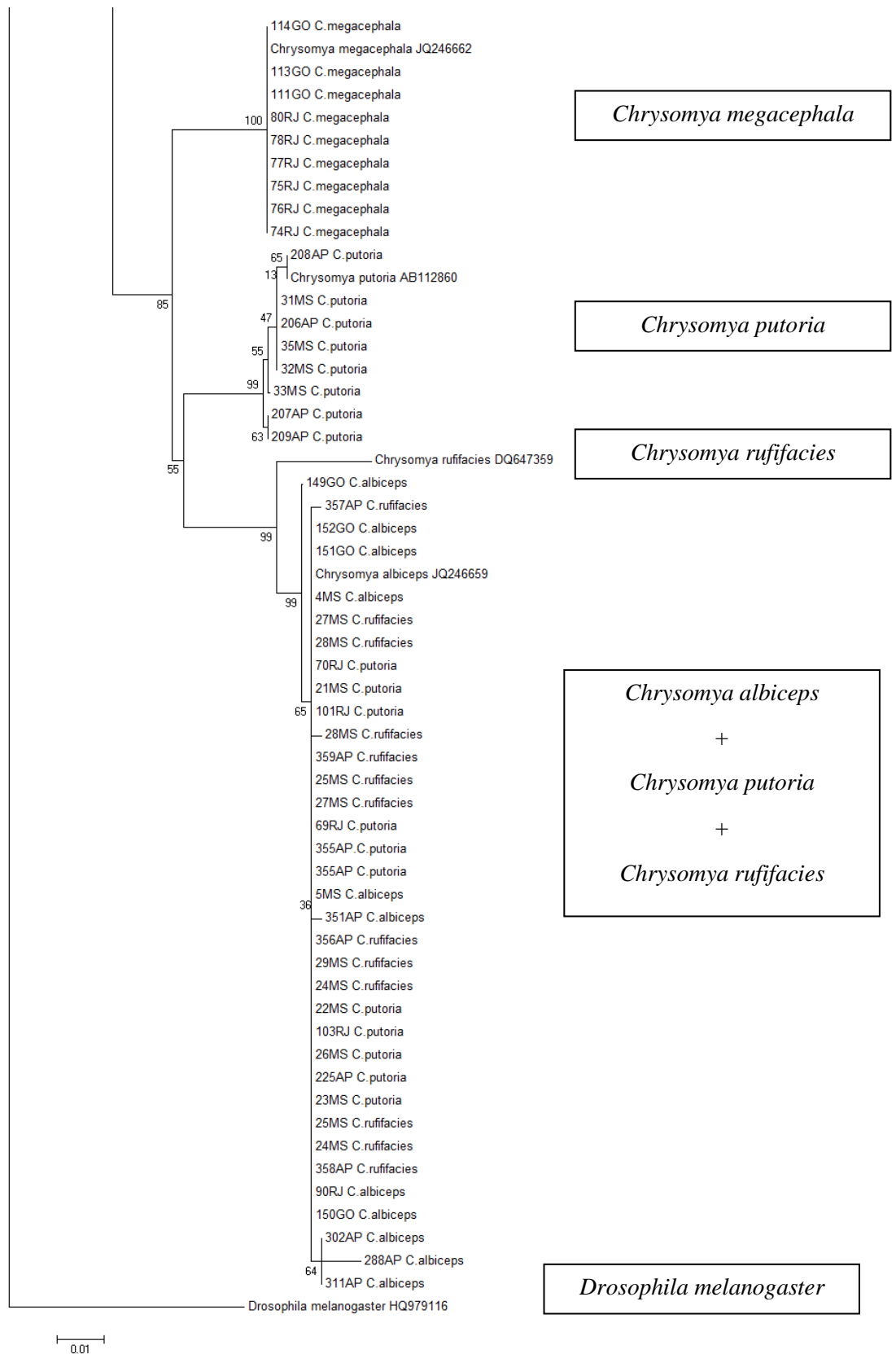


Figura 2 continuação: Árvore de distância genética construída pelo método de neighbor-joining entre os haplótipos de dípteros muscoides, utilizando o gene citocromo oxidase I (*coI*) como marcador.

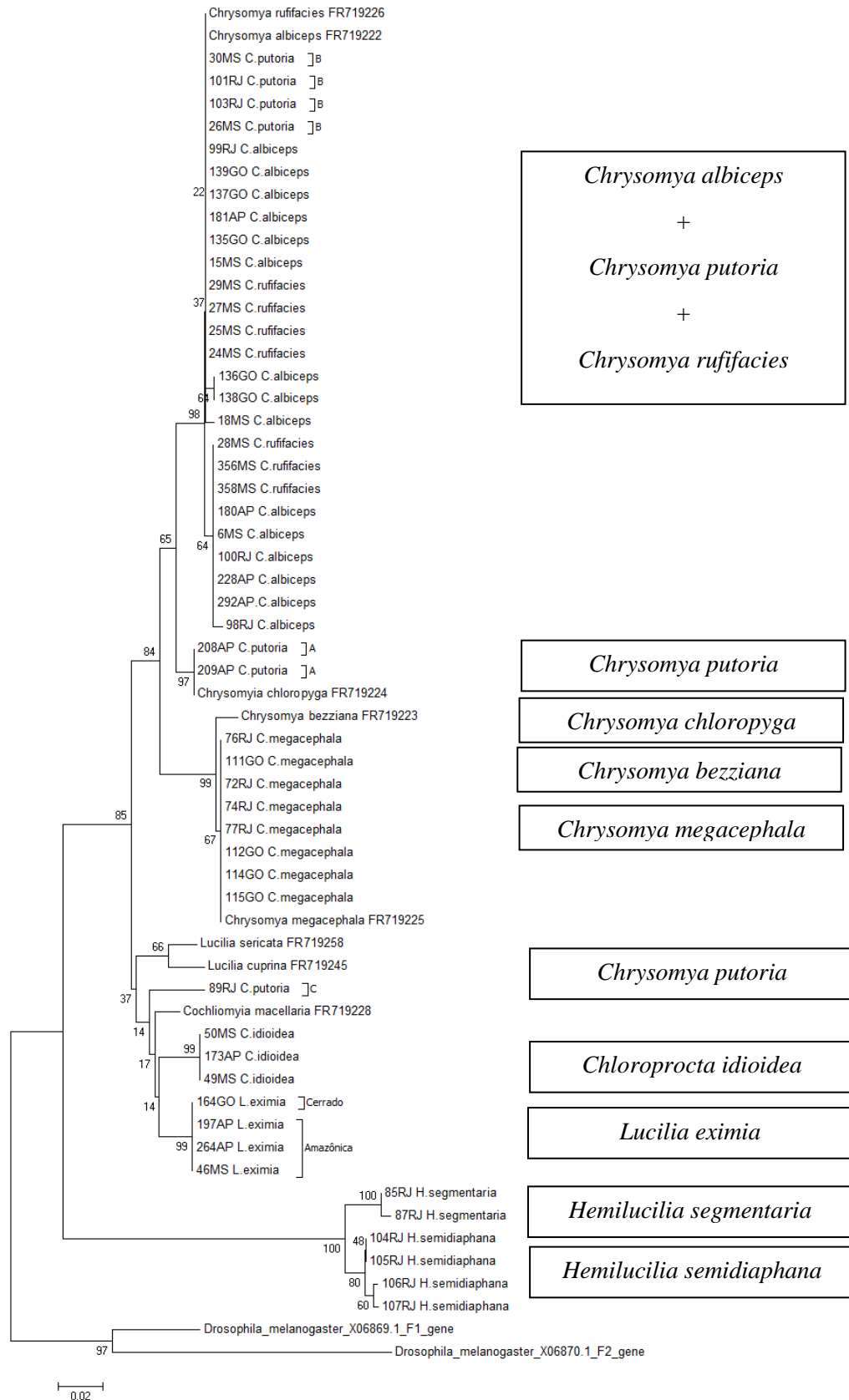


Figura 3: Árvore de distância genética construída pelo método de neighbor-joining entre as amostras de dípteros muscoides, utilizando o fator de alongação 1 alfa (*EF- α 1*) como marcador.

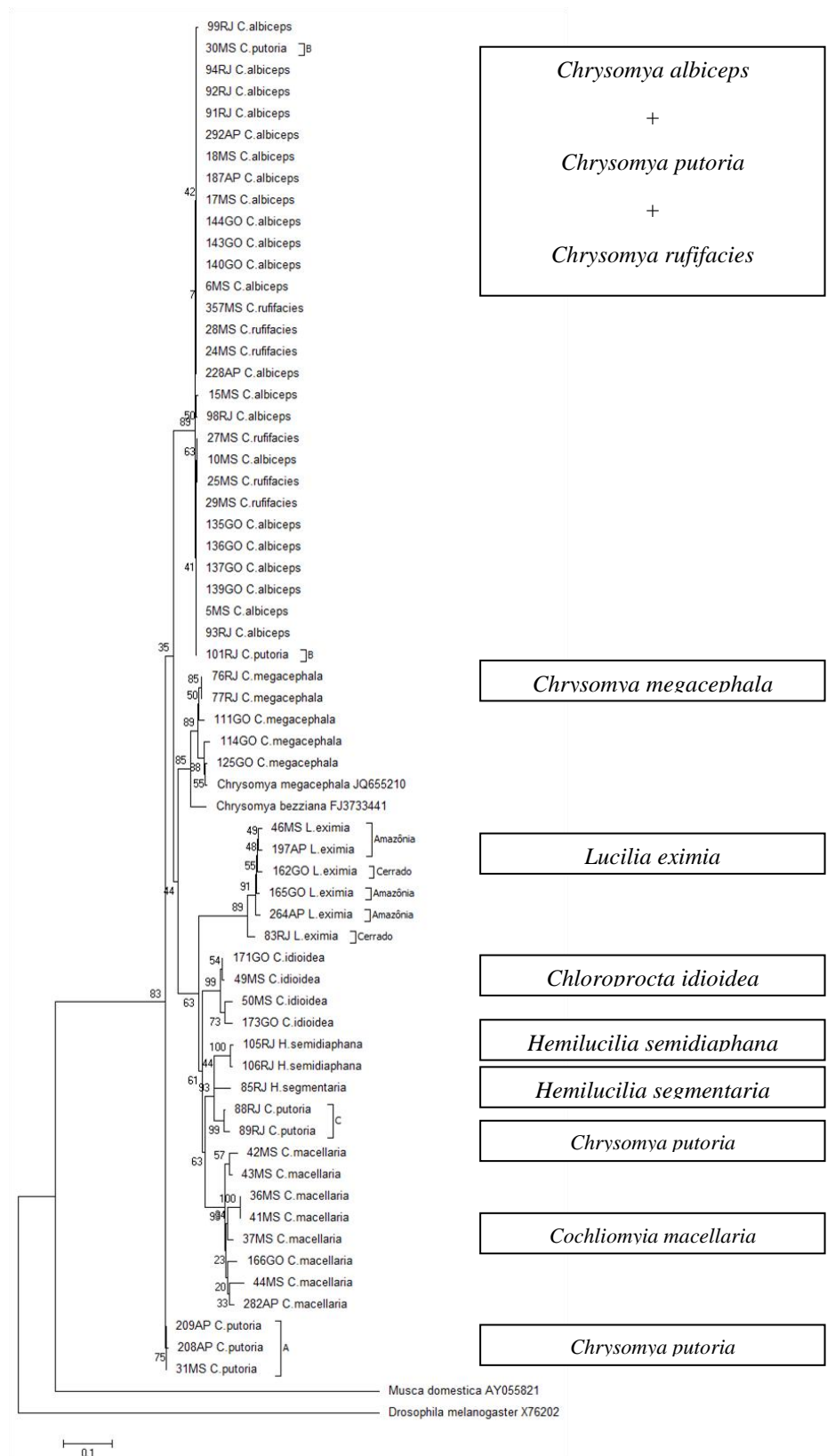


Figura 4: Árvore de distância genética construída pelo método de neighbor-joining entre as amostras de dípteros muscóides, utilizando o gene *white* (wec) como marcador.

3.1 – *Hemilucilia semidiaphana* e *Hemilucilia segmentaria*

Na tabela 2 é possível observar que foram coletados apenas seis indivíduos de cada espécie e foram observados dois haplótipos com um sítio variável em *H. segmentaria* (figuras 5 e 6) e três haplótipos e dois sítios variáveis entre as amostras de *H. semidiaphana* (figuras 7 e 8).

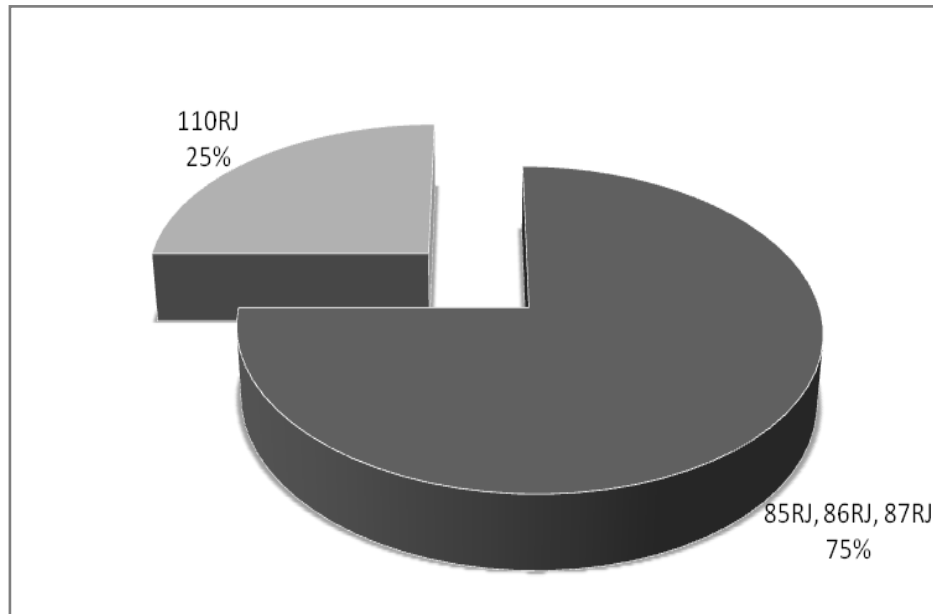


Figura 5: Gráfico com a distribuição das amostras por haplótipos de *Hemilucilia segmentaria*, utilizando a região *barcode* como marcador.

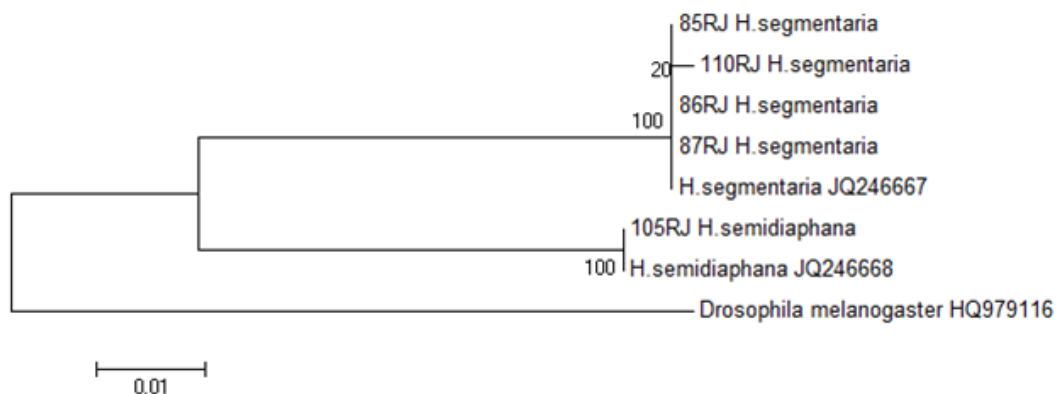


Figura 6: Árvore de distância genética construída pelo método de neighbor-joining entre as amostras de *Hemilucilia segmentaria*, utilizando a região *barcode* como marcador.

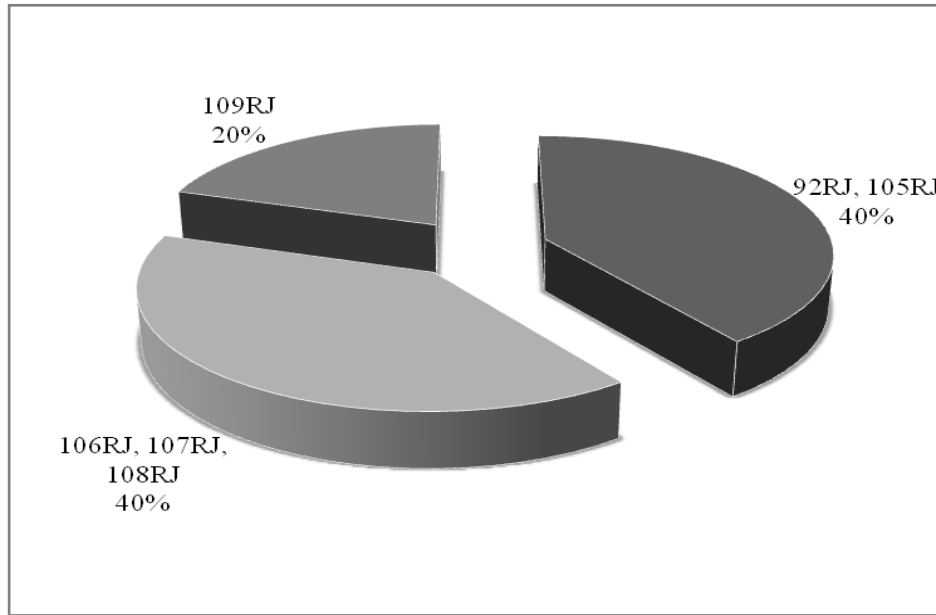


Figura 7: Gráfico com a distribuição das amostras por haplótipos de *Hemilucilia semidiaphana*, utilizando a região *barcode* como marcador.

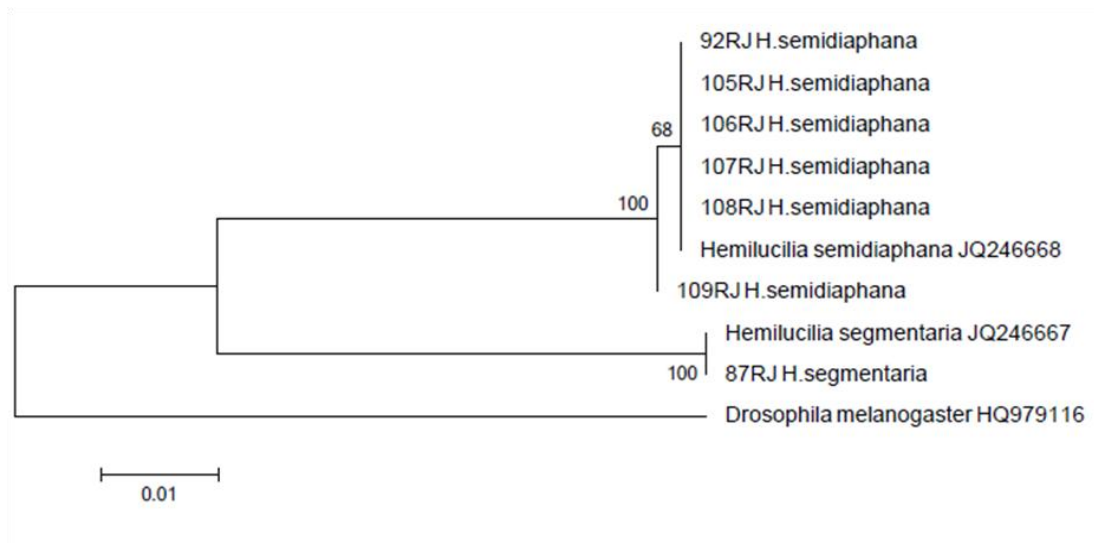


Figura 8: Árvore de distância genética construída pelo método de neighbor-joining entre as amostras de *Hemilucilia semidiaphana*, utilizando a região *barcode* como marcador.

A distância genética intraespecífica média foi de 0,1% (variando de 0-0,2%) para ambas as espécies, enquanto a distância entre as duas espécies deste gênero foi de 8,3% (tabelas 3 e 4), ou seja, para estas espécies, a variação intraespecífica foi menor do que a variação interespecífica.

As matrizes de distância genética entre os espécimes de *H. segmentaria* e *H. semidiaphana* estão em anexo (tabela 4 e 5 – anexo B, respectivamente), assim como as árvores construídas pelo método de máxima verossimilhança.

No entanto, é importante evidenciar que os indivíduos sequenciados foram coletados em um único ponto, no Parque Estadual da Pedra Branca, próximo ao bairro de Jacarepaguá, Rio de Janeiro, RJ.

Essas espécies de muscoides são nativas da região Neotropical e assinantrópicas, muito abundantes em ambientes naturais de florestas. Em estudos de sinantropia realizados no Rio de Janeiro, D'ALMEIDA & LOPES (1983) indicam claramente a preferência dessas espécies por áreas de floresta. Essa preferência também foi observada por outros autores (PARALUPPI & CASTELLÓN, 1994).

Segundo o Instituto Estadual do Ambiente (INEA-RJ, 2014), o Parque Estadual da Pedra Branca apresenta uma área aproximada de 12.300 hectares (123km²) de vegetação típica da Mata Atlântica, o que permite o fácil deslocamento dessas espécies em ambiente restritamente florestal, garantindo o cruzamento e a variação haplotípica encontrada.

SANDOVAL (2011) analisou 300pb da região *barcode* e o gene ITS2 de representantes da família Calliphoridae e Muscidae, onde não observou variação intraespecífica para o segmento da região *barcode* e alta variação intraespecífica para a região do gene ITS2.

As árvores construídas baseadas na região *barcode* foram congruentes com a morfologia para as espécies *H. semidiaphana* e *H. segmentaria*. Entretanto, foi observado maior variação intraespecífica nos genes nucleares do que em *coI*, diferente do esperado, uma vez que os genes nucleares costumam apresentar taxa de evolução mais lenta (tabela 3). Os dados sobre genes nucleares destas espécies disponíveis na literatura são muito incipientes, no entanto, SANDOVAL (2011) observou resultados semelhantes ao analisar o gene nuclear ITS2.

Tabela 3: Distância média intraespecífica de dípteros muscoides, em porcentagem, utilizando a região *barcode* (*coI*), o fator de alongação 1 alfa (*EF- α 1*) e o gene *white* (*wec*) como marcadores. * uma ou nenhuma sequência obtida;

| Espécies | Região <i>barcode</i> | <i>EF-α1</i> | <i>white</i> |
|---------------------------------|-----------------------|--------------------------------|--------------|
| <i>Hemilucilia segmentaria</i> | 0,1 | 0,3 | * |
| <i>Hemilucilia semidiaphana</i> | 0,1 | 0,4 | 1,7 |
| <i>Chloroprocta idioidea</i> | 0,2 | 0 | 3,1 |
| <i>Cochliomyia macellaria</i> | 1,0 | * | 4,2 |
| <i>Lucilia eximia</i> | 2,2 | 0 | 3,6 |
| <i>Chrysomya putoria</i> | 3,7 | 2,4 | 10,4 |
| <i>Chrysomya megacephala</i> | 0 | 0 | 2,1 |
| <i>Chrysomya albiceps</i> | 0,4 | 0,5 | 0,4 |
| <i>Chrysomya rufifacies</i> | 0 | 0,4 | 0,4 |

Tabela 4: Matriz de distância genética média entre as espécies de dípteros muscoides utilizando o gene citocromo oxidase I (*coI*) como marcador.

Legenda: *Hsegmentaria* – *Hemilucilia segmentaria*; *Hsemidiaphana* – *Hemilucilia semidiaphana*; *Cidioidea* – *Chloroprocta idioidea*; *Cmacellaria* – *Cochliomyia macellaria*; *Leximia* – *Lucilia eximia*; *Cputoria* – *Chrysomya putoria*; *Cmegacephala* – *Chrysomya megacephala*; *Calbiceps* – *Chrysomya albiceps*.

| | <i>Hsegmentaria</i> | <i>Hsemidiaphana</i> | <i>Cidioidea</i> | <i>Cmacellaria</i> | <i>Leximia</i> | <i>Cputoria</i> | <i>Cmegacephala</i> | <i>Calbiceps</i> |
|----------------------|---------------------|----------------------|------------------|--------------------|----------------|-----------------|---------------------|------------------|
| <i>Hsegmentaria</i> | - | | | | | | | |
| <i>Hsemidiaphana</i> | 8,3 | | | | | | | |
| <i>Cidioidea</i> | 8,7 | 8,0 | | | | | | |
| <i>Cmacellaria</i> | 8,8 | 5,8 | 7,0 | | | | | |
| <i>Leximia</i> | 8,7 | 9,6 | 10,7 | 11,5 | | | | |
| <i>Cputoria</i> | 10,6 | 7,3 | 8,2 | 7,5 | 10,5 | | | |
| <i>Cmegacephala</i> | 10,0 | 6,2 | 7,2 | 7,2 | 10,8 | 4,6 | | |
| <i>Calbiceps</i> | 11,3 | 9,6 | 9,6 | 9,3 | 12,1 | 4,8 | 5,3 | |
| <i>Crufifacies</i> | 10,9 | 9,3 | 9,3 | 9,0 | 11,7 | 4,5 | 5,0 | 0,4 |

3.2 – *Chloroprocta idioidea*

A espécie *C. idioidea* também é restrita a região Neotropical e apresenta preferência de habitat florestal semelhante ao gênero *Hemilucilia* (D'ALMEIDA & LOPES, 1983). É um díptero que apresenta baixa frequência em áreas de resquícios florestais e que sofrem ação antrópica, mas é abundante em áreas preservadas (ESPOSITO *et al.*, 2010; BATISTA-DA-SILVA *et al.*, 2011). Como possuem hábito colonizar carcaças de animais e possivelmente de humanos, apresentam importância destacada na entomologia forense como indicadores de deslocamento de carcaças e cadáveres.

As amostras obtidas são provenientes do Parque Nacional da Chapada dos Veadeiros, Goiás e da Fazenda Onoda, Mato Grosso do Sul e apenas seis espécimes foram coletados e quatro sequências obtidas. Foram observados três haplótipos com dois sítios variáveis entre eles (tabela 2, figura 9).

A distância média entre estes haplótipos foi de 0,2% (0 – 0,3%) e a distância interespecífica em comparação as outras espécies deste estudo foi suficiente para garantir a separação das mesmas (7,2 - 10,7%) (tabelas 3 e 4).

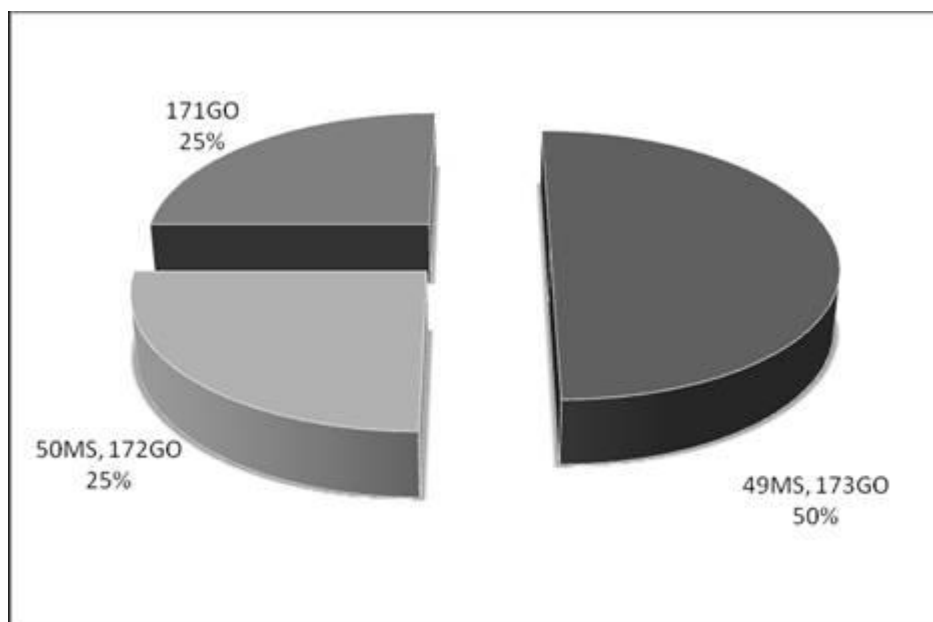


Figura 9: Gráfico com a distribuição das amostras por haplótipos de *Chloroprocta idioidea*, utilizando a região *barcode* como marcador.

As árvores da região *barcode* indicam que esta espécie pode ser monofilética (figura 10), sendo reiterado pelas análises dos genes nucleares, com suporte de *bootstrap* variando de 97 - 99% (figuras 9 e 10). Entretanto, apesar disto, ela espécie pode ser encontrada em toda a região Neotropical e o pequeno número de amostras pode não representar a diversidade genética total da espécie. Contudo, os resultados apresentados contribuem para o conhecimento da diversidade da região central do Brasil, uma vez que existe apenas um depósito de sequência desta espécie no GenBank.

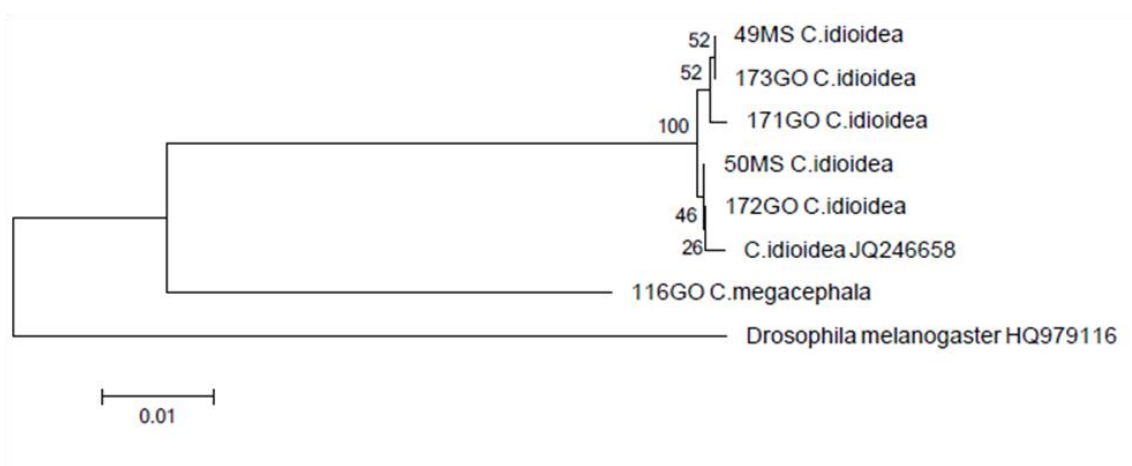


Figura 10: Árvore de distância genética construída pelo método de neighbor-joining entre as amostras de *Chloroprocta idioidea*, utilizando a região *barcode* como marcador.

3.3 – *Cochliomyia macellaria*

Cochliomyia macellaria também é uma espécie da região Neotropical que antes da introdução das espécies do gênero *Chrysomya* era coletada com frequência tanto em ambientes urbanos quanto rurais e florestais (FERREIRA, 1983). Atualmente, a presença desta espécie é cada vez mais rara nas coletas em experimentos de entomologia forense em ambientes urbanos (BARBOSA, 2008).

Na análise da região *barcode* foram observados 20 haplótipos diferentes em 40 indivíduos sequenciados e baixo suporte dos ramos (menos de 70%) (figuras 11 e 12). A variação intraespecífica média em *C. macellaria* foi de 0,8% (0,2 - 2,0%), onde dois indivíduos do Amapá (282AP e 306AP) e uma amostra de Goiás (281GO) apresentaram maior distância genética do restante das amostras (tabela 3).

A variação interespecífica foi maior do que a intraespecífica e ficou entre 5,7 - 7,8% quando comparado a outra espécie desde gênero existente no Brasil (*C. hominivorax*) e à *Chrysomya megacephala*, espécie introduzida com a qual compartilha nicho ecológico. Neste caso, podemos afirmar que a região *barcode* apresenta diferenças suficientes para permitir a identificação de espécies do gênero *Cochliomyia* (tabela 4).

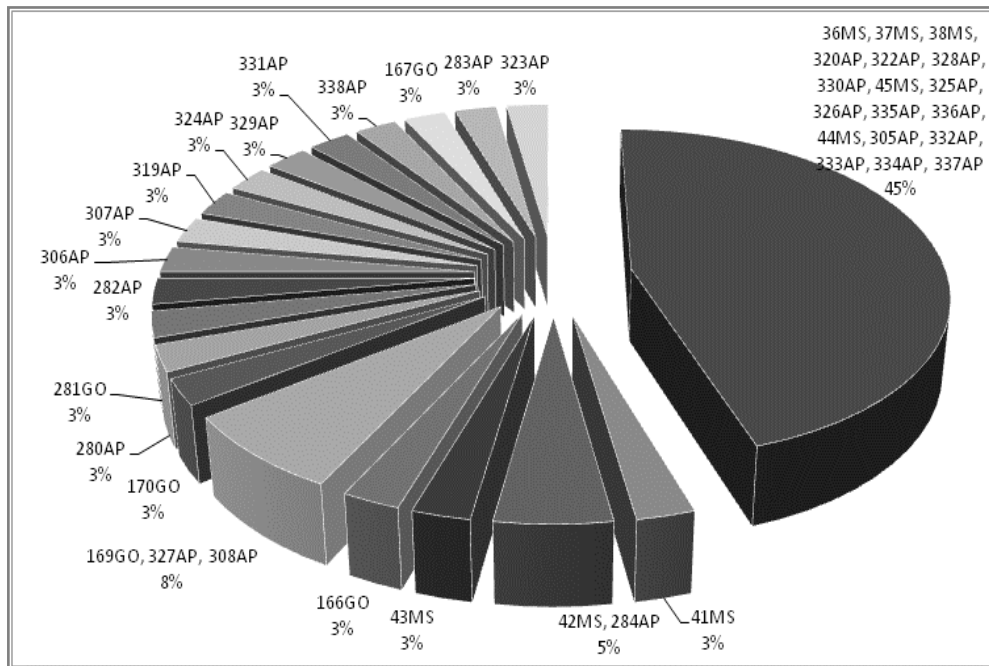


Figura 11: Gráfico com a distribuição das amostras por haplótipos de *Cochliomyia macellaria*, utilizando a região *barcode* como marcador.

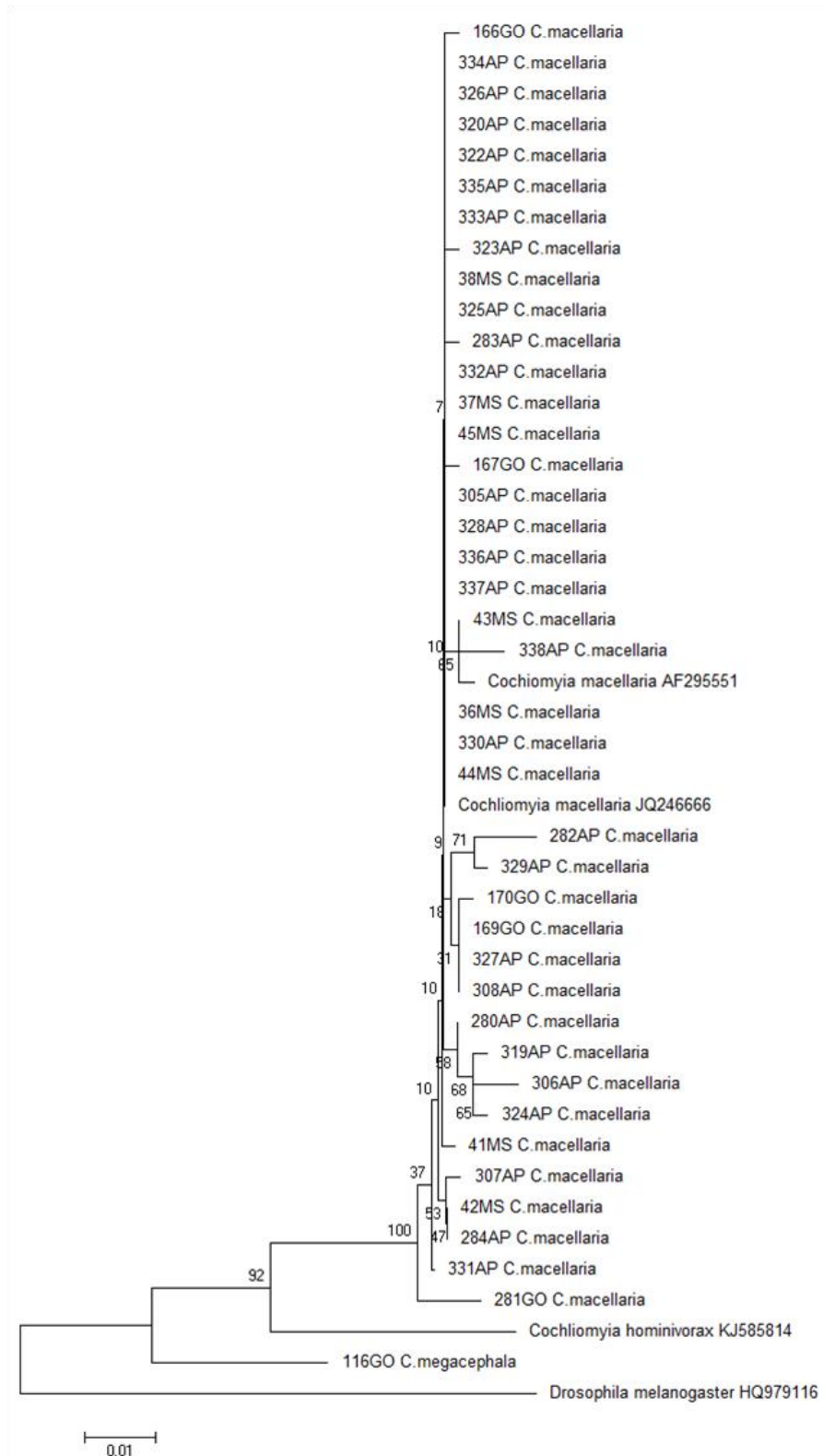


Figura 12: Árvore de distância genética construída pelo método de neighbor-joining entre as amostras de *Cochliomyia macellaria*, utilizando a região *barcode* como marcador.

BATISTELLI (2007) estudou uma parte do gene *col* com 310pb e também verificou a presença de 4 haplótipos em cinco indivíduos coletados na cidade de Botucatu, SP, com baixo suporte nos ramos. Acredita-se que esta variação haplotípica alta seja comum na espécie.

Apesar da grande variabilidade de haplótipos detectada, não foi possível atribuir essa variação aos pontos de coleta. FRESIA *et al.* (2011) também não observaram a formação de grupos de populações em *C. hominivorax* na região Neotropical utilizando como marcadores *col*, *colII* e região controle. Provavelmente, devido à ampla distribuição desta espécie por toda a região Neotropical e ao alcance do voo maior, os adultos mantiveram o intercruzamento entre as diversas regiões geográficas.

Não foi possível a obtenção de sequências do gene nuclear *EF- α 1* de qualidade para essa espécie. Entretanto, o gene *white* mostra a formação de um grupo composto exclusivamente por *C. macellaria* (figura 4), com suporte alto nos ramos (98%) e múltiplos haplótipos, assim como nas sequências de *col*. Infelizmente, assim como para outras espécies de muscoides, não é possível a comparação deste trabalho com outros resultados, uma vez que não existem depósitos de sequências dos genes nucleares nos bancos de dados.

3.4– *Lucilia eximia*

Esta espécie é considerada nativa da região Neotropical e, apesar de possuir hábitos muito semelhantes às moscas-varejeiras, parece não ter sofrido impactos com invasão das moscas do gênero *Chrysomya*. Segundo diversos autores, juntamente com *C. albiceps*, é uma das mais abundantes dentro da família Calliphoridae (MOURA *et al.*, 1997; CARVALHO *et al.*, 2000; CARVALHO & LINHARES, 2001; CARVALHO *et al.*, 2004). Estes insetos são encontrados em ambientes urbanos e rurais, frequentando matéria orgânica de origem vegetal e animal, sendo uma das espécies pioneiras a colonizar carcaças (MADEIRA *et al.*, 1989; MOURA *et al.*, 1997).

As amostras obtidas foram oriundas do Amapá, Goiás, Rio de Janeiro e Mato Grosso do Sul. Na região *barcode*, foram observados 14 haplótipos em 24 sequências analisadas, sendo 47% das amostras compostas por haplótipos únicos e o restante (53%) compartilhando apenas dois haplótipos (tabela 2, figura 13).

As árvores fornecidas pelos dois métodos são muito semelhantes e mostram a formação de dois clados distintos, sustentados por *bootstrap* alto (99%), com diferença genética de 4,6% entre eles (figura 14).

Um grupo é formado quase totalmente por espécies do Amapá e um único espécime de Goiás e Mato Grosso do Sul, e apresenta distância genética média de 0,4% (0 – 1,5%) dentro deste grupo. O segundo grupo é formado por amostras do Rio de Janeiro e Goiás, com distância genética média de 0,7% (0 - 1,4%) (figura 14, tabelas 3 e 4). Esta alta diferenciação genética entre os grupos da Região Amazônica e do Cerrado indicam uma possível estruturação populacional ou a existência de dois taxa distintos.

KOSMANN (2009) avaliou a metodologia do *barcode* para espécies do gênero *Lucilia* e também observou uma grande distância genética entre amostras de *L. eximia* coletadas em Minas Gerais e em outras localidades (Rio de Janeiro e Paraná), com média de 3,7% (0,2 - 10,9%), corroborando os resultados encontrados neste trabalho. SANDOVAL (2011) também observou alta variação intraespecífica em *L. eximia*, tanto com *col* quanto na região do ITS2. Ao realizar a análise conjunta destes dados, esse autor também relatou a formação de dois grupos. Esses autores sugerem a possibilidade de que o agrupamento denominado *L. eximia* seja compreendido por mais de uma unidade taxonômica ou a possível presença de híbridos.

Foi realizada uma análise de neighbor-joining utilizando as amostras de *L. eximia* depositadas por estes autores no Genbank junto com as amostras sequenciadas neste estudo (tabela 1). A formação de dois grupos foi confirmada, com diferença entre eles de 4,4%, agrupando no clado contendo indivíduos predominantemente da região Amazônica, as amostras provenientes de Minas Gerais. No clado formado pelas espécies do Cerrado, agruparam-se as amostras do Rio de Janeiro e do Paraná (figura 11 – anexo B). Estes resultados reforçam a diferenciação genética dentro desta unidade taxonômica.

Ao estudar dípteros deste mesmo gênero, STEVENS *et al.* (2002), utilizando como marcador as sequências de *col* e *colII*, observaram também a presença de duas populações diferentes de *L. cuprina* (típica e havaiana), com variação de 53-59 nucleotídeos entre elas. Ao analisar a região 28S rRNA destas mesmas populações, estes autores verificaram que a espécie *L. cuprina* havaiana apresenta DNA mitocondrial semelhante ao encontrado em *L. sericata* e 28S rRNA semelhante ao encontrado em *L. cuprina* típica, exemplificando um caso de híbridos naturais.

Os dois grupos com variação intraespecífica alta observada na árvore da região *barcode* não foram identificados nas análises com os genes nucleares. Em ambos, as amostras se agruparam, formando um único clado, indicando que as amostras analisadas compartilham o genoma nuclear e podem corresponder a uma única espécie (figuras 3 e 4). WELLS *et al.* (2007) relataram que em *L. cuprina* também foi observado a formação de grupos polifiléticos ao sequenciar *col*, entretanto este agrupamento não foi confirmado por genes nucleares (STEVENS & WALL, 1995, 1996; STEVENS *et al.*, 2002), reiterando a possível ocorrência de introgressão.

O gênero *Lucilia* sempre apresentou questionamentos taxonômicos importantes. STEVENS & WALL (1996) fizeram uma pequena revisão sobre o tema e usaram a análise cladística para esclarecer as relações dentro do gênero. Estes autores relatam que alguns grupos de espécie são considerados subgêneros ou gêneros da tribo Luciliini (MALLOCH, 1926; TOWNSEND, 1935), entretanto estas questões são discutidas até hoje. Segundo STEVENS & WALL (1996), foi proposto a elevação do subgênero *Phaenicia* a gênero, baseado na presença de três cerdas pós-acrosticais (MALLOCH, 1926). Essa proposta foi aceita até que as análises cladísticas de STEVENS & WALL (1996), que confirmam a polifilia deste gênero, agrupando nele espécies que não apresentam as três cerdas.

Muitas espécies de importância médica-veterinária e forense encontram-se no gênero *Lucilia*, sendo *L. eximia* a mosca pioneira a colonizar as carcaças de humanos e animais, desempenhando papel essencial na determinação do intervalo pós-morte (BARBOSA, 2008). Há relatos também de miíases causadas por esta espécie em animais domésticos como em gatos (MADEIRA *et al.*, 1989) e cães (AZEREDO-ESPIN & MADEIRA, 1996).

A correta identificação das espécies pertencentes a este grupo é primordial para a entomologia forense e médica-veterinária. No entanto, a última revisão morfológica deste grupo na Região

Neotropical foi realizada por MELLO (1961), entretanto este autor apenas re-descreveu algumas espécies, sem levantar questionamentos filogenéticos. No caso de *Lucilia*, os resultados expostos, corroborados pelos relatos da literatura (STEVENS & WALL, 1996; KOSMANN, 2009; SANDOVAL, 2011) indicam que a variação na região *barcode* dentro deste gênero é alta (maior que 3%), sendo assim, a identificação através da região *barcode* pode ser realizada com esta ressalva.

3.5 – Gênero *Chrysomya*

As espécies que compõem este gênero originalmente eram encontradas na Ásia Oriental e Austrália (PRADO & GUIMARÃES, 1982; BAUMGARTNER, 1993). Segundo GUIMARÃES *et al.* (1979), a introdução na região Neotropical se deu através de refugiados africanos oriundos de Angola e Moçambique, porção sul da África. Atualmente, estas espécies encontram-se amplamente distribuídas e adaptadas ao ambiente criado pelo homem (GUIMARÃES *et al.*, 1979).

Os reflexos da recente introdução destas moscas podem ser observados em *C. megacephala*, na qual apenas um haplótipo de *coI* foi observado (tabela 2 e 3, figura 15). Esses dados corroboram as observações realizadas por NELSON *et al.* (2007) com amostras da Austrália, mesmo com amostras de distâncias geográficas grandes, estes autores observaram apenas um haplótipo, como é o caso deste estudo.

TAN *et al.* (2009) analisaram 2303pb correspondentes a três genes mitocondriais (*coI*, *tRNA-leu* e *coII*) e observaram 8 haplótipos únicos em 12 indivíduos amostrados em Singapura e Malásia, locais próximos ao provável ponto de origem da espécie (LAURENCE, 1981, 1986). Apesar do grande número de haplótipos, estes autores relatam que a variação dentro da região *barcode* foi de 0,33% e que a maior variabilidade tenha sido encontrada na porção restante do fragmento analisado. HARVEY *et al.* (2003) também observaram distância intraespecífica de 0,3% entre sequências coletadas na África do Sul, Zâmbia e Austrália, indicando que em locais onde esta espécie é encontrada há muitos anos, a variação intraespecífica é um pouco maior do que em locais de introdução recente.

Como já exposto anteriormente, esta espécie de muscoide é oriunda da região da Ásia e Austrália (PRADO & GUIMARÃES, 1982; BAUMGARTNER, 1993). PRINS (1979) coletou esta espécie em praias da África do Sul e sugeriu que a introdução desta mosca no sul africano também possa ter ocorrido através de embarcações vindas do Extremo Oriente, a caminho da Europa. Atualmente, esta espécie encontra-se amplamente distribuída e adaptada ao ambiente criado pelo homem (GUIMARÃES *et al.*, 1979), sendo uma das principais espécies transmissoras de patógenos e com destacada importância para a entomologia forense.

Com o objetivo de comparar a variação intraespecífica na região *barcode*, foram acrescentadas sete sequências de origens geográficas diferentes (tabela 1). Houve a observação de dois haplótipos, com distância de 0,3% entre eles, correspondendo a duas transições nas posições 268 e 353, reiterando a homogeneidade haplotípica desta espécie (figura 13 – anexo B). Acredita-se que, as condições da viagem e a chegada ao novo continente limitaram a quantidade de insetos introduzidos e haplótipos fixados.

As árvores dos genes nucleares demonstram a formação de um único agrupamento pelos dois métodos utilizados. O suporte dos ramos foi de 89% para análise de neighbor-joining e 56% pelo método de máxima verossimilhança para gene *white*, enquanto o suporte para os ramos da árvore de *EF- α 1* foi de 65% em neighbor-joining e 94% pela máxima verossimilhança (figuras 3 e 4). A variação intraespecífica entre as sequências do gene *white* foi de 2,1%, no entanto, corrobora os estudos de WARDHANA *et al.* (2012) que relatam altos valores de distância genética nesta espécie (2,3%) e em *Chrysomya bezziana* Villeneuve, 1914 (1,5 - 2,6%). Entre as sequências de *EF- α 1* estes autores observaram variação menor tanto em *C. megacephala* (0,28 – 0,55%) quanto em *C. bezziana* (0,28 – 1,60%).

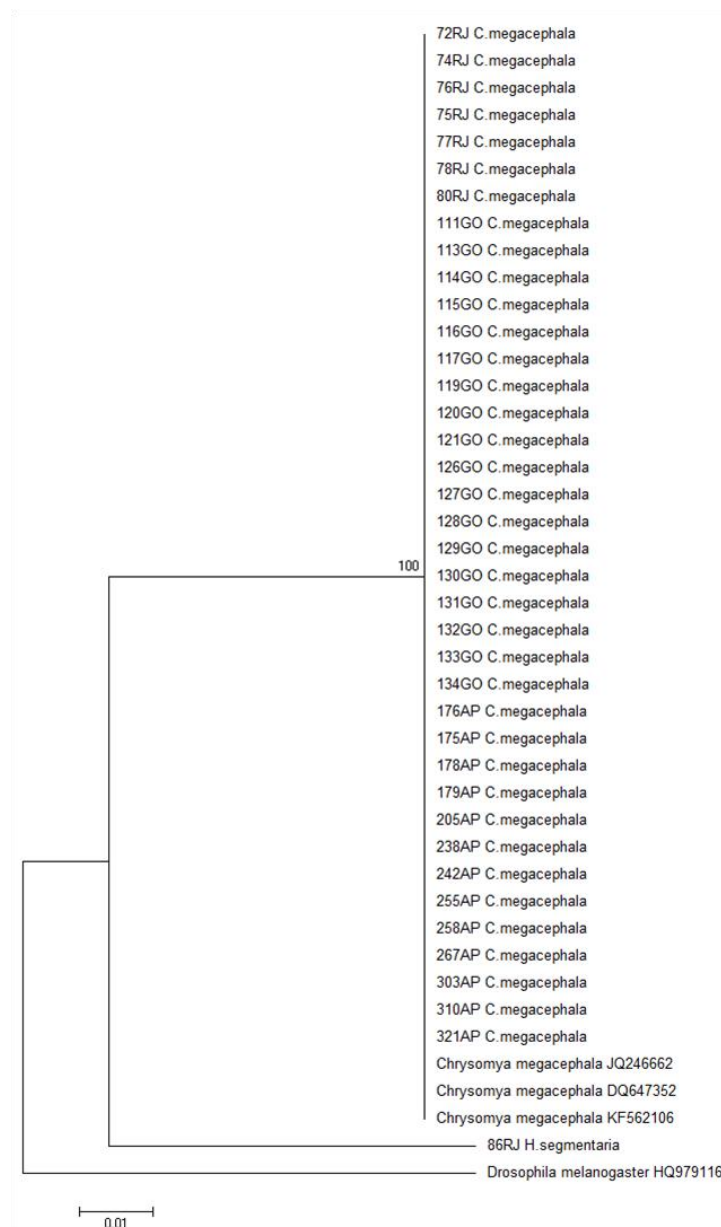


Figura 14: Árvore de distância genética construída pelo método de neighbor-joining entre as amostras de *Chrysomya megacephala*, utilizando a região *barcode* como marcador.

Como já foi dito anteriormente, foi observado um único haplótipo contendo sequências das outras espécies do gênero *Chrysomya*, tanto através do gene mitocondrial quanto dos genes nucleares (figuras 2 texto; 17 e 18 – anexo B).

Na região *barcode*, foram observados 13 haplótipos com apenas 45 sítios polimórficos. Nos dois métodos de reconstrução, houve a formação de um agrupamento contendo 84% das amostras das espécies *C. albiceps*, *C. rufifacies* e parte das amostras de *C. putoria* (figura 17 e 18 – anexo B). É importante ressaltar que faz parte deste agrupamento apenas a sequência referência de *C. albiceps* (MARINHO *et al.*, 2012 - JQ246659). A sequência referência de *C. rufifacies* (NELSON *et al.*, 2007 – DQ647359) forma um clado separado e isolado com suporte de *bootstrap* alto (93% - 98%). A sequência referência de *C. putoria* (HARVEY *et al.*, 2003 – AB112860) se agrupa com uma parte das amostras desta espécie, fora deste haplótipo comum, com suporte de 99%.

Nas árvores com os genes nucleares também foi observada a mesma topologia. Nas sequências de *EF- α* , foi observado de um agrupamento das espécies *C. rufifacies*, *C. albiceps* e *C. putoria* – parte, com suporte de 98%. No gene *white* o mesmo agrupamento foi observado (figuras 2, 3 e 4).

Uma árvore utilizando os dados (marcadores) concatenados também mostra a mesma disposição destas amostras, com suporte de 100% no ramo (figura 5 – anexo B).

As análises individuais permitem melhor visualização destas informações. Na espécie *C. albiceps* também foi observado baixa divergência genética da região *barcode* entre os espécimes, assim como em *C. megacephala*. Foram observados 6 haplótipos com apenas 7 nucleotídeos variáveis entre eles e 91,5% das amostras compartilham o haplótipo mais frequente (tabela 2; figuras 16 e 17). A distância genética média entre as amostras foi menor que 1% (média de 0,4%) (tabela 3). Nesta espécie, a distância intraespecífica foi menor do que a interespecífica (5,5 – 6,8%).

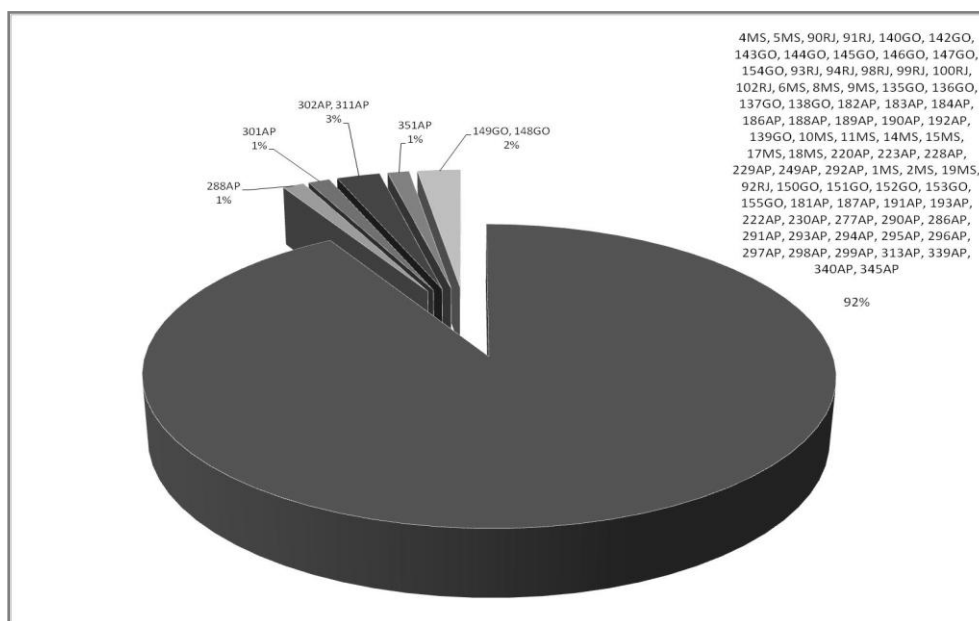


Figura 16: Gráfico com a distribuição das amostras por haplótipos de *Chrysomya albiceps*, utilizando a região *barcode* como marcador.

A baixa variação intraespecífica para esta espécie também foi observada por WELLS & SPERLING (1999) para insetos desta espécie coletados no Brasil, África do Sul e Egito, ao analisar a região que codifica para citocromo oxidase I, II e tRNA-leu. Estes autores relataram uma variação intraespecífica de 0,04 - 0,8%, com apenas nove nucleotídeos distintos entre as amostras.

DESMYTER & GOSSELIN (2009) também relataram baixa variação ao sequenciar 304pb da região *barcode* (0 - 1,3%) e ressaltaram a presença de 15 nucleotídeos diferentes ao comparar com *Phormia regina* (Meigen, 1826) e *Protophormia terranova* (Robineau-Desvoidy, 1830), duas espécies da mesma subfamília que apresentam grande importância na entomologia forense europeia.

Apesar das amostras de *C. albiceps* serem oriundas dos quatro pontos de coleta e da pequena variação existente entre elas, não foram observados agrupamentos populacionais, assim como relatado por DESMYTER & GOSSELIN (2009) para amostras provenientes da Europa (Bélgica e França), América do Sul (Brasil), Sul da África (África do Sul e Zimbábue) e Norte da África (Egito).

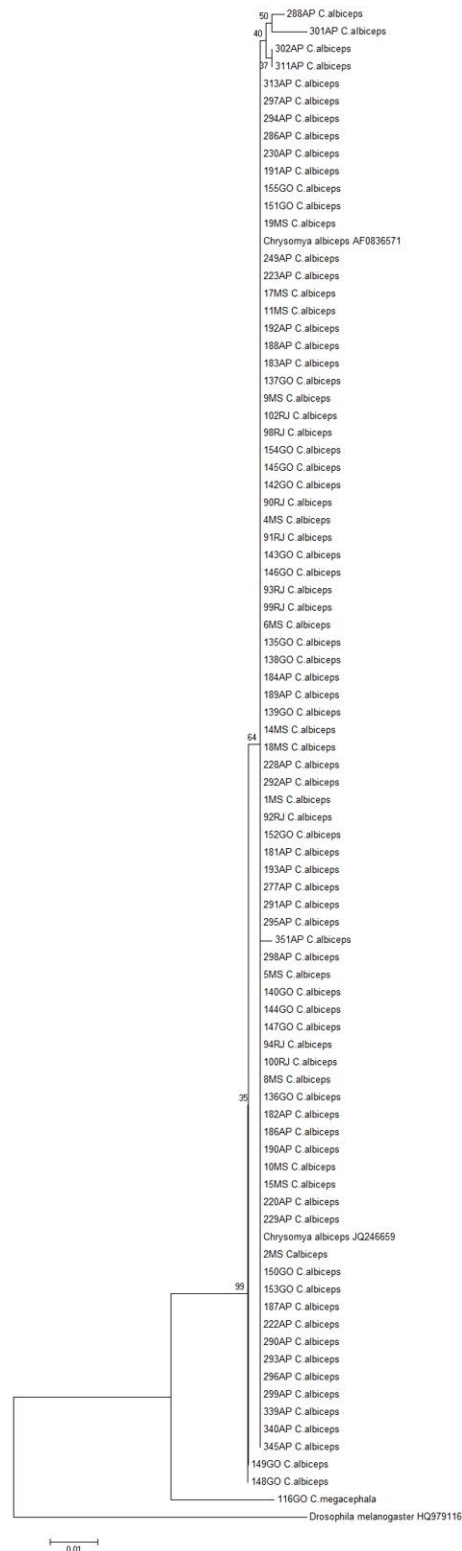


Figura 17: Árvore de distância genética construída pelo método de neighbor-joining entre as amostras de *Chrysomya albiceps*, utilizando a região *barcode* como marcador.

A baixa variação intraespecífica é comum nesta espécie, mesmo com a análise de segmentos gênicos maiores. HARVEY *et al.* (2003) estudou amostras da África do Sul e Zimbábue e relatou apenas 0,3% de variação intraespecífica no fragmento de *coI* com 1270pb, reforçando a origem comum desta espécie.

Na análise dos genes nucleares foi observada a mesma topologia com alto suporte dos ramos, para os dois genes e os dois métodos de reconstrução. Houve a formação de um clado único contendo todas as sequências desta espécie, assim como de *C. rufifacies* e parte das amostras de *C. putoria* (figuras 3 e 4).

Em *C. rufifacies*, apenas um haplótipo da região *barcode* foi observado nas amostras testadas (tabela 2 e 3, figura 18). No entanto, ao utilizar sequências depositadas no Genbank como comparação, estas se agruparam formando um ramo separado, mas com distância genética do grupo de amostras brasileiras de apenas 2,6% e suporte dos ramos alto (98% - 99%) nos dois métodos de construção de árvore. Ao comparar com *C. megacephala* utilizada como grupo externo, a distância interespecífica variou de 5,6 - 7,1% (tabela 4).

Relatos da literatura com análise do gene *coI* demonstram variabilidade intraespecífica baixa para esta espécie. NELSON *et al.* (2007) relataram baixa divergência genética entre as amostras de *C. rufifacies* da Austrália, com distância média de 0,091%. WELLS & SPERLING (1999) observaram 19 nucleotídeos diferentes em amostras desta espécie coletadas nos Estados Unidos, Austrália, Polinésia Francesa e Indonésia ao analisar a região que codifica para citocromo oxidase I, II e tRNA-leu.

TAN *et al.* (2009), analisando a região do *barcode* desta espécie, relataram 0,26% de variação intraespecífica e 6,12% de diferença interespecífica ao comparar com *C. megacephala*, valores semelhantes ao encontrado em amostras brasileiras das duas espécies (5,6% - 7%).

Chrysomya rufifacies é nativa da Australásia e Pacífico e o primeiro relato desta espécie no Brasil ocorreu estado do Maranhão, em coletas realizadas em 2010 e 2011 (SILVA *et al.*, 2012). Estes autores fizeram apenas a caracterização morfológica dos espécimes encontrados e estes espécimes compartilhavam características com as amostras coletas em Mato Grosso do Sul, utilizadas neste estudo.

Como já relatado acima, na análise dos genes nucleares, esta espécie formou um clado único com *C. putoria* e *C. albiceps*.

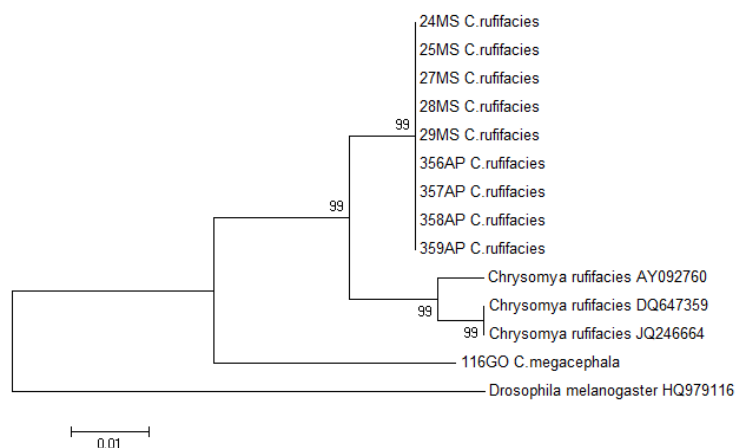


Figura 18: Árvore de distância genética construída pelo método de neighbor-joining entre as amostras de *Chrysomya rufifacies*, utilizando a região *barcode* como marcador.

A variação intraespecífica em *col* para o gênero *Chrysomya* é baixo, assim como já observado por diversos autores, em várias partes do mundo (HARVEY *et al.*, 2003; NELSON *et al.*, 2007; TAN *et al.*, 2009). No entanto, as sequências de *C. putoria* aqui estudadas apresentaram variação intraespecífica muito alta para este marcador (média de 3,7%). Os dois métodos de construção de árvore mostraram seis haplótipos organizados em três grupos, assegurados pelo suporte alto (99% por neighbor-joining e 95 - 99% por máxima verossimilhança) (tabelas 2 e 3, figura 19).

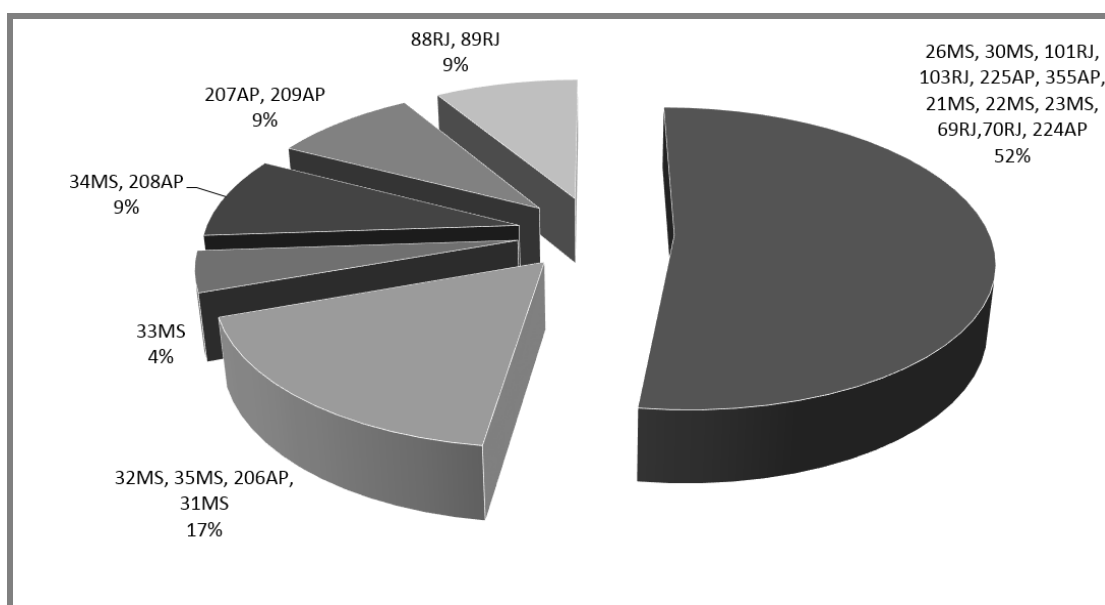


Figura 19: Gráfico com a distribuição das amostras por haplótipos de *Chrysomya putoria*, utilizando a região *barcode* como marcador.

O primeiro grupo apresentou quatro haplótipos com amostras do Mato Grosso do Sul e Amapá, com variação média de 0,2 (figura 20 – grupo A). Dois grupos apresentaram apenas um haplótipo, um deles formado por amostras do Amapá, Mato Grosso do Sul e Rio de Janeiro (figura 20 – grupo B) e o outro grupo formado por duas amostras do Rio de Janeiro (figura 20 – grupo C).

Além disso, a distância genética entre os grupos foi grande, bem maior do que o valor limite proposto por HEBERT *et al.* (2003a). A distância genética maior foi observada entre os grupos B e C (8,8%) e a menor foi entre o grupo A e B (5,7%). As amostras que compõem cada grupo apresentam origens geográficas diferentes, sendo assim, não é possível traçar uma hipótese de diferenças populacionais.

A variação desta espécie quando comparada com *C. megacephala* foi de 3,9 - 6,8%, ou seja, neste caso, a distância intraespecífica foi maior do que a variação interespecífica. Esta observação

reitera a proposta de MEYER & PAULAY (2005), que afirma que quando há a sobreposição da variação intraespecífica e interespecífica, o marcador em questão não deve ser utilizado para diferenciar esta espécie. Estes autores relatam ainda que, neste caso, a espécie pode ser polifilética e que outros marcadores precisam ser testados.

HARVEY *et al.* (2003), analisando o gene *col* inteiro, relatou variabilidade intraespecífica baixa para *C. putoria* da África (0,6%), no entanto, estes autores analisaram apenas quatro indivíduos. A amostragem pequena e apenas dois pontos de coleta podem ter influenciado nos resultados.

WELLS & SPERLING (2001) sugerem que um critério bom para a identificação de um espécime é a variação intraespecífica. Ainda segundo esses autores, um indivíduo a ser identificado, ao ser comparado com uma referência, precisa diferir desta menos que o máximo da variação intraespecífica para ser considerado pertencente a mesma espécie. Esses autores reiteram, inclusive em outros trabalhos, que a divergência intraespecífica do *col* em califorídeos é menor ou igual a 1% e entre as espécies é maior ou igual a 3% (WELLS & SPERLING, 1999).

A análise dos genes nucleares também demonstrou a mesma configuração do gene mitocondrial. Tanto na árvore do fator de alongação quanto do gene *white*, houve a formação de três grupos desta espécie. Nos dois métodos de reconstrução das sequências do fator de alongação, os conjuntos de sequências denominados grupos A e C formaram um clado separado, com suporte de ramos muito variável (34 – 96%). O grupo B forma um agrupamento único com as espécies *C. albiceps* e *C. rufifacies* sequenciadas neste estudo, bem como com as sequências referência do GenBank (FR719226 e FR719222). O mesmo foi observado para o gene *white*, com suporte dos ramos altos (acima de 75%), entretanto não existem sequências destas espécies no GenBank para comparação. Neste caso, sugere-se que uma revisão neste grupo de espécies seja realizada, utilizando outras técnicas moleculares, bem como análises morfológicas mais completas.

Como visto nas figuras 3 e 4, as sequências do fator de alongação do grupo A de *C. putoria* formaram um clado com *bootstrap* alto (96%) com a sequência referência de *Chrysomya chloropyga* (Wiedemann, 1818) (FR719224).

Chrysomya putoria foi a primeira espécie do gênero a ser relatada no Continente Americano, em 1975 no estado do Paraná (IMBIRIBA *et al.*, 1977) e dispersou-se muito rapidamente por toda a região Neotropical. Em apenas cinco anos após o primeiro relato, já era encontrada da região Norte (Belém, PA) e Sul (Porto Alegre, RS) do Brasil (PRADO & GUIMARÃES, 1982). A expansão rápida se deu devido ao ciclo de vida curto, alcance de voo grande (2-3 km por dia) e ao fato de formar populações com alta densidade (GUIMARÃES *et al.*, 1979).

No continente africano, a espécie *C. chloropyga* apresenta grande semelhança morfológica com *C. putoria*, de tal forma que foram consideradas como pertencentes a mesma espécie. PATERSON (1968) relatou barreiras ao fluxo gênico entre as duas formas, enquanto ZUMPT (1965), ao analisar a genitália, considerava as diferentes formas morfológicas de *C. putoria* apenas variantes da espécie *C. chloropyga*. Mais recentemente, WELLS *et al.* (2004) analisou uma região do gene *col* de insetos coletados na África e indicou que estas são duas entidades diferentes, ressaltando a parafilia de *C. putoria*. Convém ressaltar que os artigos que relatam a introdução desta espécie no Brasil a consideram como variante de *C. chloropyga* e na época, apenas análises morfológicas foram realizadas. KOSMANN *et al.* (2013) relata a presença de *C. chloropyga* apenas na Argentina, o que já havia sido observado anteriormente por MARILUIS (1981).

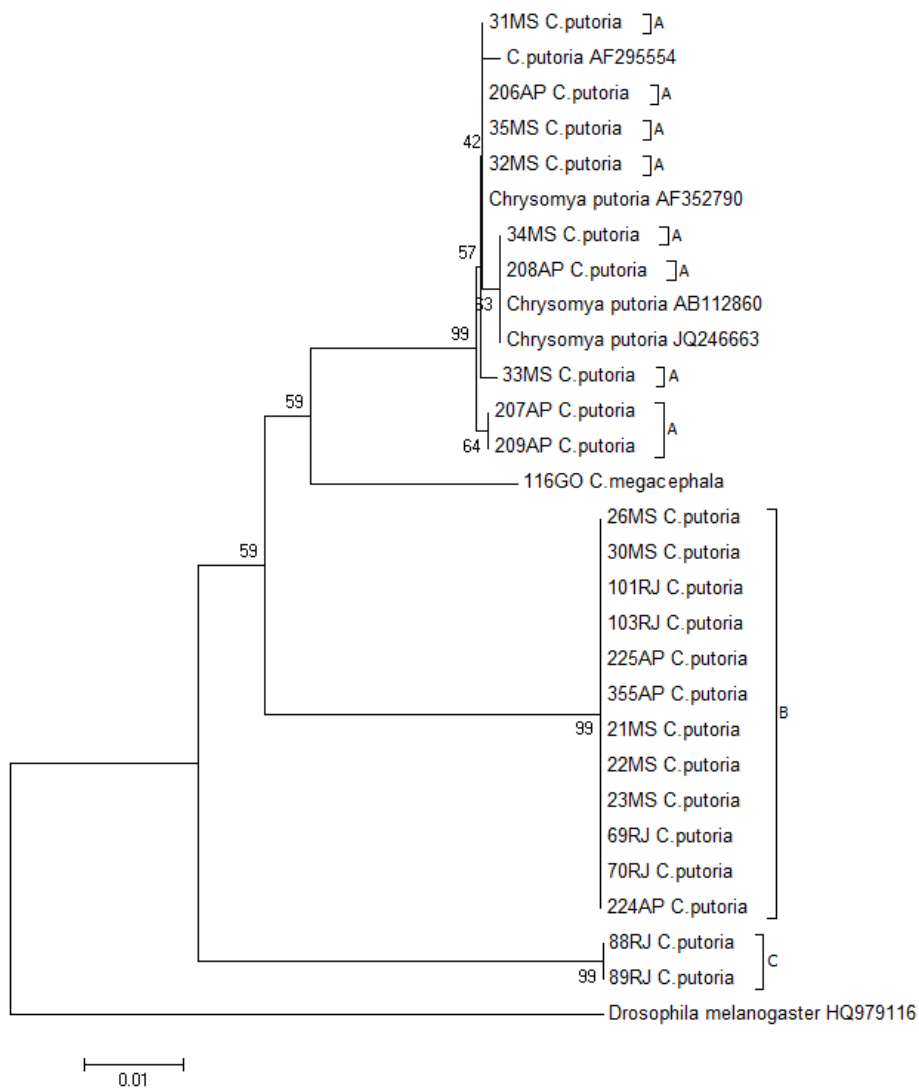


Figura 20: Árvore de distância genética construída pelo método de neighbor-joining entre as amostras de *Chrysomya putoria*, utilizando a região *barcode* como marcador.

A diferenciação morfológica entre os adultos de *C. rufifacies*, *C. albiceps* e *C. putoria* é muito sutil, além disso, estas espécies possuem aspectos biológicos e ecológicos muito semelhantes. Existem ainda dúvidas acerca da identificação correta das variantes destas espécies introduzidas no Brasil, e assim outros marcadores moleculares devem ser analisados a fim de esclarecer melhor as questões taxonômicas, bem como a realização de análises morfológicas e ecológicas.

A técnica do *barcode*, conforme proposta por HEBERT *et al.* (2003b) precisa ser utilizada de maneira criteriosa. Na maioria das espécies testadas, o valor de divergência preconizado pelo protocolo é suficiente para diferenciar as espécies, entretanto, em alguns casos, como *L. eximia* e *C. putoria*, esta determinação ainda é um pouco confusa. Em *L. eximia*, apesar do valor alto de distância intraespecífica do gene *coI*, a análise dos marcadores nucleares evidenciou a formação de um clado único. Entretanto, não foi possível sequenciar *coI* de outras espécies deste gênero para verificar a possibilidade de introgressão, assim como já observado em *L. cuprina*, no Havaí. Assim, é necessário a análise de outras espécies deste gênero que ocorrem no Brasil, em diferentes regiões geográficas para que esta questão seja completamente elucidada.

Para *C. putoria*, é possível que tenha sido detectado uma espécie críptica ou ainda a presença de *C. chloropyga* (ou uma introdução ainda não detectada) entre as amostras analisadas. A observação de grupos distintos é clara em todos os marcadores testados, bem como a distância genética entre eles.

Apesar do pequeno número de amostras em algumas espécies, acredita-se que as informações obtidas sobre a variação intraespecífica, a variação intragenérica e a comparação com outras espécies que possuem a necrofagia e saprofagia em comum, serão de intensa contribuição tanto a pesquisadores quanto a peritos criminais.

Esse estudo é incipiente no Brasil, pois reúne amostras de dípteros muscoides oriundos de regiões geográficas diferentes e, certamente, fornece um panorama acerca da diversidade genética deste grupo no Brasil.

4. Conclusões

A- A análise da região *barcode* como marcador molecular permitiu diferenciar todas as espécies nativas da região Neotropical avaliadas: *H. semidiaphana*, *H. segmentaria*, *C. idioidea* e *C. macellaria*;

B- Dentre as espécies do gênero *Chrysomya* introduzidas no Brasil, foi possível diferenciar apenas *C. megacephala* através da região *barcode*;

C- A análise da região *barcode* como marcador molecular não foi bem sucedida em diferenciar a espécie nativa *L. eximia*, sugerindo inclusive a formação de dois grupos taxonômicos, hipótese negada pela análise dos genes nucleares;

D- Os genes nucleares e a região *barcode* indicam um problema taxonômico envolvendo as espécies introduzidas *C. albiceps*, *C. rufifacies* e *C. putoria* – grupo B;

E- A espécie *C. putoria* apresentou três grupos distintos para os três marcadores analisados, sendo assim, é necessária uma revisão taxonômica nesta espécie.

5. Referências Bibliográficas

- AZEREDO-ESPIN, A. M. L.; LESSINGER, A. C. Genetic approaches for studying myiasis-causing flies: molecular markers and mitochondrial genomics. *Genetica*, v. 126, p. 111–131, 2006.
- ALLANDER, T.; EMERSON, S. U.; ENGLE, R. E.; PURCELL, R. H.; BUKH, J. A virus discovery method incorporating DNase treatment and its application to the identification of two bovine parvovirus species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 98, p. 11.609–11.614, 2001.
- ANDERSEN, G. R.; NISSEN, P.; NYBORG, J. Elongation factors in protein Biosynthesis. *Trends in Biochemical Sciences*, v. 28. p. 434-441, 2003
- AVISE, J. C.; WALKER, D. Species realities and numbers in sexual vertebrates: perspectives from an asexually transmitted genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 96, p. 992–995, 1999.
- AZEREDO-ESPIN, A. M. L.; MADEIRA, N. G. Primary myiasis in dog caused by *Phaenicia eximia* (Diptera: Calliphoridae) and preliminary mitochondria) analysis of the species in Brazil. *Journal of Medical Entomology*, v. 33, p. 839–843, 1996.
- BARBOSA, R. R. *Distribuição Temporal dos Dípteros Caliptrados em Carcaças de Porcos Domésticos no Campus da Fiocruz, Rio de Janeiro, em Duas Estações Climáticas*. Dissertação de Mestrado (Zoologia), Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2008.
- BARBOSA, R. R.; MELLO, R. P.; MELLO-PATIU, C. A.; QUEIROZ, M. M. C. New records of calyptrate dipterans (Fanniidae, Muscidae, Sarcophagidae) associated with the decomposition of domestic pigs in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104, p. 923-926, 2009.
- BARRETT, R. D. H.; HEBERT, P. D. N. Identifying spiders through DNA barcodes. *Canadian Journal of Zoology*, v. 83, p. 481–491, 2005.
- BATISTA-DA-SILVA, J. A.; MOYA-BORJA, G. E.; MELLO, R. P.; QUEIROZ, M. M. C. Abundance and richness of Calliphoridae (Diptera) of public health importance in the Tinguá Biological Reserve, Nova Iguaçu (RJ), Brazil. *Entomotópica*, v. 26, 137-142, 2011.
- BATISTELLI, N. M. *Dinâmica e variabilidade populacional em dípteros necrófagos: uma abordagem teórico-empírica*. Dissertação de Mestrado (Zoologia), UNESP, Botucatu, 2007.
- BAUMGARTNER, D. L. Review of *Chrysomya rufifacies* (Diptera: Calliphoridae). *Journal of Medical Entomology*, v. 30, p. 338-352, 1993.
- BEHURA, S. K. Molecular marker systems in insects: current trends and future avenues. *Molecular Ecology*, v. 15, p. 3087–3113, 2006.
- BENECKE, M.; WELLS, J. D. *DNA Techniques for Forensic Entomology*, p. 341 – 352. In: Byrd, J.H. & J.L. Castner (eds). *Forensic Entomology: The Utility of Arthropods in Legal Investigations*. Boca Raton. CRC Press LLC. xvii+418p. 2000.
- CARVALHO, L. M. L.; LINHARES, A. X. Seasonality of insect succession and pig carcass decomposition in a natural forest area in southeastern Brazil. *Journal of Forensic Sciences*, v. 46, p. 604-608, 2001.
- CARVALHO, C. J. B.; MELLO-PATIU, C. A. Key to the adults of the most common forensic species of Diptera in South America. *Revista Brasileira de Entomologia*, v. 52, p. 390-406, 2008.

- CARVALHO, L. M. L.; THYSEN, P. J.; LINHARES, A. X.; PALHARES, F. A. B. A Checklist of Arthropods Associated with Pig Carrion and Human Corpses in Southeastern Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 95, p. 135-138, 2000.
- CARVALHO, L. M. L.; THYSEN, P. J.; GOFF, M. L.; LINHARES, A. X. Observations on the succession patterns of necrophagous insects on a pig carcass in an urban area of southeastern Brazil. *Aggrwal's Internet Journal of Forensic Medicine and Toxicology*. v. 5, p. 33-39, 2004.
- CATERINO, M. S.; CHO, S.; SPERLING, F. A. H. The current state of insect molecular systematics: A thriving Tower of Babel. *Annual Review of Entomology*, v. 45, p. 1-54, 2000.
- CHEN, W. Y.; HUNG, T. H.; SHIAO, S. F. Molecular identification of forensically important blow fly species (Diptera: Calliphoridae) in Taiwan. *Journal of Medical Entomology*, v. 41, p. 47-57, 2004.
- CHO, Y.; MOWER, J. P.; QIU, Y. L.; PALMER, J. D. Mitochondrial substitution rates are extraordinarily elevated and variable in a genus of flowering plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 101, p. 17741-17746, 2004.
- CHO, Y.; QIU, Y. L.; KUHLMANN, P.; PALMER, J. D. Explosive invasion of plant mitochondria by a group I intron. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 95, p. 14244-14249, 1998.
- CHO, S.; MITCHELL, A.; REGIER, J. C.; MITTER, C.; POOLE, R. W.; FRIEDLANDER, T. P.; ZHAO, S. A Highly conserved nuclear gene for low-level phylogenetics: Elongation factor 1 α recovers morphology-based tree for Heliotine Moths. *Molecular Biology Evolution*, v. 12, p. 650-656, 1995.
- COX, A. J.; HEBERT, P. D. N. Colonization, extinction and phylogeographic patterning in a freshwater crustacean. *Molecular Ecology*, v. 10, p. 371-386, 2001.
- CROZIER, R.H.; CROZIER, Y.C. The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera*: complete sequence and genome organization. *Genetics*, v. 133, p. 97-117, 1993.
- D'ALMEIDA, J. M.; LOPES, H. S. Sinantropia de dípteros calípratos (Calliphoridae) no Estado do Rio de Janeiro. *Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro*, v. 6, p. 39-48, 1983.
- DANFORTH, B. N.; JI, S. Elongation Factor-1 α Occurs as Two Copies in Bees: Implications for Phylogenetic Analysis of EF-1 α Sequences in Insects. *Molecular Biology Evolution*, v. 15, p. 225-235, 1998.
- DESMYTER, S.; GOSSELIN, M. COI sequence variability between Chrysomyinae of forensic interest. *Forensic Science International: Genetics*, v. 3, 89-95, 2009.
- ELIZUR, A.; VACEK, A. T.; HOWELLS, A. J. Cloning and characterization of the *white* and *topaz* eye color genes from the sheep blowfly *Lucilia cuprina*. *Journal of Molecular Evolution*, v. 30, p. 347-358, 1990.
- ESPOSITO, M. C.; SOUSA, J. R. P.; CARVALHO-FILHO, F. S. Diversidade de Calliphoridae (Insecta: Diptera) na Base de Extração Petrolífera da Bacia do Rio Urucu, na Amazônia brasileira. *Acta Amazônica*, v. 40, p. 579-584, 2010.
- FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, v.39, p.783-791.1985.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. Embrapa-Cenargen, 220 p, 1998.
- FERREIRA, M. J. M. Sinantropia de Calliphoridae (Diptera) em Goiânia, Goiás. *Revista Brasileira de Biologia*, v. 43, p. 199-210, 1983.

- FOLMER, O.; BLACK, M.; HOEH, W.; LUTZ, R.; VRIJENHOEK, R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, v. 3, p. 294–299, 1994.
- FRESIA, P.; LYRA, M. L.; CORONADO, A.; AZEREDO-ESPIN, A. M. L. Genetic Structure and Demographic History of New World Screwworm Across Its Current Geographic Range. *Journal of Medical Entomology*, v. 48, p. 280-290, 2011.
- GARCIA, R. L.; PERKINS, H. D.; HOWELLS, A. J. The structure, sequence and developmental pattern of expression of the white gene in the blowfly *Lucilia cuprina*. *Insect Molecular Biology*, v. 5, p. 251-260, 1996.
- GREENBERG, B. *Flies and Diseases*. Vol. I: Ecology, Classification and Biotic Associations. Ed. Princeton University. 1971.
- GREENBERG B. *Flies and Diseases*. Vol. II: Biology and Diseases Transmission. Ed. Princeton University. 1973.
- GRIMALDI, D.; ENGEL, M. S. *Evolution of the Insects*. New York/Cambridge: Cambridge University Press., 2005, 755p.
- GUIMARÃES, J. H.; PAPAVARO, N. *Myiasis in Man and Animals in the Neotropical Region*. NY. Ed. Plêiade. 1999.
- GUIMARÃES, J. H.; PRADO, A. P.; BURALLI, G. M. Dispersal and distribution of three newly introduced species of *Chrysomya* R.D. (Diptera: Calliphoridae) in Brazil. *Revista Brasileira de Entomology*, v. 23, p. 245-255, 1979.
- GUO, Y.-D.; WANG, Z.-L.; YAN, W.-T.; LI, P., CAI, J.-F.; WU, L.-X. Identification of forensically important sarcophagid flies (Diptera: Sarcophagidae) in China based on COI and period gene, *International Journal of Legal Medicine*, v. 128, p. 221-228.
- HAJIBABAEI, M.; SMITH, M. A.; JANZEN, D. H.; RODRIGUEZ, J. J.; WHITFIELD, J. B.; HEBERT, P. D. N. A minimalist barcode can identify a specimen whose DNA is degraded. *Molecular Ecology Notes*, v. 6, p. 959–964, 2006.
- HAJIBABAEI, M.; SINGER, G. A. C.; HEBERT, P. D. N.; HICKEY, D. A. DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *Trends in Genetics*, v. 23, p. 167-172, 2007.
- HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. v. 41, p. 95-98, 1999.
- HAMELS, J., GALA, L., DUFOUR, S., VANNUFFEL, P., ZAMMATTEO, N.; REMACLE, J. Consensus PCR and microarray for diagnosis of the genus *Staphylococcus*, species, and methicillin resistance. *BioTechniques*, v. 31, p. 1364–1372, 2001.
- HARVEY, M. L.; DADOUR, I. R.; GAUDIERI, S. Mitochondrial DNA cytochrome oxidase I gene: potential for distinction between immature stages of some forensically important fly species (Diptera) in Western Australia. *Forensic Science International*, v. 131, p. 134-139, 2003.
- HEBERT, P. D. N.; CYWINSKA, A.; BALL, S. L.; DEWAARD, J. R. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society London B*, v. 270, p. 313-321, 2003a.
- HEBERT, P. D. N.; RATNASINGHAM, S.; DE WAARD, J. R. Barcoding animal life: cytochrome *c* oxidase subunit I divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society London B*, v. 270, p. S96-99, 2003b.
- HEBERT, P. D. N.; PENTON, E. H.; BURNS, J. M.; JANZEN, D. H.; HALLWACHS, W. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 101, p. 14812-14817, 2004a.

HEBERT, P. D. N.; STOECKLE, M. Y.; ZEMBLAK, T. S.; FRANCIS, C. M. Identification of Birds through DNA Barcodes. *Plos Biology*, v. 10, p. 1657-1663, 2004b.

HOVEMANN, B.; RICHTER, S.; WALLDORF, U.; CZIEPLUCH, C. Two genes encode related cytoplasmic elongation factors 1 alpha (EF-1 alpha) in *Drosophila melanogaster* with continuous and stage specific expression. *Nucleic Acids Research*, v. 16, p. 3175-3194, 1988.

iBOL - International Barcode of Life. Biodiversity Institute of Ontario, University of Guelph, Ontario, Canadá, 2011

IMBIRIBA, A. S.; IZUTANI, D. T.; MILHORETTO, I. T.; LUZ, E. Introdução de *Chrysomya chloropyga* (Wiedemann, 1818) na Região Neotropical (Diptera: Calliphoridae). *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, v. 20, p. 35-39, 1977.

INEA-RJ. INSTITUTO ESTADUAL DO AMBIENTE – Rio de Janeiro, <http://www.inea.rj.gov.br/Portal/index.htm>, acesso em 20 de agosto de 2014.

JONES, Y. L.; PETERS, S. M.; WELAND, C.; IVANOVA, N. V.; YANCY, H. F. Potential Use of DNA Barcodes in Regulatory Science: Identification of the U.S. Food and Drug Administration's 'Dirty 22,' Contributors to the Spread of Foodborne Pathogens, *Journal of Food Protection*, v. 76, p. 144-149.

JUNQUEIRA, A. C.; LESSINGER, A. C.; TORRES, T. T.; DA SILVA, F. R.; VETTORE, A. L.; ARRUDA, P.; AZEREDO ESPIN, A. M. The mitochondrial genome of the blowfly *Chrysomya chloropyga* (Diptera: Calliphoridae). *Gene*, v. 339, p. 7-15, 2004

KHOSO, F. N.; WONG, S. K.; CHIA, S. L.; LAU, W. H. Identification of Synanthropic flies associated with wet markets in Serdang, Selangor, Malaysia. Department of Plant Protection, University Putra Malaysia, Malaysia. 2007.

KOSMANN, C. *Código de Barras (DNA Barcode) de Dípteros de Importância Forense*. Dissertação de Mestrado (Entomologia), Universidade Federal do Paraná, 2009.

KOSMANN, C.; MELLO, R. P.; HARTERREITEN-SOUZA, E. S.; PUJOL-LUZ, J. R. A List of Current Valid Blow Fly Names (Diptera: Calliphoridae) in the Americas South of Mexico with Key to the Brazilian Species. *Entomobrasilis*, v. 6, p. 74 – 85, 2013.

KRZYWINSKI, J.; BESANSKY, N. J. Frequent intron loss in the white gene: a cautionary tale for phylogeneticists. *Molecular Biology and Evolution*, v. 19, p. 362-366, 2002.

KURAHASHI, H. *Family Calliphoridae*. In: Evenhuis, N. L. (ed) *Catalog of Diptera of the Australasian and Oceanian Regions*. Brill, Leiden, The Netherlands. 1989.

KUTTY, S. N.; PAPE, T.; PONT, A.; WIEGMANN, B. M.; MEIER, R. The Muscoidea (Diptera: Calyptratae) are paraphyletic: Evidence from four mitochondrial and four nuclear genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 49, p. 639–652, 2008.

LAURENCE, B. R. Geographical expansion range of *Chrysomya* blowflies. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 75, p. 130-131, 1981.

LAURENCE, B.R.; Old World blowflies in the New World. *Parasitology Today*, v. 2, p. 77-79, 1986.

LUNT, D. H.; ZHANG, D. X.; SZYMURA, J. M.; HEWITT, G. M. The insect cytochrome oxidase I gene: evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies. *Insect Molecular Biology*, v. 5, p. 153-165, 1996.

MACKENZIE, S. M.; BROOKER, M. R.; GILL, T. R.; COX, G. B.; HOWELLS, A. J.; EWART, G. D. Mutations in the white gene of *Drosophila melanogaster* affecting ABC transporters that determine eye colouration. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1419, p. 173-185, 1999.

- MADEIRA, N. G.; SILVEIRA, G. A. R.; PAVAN, C. The occurrence of primary myiasis in cats caused by *Phaenicia eximia* (Diptera: Calliphoridae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 84, p. 341-345, 1989.
- MALLOCH, J. R. Exotic Muscaridae (Diptera). *Annals and Magazine of Natural History*, v. 17, p. 489-510, 1926.
- MARILUIS, J.C. Clave para la identificación de los Calliphoridae de la Republica Argentina. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, v. 40, p. 27-30, 1981.
- MARINHO, M. A.; JUNQUEIRA, A. C.; PAULO, D. F.; ESPOSITO, M. C., VILLET, M. H.; AZEREDO-ESPIN, A. M. Molecular phylogenetics of Oestroidea (Diptera: Calyptratae) with emphasis on Calliphoridae: insights into the inter-familial relationships and additional evidence for paraphyly among blowflies. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 65, p. 840-854, 2012.
- MASTRANGELO, T.; FRESIA, P.; LYRA, M. L.; RODRIGUES, R. A.; AZEREDO-ESPIN, A. M. Genetic diversity and population structure of the New World screwworm fly from the Amazon region of Brazil. *Acta Tropica*, 2014 (in press).
- MCDONAGH, L. M.; STEVENS, J. R. The molecular systematics of blowflies and screwworm flies (Diptera: Calliphoridae) using 28S rRNA, COX1 and EF-1 α : insights into the evolution of dipteran parasitism. *Parasitology*, v. 138, p. 1760-1777, 2011.
- MEIER, R.; ZHANG, G. *DNA barcoding and DNA taxonomy in Diptera: An assessment based on 4,261 COI sequences for 1,001 species*. In: PAPE, T., BICKEL, D. & MEIER, R. (eds), *Diptera Diversity: Status, Challenges and Tools*. Brill, Leiden. 2009.
- MELLO, R. P. Chave para a identificação das formas adultas das espécies da família Calliphoridae (Diptera, Brachycera, Cyclorhapha) encontradas no Brasil. *Entomologia y Vectores*, v. 10, p. 255-268, 2003.
- MELLO, R. P. Contribuição ao estudo do gênero *Phaenicia* (R.D., 1863) (Diptera, Calliphoridae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 59, p. 259-278, 1961.
- MENDONÇA, P. M.; SANTOS-MALLET, J. R.; MELLO, R. P.; GOMES, L.; QUEIROZ, M. M. C. Identification of fly eggs using scanning electron microscopy for forensic investigations. *Micron* v. 39, p. 802-807, 2008.
- MENDONÇA, P. M.; SANTOS-MALLET, J. R.; QUEIROZ, M. M. C. Ultramorphological characteristics of immature stages of *Chrysomya albiceps* (Wiedemann 1819) (Diptera: Calliphoridae), a fly specie of forensic importance. *Microscopy Research and Technique*, v. 73, p. 779-784, 2010.
- MEYER, C. P.; PAULAY, G. DNA barcoding: Error rates based on comprehensive sampling. *Plos Biology*, v. 3, p. 2229-2238, 2005.
- MILLER, S. E. DNA barcoding and the Renaissance of taxonomy. *Proceedings of the Natural Academy of Science of United States of America*, v. 104, p. 4775-4776, 2007.
- MOURA, M. O.; CARVALHO, C. J. B.; MONTEIRO-FILHO, E. L. A. A Preliminary Analysis of Insects of Medico-legal Importance in Curitiba, State of Paraná. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 92, p. 269-274, 1997.
- NEI, M.; KUMAR, S. Close-Neighbor-Interchange. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York. 2000.
- NELSON, L. A.; WALLMAN, J. F.; DOWNTON, M. Using COI barcodes to identify forensically and medically important blowflies. *Medical and Veterinary Entomology*, v. 21, p. 44-52, 2007.
- NUNES, M. D. S.; DOLEZAL, M.; SCHÖTTERER, C. Extensive paternal mtDNA leakage in natural populations of *Drosophila melanogaster*. *Molecular Ecology*, v. 22, p. 2106-2117.

- OLIVEIRA-COSTA, J. *Entomologia Forense - quando os insetos são vestígios*. Campinas, 2003.
- PARALUPPI, N. D.; CASTELLÓN, E. G. Calliphoridae (Diptera) em Manaus. I. Levantamento taxonômico e sazonalidade. *Revista Brasileira de Entomologia*, v. 38, p. 661-668, 1994.
- PATERSON, H. E. H. *Evolutionary and population genetical studies of certain Diptera*. Tese de Doutorado, University of the Witwatersrand, Johannesburg, 1968.
- PRADO, A. P.; GUIMARÃES, J. H. Estado atual da dispersão e distribuição do gênero *Chrysomya* Robineau-Desvoidy na região neotropical (Diptera, Calliphoridae). *Revista Brasileira de Entomologia*, v. 26, p. 225-231, 1982.
- PRINS, A. J. Discovery of the oriental latrine fly *Chrysomya megacephala* (Fabricius) along the South Western coast of South Africa. *Annals of South African Museum*, v. 78, p. 39-47, 1979.
- RAFAEL, J. A.; AGUIAR, A. P.; AMORIM, D. S. Knowledge of insect diversity in Brazil: Challenges and Advances. *Neotropical Entomology*, v. 38, p. 565-570, 2009.
- READY, P. D.; TESTA, J. M.; WARDHANA, A. H.; AL-IZZI, M.; KHALAJ, M.; HALL, M. J.R. Phylogeography and recent emergence of the Old World screwworm fly, *Chrysomya bezziana*, based on mitochondrial and nuclear gene sequences. *Medical and Veterinary Entomology*, v. 23, p. 43-50, 2009.
- SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, v. 4, p. 406-425, 1987.
- SANDOVAL, R. C. S. Marcadores moleculares como ferramentas para a identificação de dípteros de importância forense (Calliphoridae, Muscidae). Dissertação de Mestrado (Entomologia), Universidade Federal do Paraná, 2011.
- SCHOCH, C. L.; SEIFERT, K. A.; HUHDORF, S.; ROBERT, V.; SPOUGE, J. A.; LEVESQUEB, A.; CHENB, W.; FUNGAL BARCODING CONSORTIUM. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, v. 109, p. 6241-6246, 2012.
- SCHNEIDER, H. *Métodos de análise filogenética: um guia prático*. Ribeirão Preto: Holos Editora e Sociedade Brasileira de Genética, 2003.
- SHADEL, G. S.; CLAYTON, D. A. Mitochondrial transcription initiation. Variation and conservation. *Journal of Biological Chemistry*, v. 268, p. 16083-16086, 1993.
- SILVA, J. O. A.; CARVALHO-FILHO, F. S.; ESPOSITO, M. C.; REIS, G. A. First record of *Chrysomya rufifacies* (Macquart) (Diptera, Calliphoridae) from Brazil. *Revista Brasileira de Entomologia*, v. 56, p. 115-118, 2012.
- SIMON, C.; FRATI, F.; BECKENBACK, A.; CRESPI, B.; LIU, H.; FLOOK, P. Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America*, v. 87, p. 651-701, 1994.
- SLOWINSKI, J. B.; PAGE, R. D. M. How Should Species Phylogenies Be Inferred from Sequence Data? *Systematic Biology*, v. 48, p. 814-825, 1999.
- STEVENS, J.; WALL, R. The use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis for studies of genetic variation in populations of the blowfly *Lucilia sericata* in southern England. *Bulletin of Entomological Research*, v. 85, p. 549-551, 1995.
- STEVENS, J.; WALL, R. Classification of the genus *Lucilia* (Diptera: Calliphoridae): a preliminary parsimony analysis. *Journal of Natural History*, v. 30, p. 1087-1094, 1996.
- STEVENS, J.; WALL, R. L. Genetic relationships between blowflies (Calliphoridae) of forensic importance. *Forensic Science International*, v. 120, p. 116-123, 2001.

- SINGH, B.; WELLS, J. D. Molecular Systematics of the Calliphoridae (Diptera: Oestroidea): Evidence from one mitochondrial and three nuclear genes. *Journal of Medical Entomology*, v. 50, p. 15-23, 2013.
- STEVENS, J. R.; WALL, R.; WELLS, J. D. Paraphyly in Hawaiian hybrid blowfly populations and the evolutionary history of anthropophilic species. *Insect Molecular Biology*, v. 11, p. 141-148, 2002.
- SUKONTASON, K.; PIANGJAI, S.; SIRIWATTANARUNGSEE, S.; SUKONTASON, K. L. Morphology and developmental rate of blowflies *Chrysomya megacephala* and *Chrysomya rufifacies* in Thailand: application in forensic entomology. *Parasitology Research*, v. 102, p. 1207–1216, 2008.
- TAMURA, K. The rate and pattern of nucleotide substitution in *Drosophila* mitochondrial DNA. *Molecular Biology and Evolution*, v. 9, 814-825, 1992.
- TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, v. 24, p. 1596-1599, 2007.
- TAN, S. H.; ARIS, E. M.; SURIN, J.; OMAR, B.; KURAHASHI, H.; MOHAMED, Z. Sequence variation in the cytochrome oxidase subunit I and II genes of two commonly found blow fly species, *Chrysomya megacephala* (Fabricius) and *Chrysomya rufifacies* (Macquart) (Diptera: Calliphoridae) in Malaysia. *Tropical Biomedicine*, v. 26, p. 173–181, 2009.
- TANTAWI, T.I.; GREENBERG, B. *Chrysomya albiceps* and *C. rufifacies* (Diptera: Calliphoridae): contribution to an ongoing taxonomic problem. *Journal of Medical Entomology*, v. 30, p. 646-648, 1993.
- TEARLE, R. G.; BELOTE, J. M.; MCKEOWN, M.; BAKER, B. S.; HOWELLS, A. J. Cloning and characterization of the scarlet gene of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, v. 122, p. 595-606, 1989.
- TOWNSEND, C. H. T. *Muscoid Classification and Habits, Manual of Myiology, Part II*, São Paulo, SP, 1935.
- WARD, R. D.; ZEMLAK, T. S.; INNES, B. H.; LAST, P. R.; HEBERT, P. D. N. DNA barcoding Australia's fish species *Philosophical Transaction of the Royal Society of London B Biological Sciences*, v. 360, p. 1847–1857, 2005.
- WARDHANA, A. H.; HALL, M. J. R.; MAHAMDALLIE, S. S.; MUHARSINI, S.; CAMERON, M. M.; READY, P. D. Phylogenetics of the Old World screwworm fly and its significance for planning control and monitoring invasions in Asia. *International Journal of Parasitology*, v. 42, p. 729-738, 2012.
- WELLS, J. D.; LUNT, N.; VILLET, M. H. Recent African derivation of *Chrysomya putoria* from *C. chloropyga* and mitochondrial DNA paraphyly of cytochrome oxidase subunit one in blowflies of forensic importance. *Medical and Veterinary Entomology*, v. 18, p.445-448, 2004.
- WELLS, J. D.; SPERLING, F. A. H. Molecular phylogeny of *Chrysomya albiceps* and *C. rufifacies* (Diptera: Calliphoridae). *Annals of the Entomological Society of America*, v. 36, p. 222-226, 1999.
- WELLS, J. D.; SPERLING, F. A. H. DNA-based identification of forensically important Chrysomyinae (Diptera: Calliphoridae). *Forensic Science International*, v. 120, p. 110-115, 2001.
- WELLS, J. D.; WALL, R.; STEVENS, J. R. Phylogenetic analysis of forensically important *Lucilia* flies based on cytochrome oxidase I sequence: a cautionary tale for forensic species determination. *International Journal of Legal Medicine*, v. 121, p. 229-233, 2007.
- WELLS, J. D.; STEVENS, J. R. Application of DNA-Based Methods in Forensic Entomology. *Annual Review of Entomology*, v. 53, p. 103-120, 2008.
- WOLSTENHOLME, D. R. Animal mitochondrial DNA: structure and evolution. *International Review of Cytology*, v. 141, p. 173–216, 1992.

ZACHAR, Z.; BINGHAM, P. M. Regulation of *white* locus expression: the structure of mutant alleles at the *white* locus of *Drosophila melanogaster*. *Cell*, v. 30, p. 429-441, 1982.

ZHANG, D. X.; HEWITT, G. M. Nuclear integrations: challenges for mitochondrial DNA markers. *Trends in Ecology and Evolution*, v. 11, p. 247– 251, 1996.

ZUMPT, F. *Myiasis in Man and Animals in the Old World*. London. Ed. Butterworths. 1965.

2. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo fornece contribuições importantes acerca do conhecimento da diversidade de espécies de dípteros muscoides de importância médica-veterinária e forense, através da utilização de duas técnicas modernas de identificação taxonômica.

A microscopia eletrônica de varredura permitiu a descrição de todos os estágios de desenvolvimentos dos imaturos de três espécies de muscoides pertencentes a duas famílias de destaque neste grupo. Além disso, essa técnica possibilitou a escolha de caracteres diagnósticos, ou combinação de alguns deles que diferenciam estas espécies de outras do mesmo gênero, ou ainda de outros grupos taxonômicos, que compartilham o mesmo habitat e possuem grande semelhança morfológica.

O sequenciamento da região *barcode* foi possível em mais de 200 indivíduos pertencentes a nove espécies nativas e invasoras, coletadas em quatro eco-regiões do país. Esse conhecimento será disponibilizado através do depósito das sequências em bancos de dados de acesso livre, contribuindo diretamente para o conhecimento da fauna de dípteros muscoides no Brasil. Duas outras regiões do genoma mitocondrial, fator de alongação 1 alfa e o gene *white* também foram sequenciadas pela primeira vez, em algumas espécies.

Além disso, neste estudo foi possível observar que a proposta do *barcode*, ou seja, a utilização de uma porção do gene citocromo oxidase I como marcador molecular foi bem sucedida na diferenciação de espécies de muscoides. Acredita-se que este estudo possa auxiliar pesquisadores e investigadores criminais a identificar as espécies de dípteros muscoides coletadas associadas à miíases, assim como presentes em cadáveres, através do fornecimento de caracteres específicos e de fácil aplicação.

Foi possível observar a presença de três grupos taxonômicos através da análise da região *barcode* e dos genes nucleares em *Chrysomya putoria*. Outra questão sinalizada pelas análises genéticas foi a presença de um haplótipo único compartilhado pelas espécies *C. putoria*, *C. rufifacies* e *C. albiceps*. Estas observações reforçam a necessidade de revisão dentro deste gênero.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOSDERA, M. M.; MORSY, T. A. Oral cavity myiasis in children: first demonstration in Egypt with general review. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, v. 43, p. 737-746, 2013.
- AHMAD, A.; NAGARAJA, T. G.; ZUREK, L. Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 to cattle by house flies. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 80, p. 74-81, 2007.
- ALBUQUERQUE, D. O.; PAMPLONA, D.; CARVALHO, C. B. J. Contribuição ao conhecimento dos *Fannia* R. D., 1830 da região neotropical (Diptera, Fanniidae). *Arquivos do Museu Nacional do Rio de Janeiro*, v. 56, p. 9-34, 1981.
- AMORIM, D. S. *Neotropical Diptera Diversity: Richness, patterns and perspectives*. p. 71-97. In: Pape, T.; Bickel, D. Meier, R., *Diptera Diversity: Status, challenges and tools*. Koninklijke Brill NV, Leiden. 459p. 2009.
- AMORIM, D. S.; YEATES, D. K. Pesky gnats: ridding dipteran classification of the Nematocera. *Studia Dipterologica*, v. 13, p. 3-9, 2006.
- ANDERSON, G. S. Wildlife forensic entomology: determining time of death in two illegally killed black bear cubs. *Journal of Forensic Science*, v. 44, p. 856-859, 1999.
- ASH, N.; GREENBERG, B. Developmental temperature responses of the sibling species *Phaenicia sericata* and *Phaenicia pallescens*. *Annals of the Entomological Society of America*, v. 68, p. 197 – 200, 1975.
- BALDACCHINO, F.; MUENWORN, V.; DESQUESNES, M.; DESOLI, F.; CHAROENVIRIYAPHAP, T.; DUVALLET, G. Transmission of pathogens by *Stomoxys* flies (Diptera, Muscidae): a review. *Parasite*, v. 20, p. 26-39, 2013.
- BARBOSA, R. R. *Distribuição Temporal dos Dípteros Caliptrados em Carcaças de Porcos Domésticos no Campus da Fiocruz, Rio de Janeiro, em Duas Estações Climáticas*. Dissertação de Mestrado (Zoologia), Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2008.
- BARBOSA, R. R.; MELLO R. P.; MELLO-PATIU, C. A.; QUEIROZ, M. M. C. New records of calyprate dipterans (Fanniidae, Muscidae, Sarcophagidae) associated with the decomposition of domestic pigs in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104, p. 923-926, 2009.
- BARBOSA, R. R.; MELLO-PATIU, C. A.; URURAHY-RODRIGUES, A.; BARBOSA, C. G.; QUEIROZ, M. M. C. Temporal distribution of ten calyprate dipteran species of medicolegal importance in Rio de Janeiro, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 105, p. 191-198, 2010.
- BARRETO, M.; BURBANO, M. E.; BARRETO, P. Flies (Calliphoridae, Muscidae) and Beetles (Silphidae) from Human Cadavers in Cali, Colombia. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 97, p. 137-138, 2002.

- BARROS, A. T. M.; VAZQUEZ, S. A. S. Recomendações para Prevenção e Controle de Bicheiras em Bezerros no Pantanal. *Comunicado Técnico da Embrapa*, v. 35, 2004.
- BAUMGARTNER, D. L.; GREENBERG, B. The genus *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) in the new world. *Journal of Medical Entomology*, v. 21, p. 105-113, 1984.
- BEHURA, S. K. Molecular Marker Systems in Insects: Current Trends and Future Avenues. *Molecular Ecology*, v. 15, p. 3087-3113, 2006.
- BENECKE, M.; JOSEPHI, E.; ZWEIHOFF, R. Neglect of Elderly: Forensic Entomology Cases and Considerations. *Forensic Science International*, v. 165, p. 195-199, 2004.
- BOEHME, P.; AMENDT, J.; ZEHNER, R. The use of COI barcodes for molecular identification of forensically important fly species in Germany. *Parasitology Research*, v. 110, p. 2325-2332, 2012.
- BOUREL, B.; CALLET, B.; HÉDOUIN, V.; GOSSET, D. Flies Eggs: a New Method for the Estimation of Short-term Post-mortem Interval? *Forensic Science International*, v. 135, p. 27-34, 2003.
- BUTLER, J. F.; GARCIA-MARUNIAK, A.; MEEK, F.; MARUNIAK, J. E. Wild Florida House Flies (*Musca domestica*) as Carriers of Pathogenic Bacteria. *Florida Entomologist*, v. 93, p. 218-223, 2010.
- BYRD, J. H.; CASTNER, J. L. *Forensic Entomology: The Utility of Arthropods in Legal Investigations*. CRC Press, Boca Raton, USA. 2001.
- CAETANO, R. L. *Distribuição temporal de dípteros caliptrados (insecta, diptera) coletados em carcaças de Sus scrofa Linnaeus, 1758 no campus da Fiocruz, RJ, nas estações da primavera e outono*. Dissertação de Mestrado (Biodiversidade e Saúde), Fundação Oswaldo Cruz, 2012.
- CAMPOBASSO, P. C.; GHERARDI, M.; CALIGARA, M.; SIRONI, L.; INTONA, F. Drug Analysis in Blowfly Larvae and in Human Tissues: a Comparative Study. *International Journal of Legal Medicine*, v. 118, p. 210-214, 2004.
- CARVALHO, C. J. B. *Muscidae (Diptera) of the Neotropical Region: Taxonomy*. UFPR, Curitiba. 2002.
- CARVALHO, C. J. B.; MELLO-PATIU, C. A. Key to the adults of the most common forensic species of Diptera in South America. *Revista Brasileira de Entomologia*, v. 52, p. 390-406, 2008.
- CARVALHO, C. J. B.; MOURA, M. O.; RIBEIRO, P. B. Chave para adultos de dípteros (Muscidae, Fanniidae, Anthomyiidae) associados ao ambiente humano no Brasil. *Revista Brasileira de Entomologia*, v. 46, n. 2, p. 107-114, 2002.
- CARVALHO, C. J. B.; RAFAEL, J. A.; COURI, M. S.; SILVA, V. C. *Diptera*, p. 702-744. In: RAFAEL, J. A.; MELO, G. A. R.; CARVALHO, C. J. B.; CASARI, S. A.; CONSTANTINO, R. *Insetos do Brasil: Diversidade e Taxonomia*. Ed. Holos. 810p, 2012.
- CARVALHO, C. J. B.; RIBEIRO, P. B. Chave de identificação das espécies de Calliphoridae (Diptera) do sul do Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 9, p. 169-173, 2000.
- CARVALHO, L. M. L.; THYSEN, P. J.; LINHARES, A. X.; PALHARES, F. A. B. A Checklist of Arthropods Associated with Pig Carrion and Human Corpses in Southeastern Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 95, p. 135-138, 2000.

- CARVALHO, L. M. L.; LINHARES, A. X. Seasonality of insect succession and pig carcass decomposition in a natural forest area in southeastern Brazil. *Journal of Forensic Sciences*, v. 46, p. 604-608, 2001.
- CARVALHO, L. M. L.; LINHARES, A. X.; TRIGO, J. R. Determination of Drugs Levels and the Effect of Diazepam on the Growth of Necrophagous Flies of Forensic Importance in Southeastern Brazil. *Forensic Science International*, v. 120, p. 140-144, 2001.
- CARVALHO, L. S. *Redescrição das larvas de terceiro instar de cinco espécies de dípteros califorídeos (Insecta: Diptera) de importância para a Entomologia Forense*. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Universidade de Brasília, 67p., 2006.
- CATTS, E. P.; GOFF, M. L. Forensic entomology in criminal investigations. *Annual Review of Entomology*, v. 37, p. 253-272, 1992.
- CRAMER-RIBEIRO, B. C.; SANAVRIA, A.; OLIVEIRA, M. Q.; SOUZA, F. S.; ROCCO, F. S.; CARDOSO, P. G. Inquérito sobre os casos de miíase por *Cochliomyia hominivorax* em cães da zona sul do município do Rio de Janeiro no ano 2000. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 39, p. 171-175, 2002.
- D'ALMEIDA, J. M.; LOPES, H. S. Sinantropia em dípteros caliptrados (Calliphoridae) no Estado do Rio de Janeiro. *Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro*, v. 6, p. 39-48, 1983.
- DEAR, J. P. A Revision of the New World Chrysomyini (Diptera: Calliphoridae). *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 3, p. 109-169, 1985.
- DENNO, R. F.; COTHRAN, W. R. Competitive interactions and ecological strategies of Sarcophagid and Calliphorid flies inhabiting rabbit carrion. *Annals of the Entomological Society of America*, v. 69, p. 109-113, 1976.
- DUARTE, E. R.; ROCHA, F. T.; TEIXEIRA, L. M.; SILVA, R. B.; NOGUEIRA, F. A.; SILVA, N. O.; ALMEIDA, A. C. Occurrence and treatment of cutaneous myiasis in sheep reared in semi-arid conditions in northern Minas Gerais. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 32, p. 490-494, 2012.
- EARLY, M.; GOFF, M. L. Arthropod succession patterns in exposed carrion on the island of O'ahu, Hawaiian Islands, USA. *Journal of Medical Entomology*, v. 23, p. 520-531, 1986.
- ERZINCIOGLU, Y. Z. The value of chorionic structure and size in the diagnosis of blowfly eggs. *Medical and Veterinary Entomology*, v. 3, p. 281-285, 1989.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. Embrapa-Cenargen, 3ª Edição, 220p., 1998.
- FERREIRA, M. J. M. Sinantropia de Calliphoridae (Diptera) em Goiânia, Goiás. *Revista Brasileira de Biologia*, v. 43, p. 199-210, 1983.
- FERREIRA, M. J. M.; LACERDA, P. V. Muscoides sinantrópicos associados ao lixo urbano de Goiânia-GO. *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 10, p. 185-195, 1993.
- FERREIRA, M. J. M.; SANTOS, B. B.; CUNHA, H. I. Flutuação populacional de algumas espécies de Calliphoridae em pomar de Goiânia, Goiás, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 12, p. 557-562, 1995.

- FLOREZ, E.; WOLFF, M. Descripción y Clave de los Estadios Inmaduros de las Principales Especies de Calliphoridae (Diptera) de Importancia Forense en Colombia. *Neotropical Entomology*, v. 38, p. 418-429, 2009.
- GETACHEW, S.; GEBRE-MICHAEL, T.; ERKO, B.; BALKEW, M.; MEDHIN, G. Non-biting cyclorrhaphan flies (Diptera) as carriers of intestinal human parasites in slum areas of Addis Ababa, Ethiopia. *Acta Tropica*, v. 103, p. 186-194, 2007.
- GOFF, M. L.; LORD, W. D. Entomotoxicology: a new area for forensic investigations. *American Journal of Forensic and Medical and Pathology*, v. 15, p. 51-57, 1994.
- GOFF, M. L.; OMORI, A. I.; GOODBROD, J. R. Effect of cocaine in tissues on the development rate of *Boettcherisca peregrina* (Diptera: Sarcophagidae). *Journal of Medical Entomology*, v. 26, p. 91-93, 1989.
- GOMES, A.; KOLLER, W. W.; BARROS, T. M. Sazonalidade da mosca-varejeira *Cochliomyia macellaria* (Diptera, Calliphoridae), na região do Cerrado, Campo Grande, MS. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 9, p. 125-128, 2000.
- GREENBERG, B. *Flies and Diseases*. Vol. I: Ecology, Classification and Biotic Associations. NJ. Ed. Princeton University. 1971.
- GREENBERG, B.; SINGH, D. Species identification of calliphorid (Diptera) eggs. *Journal of Medical Entomology*, v. 32, p. 21-26, 1995.
- GREENBERG, B.; SZYSKA, M. L. Immature stages and biology of fifteen species of Peruvian Calliphoridae (Diptera). *Annals of the Entomological Society of America*, v. 77, p. 488-517, 1984.
- GRIMALDI, D.; ENGEL, M. S. *Evolution of the Insects*. New York/Cambridge: Cambridge University Press., 2005, 755p.
- GRISI, L.; MASSARD, C. L.; MOYA-BORJA, G. E.; PEREIRA, J. B. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. *A Hora Veterinária*, v. 21, p. 8-10, 2002.
- GUIMARÃES, J. H.; PAPAVARO, N. *Myiasis in Man and Animals in the Neotropical Region*. NY. Ed. Plêiade. 1999.
- GUIMARÃES, J. H.; PRADO, A. P.; BURALLI, G. M. Dispersal and distribution of three newly introduced species of *Chrysomya* R.D. (Diptera: Calliphoridae) in Brazil. *Revista Brasileira de Entomologia*, v. 23, p. 245-255, 1979.
- GULLAN, P.J.; CRANSTON, P. S. *Insect Systematics: Phylogeny and Classification*. In: *The Insects: An outline of Entomology*. London, p.189-222, 2008.
- HALL, M.; WALL, M. Myiasis of humans and domestic animals. *Advances in Parasitology*, v. 35, p.258-333, 1995.
- HEBERT, P. D. N.; CYWINSKA, A.; BALL, S. L.; DEWAARD, J. R. Biological Identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, v. 270, p. 313-321, 2003.
- INTONA, F.; CAMPOBASSO, C. P.; GOFF, M. L. Entomotoxicology. *Forensic Science International*, v. 15, p. 42-47, 2001.
- JIRÓN, L. F.; CARTÍN, V. M. Insect succession in the decomposition of a mammal in Costa Rica. *Journal of the New York Entomological Society*, v. 89, p. 158-165, 1981.

- JOHNSON, G.; PANELLA, N.; HALE, K.; KOMAR, N. Detection of West Nile virus in stable flies (Diptera: Muscidae) parasitizing juvenile American white pelicans. *Journal of Medical Entomology*, v. 47, p. 1205-1211, 2010.
- KAMAL, A. S. Comparative study of thirteen species of sarcosaprophagous Calliphoridae and Sarcophagidae (Diptera): Bionomics. *Annals of the Entomological Society of America*, v. 51, p. 261-270, 1958.
- KASHYAP, V. P.; PILLAI, V. V. Efficacy of entomological method in estimation of postmortem interval: a comparative analysis. *Forensic Science International*, v. 40, p. 245-250, 1989.
- KEH, B. Scope and applications of Forensic Entomology. *Annual Review of Entomology*, v. 30, p. 137-154, 1985.
- KITCHING, R. L. The immature stages of the Old-World screw-worm fly, *Chrysomya bezziana* Velleneuve, with comparative notes on other Australasian species of *Chrysomya*. *Bulletin of Entomological Research*, v. 66, p. 195-203, 1976.
- KOBAYASHI, M.; SASAKI, T.; SAITO, N.; TAMURA, K.; SUZUKI, K.; WATANABE, H.; AGUI, N. Houseflies: not simple mechanical vectors of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *American Journal of Tropical and Medical Hygiene*, v. 61, p. 625-629, 1999.
- KOSMANN, C.; MACEDO, M. P.; BARBOSA, T. A. F.; PUJOL-LUZ, J. R. *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) and *Hemilucilia segmentaria* (Fabricius) (Diptera, Calliphoridae) used to estimate the postmortem interval in a forensic case in Minas Gerais, Brazil. *Revista Brasileira de Entomologia*, v. 55, p. 621-623, 2011.
- KURAHASHI, H. Probable origin of a synanthropic fly, *Chrysomya megacephala*, in New Guinea (Diptera: Calliphoridae). *Monographs in Biology*, v. 42, p. 689-698, 1982.
- LINHARES, A. X. Sinanthropy of calliphoridae and Sarcophagidae (Diptera) in the city of Campinas, São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira de Entomologia*, v. 25; p. 189-215, 1981.
- LIU, D.; GREENBERG, B. Immature stages of some flies of forensic importance. *Annals of the Entomological Society of America*, v. 82, p. 80-93, 1989.
- LORD, W. D.; STEVENSON, J. R. *Directory of forensic entomologists*. Washington, DC, American Registry of Professional Entomology, 1986, p. 42.
- MALDONADO, M. A.; CENTENO, N. Quantifying the potential pathogens transmission of the blowflies (Diptera: Calliphoridae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 98, p. 213-216, 2003.
- MARCHENKO, M. I. Characteristic of development of the fly *Chrysomya albiceps* (Wd.) (Diptera: Calliphoridae). *Entomologiceskoe Obozrenie*, v. 64, p. 79-84, 1985.
- MARINHO, C. R.; BARBOSA, L. S.; AZEVEDO, A. C. G.; QUEIROZ, M. M. C.; VALGODE, M. A.; AGUIAR-COELHO, V. M. *Hemilucilia segmentaria* (Fabricius, 1805) (Diptera: Calliphoridae) as new biological vector of eggs of *Dermatobia hominis* (Linnaeus Jr., 1781) (Diptera: Oestridae) in Reserva Biológica do Tinguá, Rio de Janeiro, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 98, p. 937-938, 2003.
- MEIER, R. G.; ZHANG, G. *DNA barcoding and DNA taxonomy: an assessment based on 4261 COI sequences for 1001 species*. In: *Diptera Diversity: Status, Challenges and Tools*; edited by T. Pape, D. Bickel & R. Meier. Brill Academic Publishers. 2009.

- MELLO, R. P. Chave para identificação das formas adultas das espécies da família Calliphoridae (Diptera, Brachycera, Cyclorhapha) Encontradas no Brasil. *Entomologia y Vectores*, v. 10, p. 255-268, 2003.
- MENDONÇA, P. M.; SANTOS-MALLET, J. R.; MELLO, R. P.; GOMES, L.; QUEIROZ, M. M. C. Identification of fly eggs using scanning electron microscopy for forensic investigations. *Micron* v. 39, p. 802-807, 2008.
- MENDONÇA, P. M.; SANTOS-MALLET, J. R.; QUEIROZ, M. M. C. Ultramorphological characteristics of immature stages of *Chrysomya albiceps* (Wiedemann 1819) (Diptera: Calliphoridae), a fly specie of forensic importance. *Microscopy Research and Technique*, v. 73, p. 779-784, 2010.
- MENDONÇA, P. M.; SANTOS-MALLET, J. R.; QUEIROZ, M. M. C. Ultrastructure of immature stages of the blowfly *Chrysomya putoria* (Wiedemann, 1818) (Diptera: Calliphoridae). *Microscopy Research and Technique*, v. 75, p. 206-211, 2012a.
- MENDONÇA, P. M.; SANTOS-MALLET, J. R.; QUEIROZ, M. M. C. Ultrastructure of larvae and puparia of the blowfly *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae). *Microscopy Research and Technique*, v. 75, p. 935-939, 2012b.
- MENDONÇA, P. M.; BARBOSA, R. R.; CORTINHAS, L. B.; SANTOS-MALLET, J. R.; QUEIROZ, M. M. C. Ultrastructure of immature stages of *Peckia* (Euboettcheria) *collusor* (Diptera: Sarcophagidae). *Acta Tropica*, v. 128, p. 522-527, 2013.
- MENDONÇA, P. M.; BARBOSA, R. R.; CARRIÇO, C.; CORTINHAS, L. B.; SANTOS-MALLET, J. R.; QUEIROZ, M. M. C. Ultrastructure of immature stages of *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae) using scanning electron microscopy. *Acta Tropica*, v. 136, p. 123-128, 2014a.
- MENDONÇA, P. M.; BARBOSA, R. R.; CORTINHAS, L. B.; SANTOS-MALLET, J. R.; QUEIROZ, M. M. C. Ultrastructure of immature stages of *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae), a fly of medical and veterinary importance. *Parasitology Research*, doi: 10.1007/s00436-014-4032-4, 2014b
- MILLER, S. E. DNA barcoding and the Renaissance of taxonomy. *Proceedings of the Natural Academy of Science of USA*, v. 104, p. 4775-4776, 2007.
- MISRA, N.; GOGRI, P.; MISRA, S.; SINGH, A.; INGALE, A. Orbital myiasis caused by green bottle fly. *Australasian Medicine Journal*, v. 31, p. 504-506, 2013.
- MONTEIRO-FILHO, E. K. L. A.; PENEREIRO, J. L. Estudo da decomposição e sucessão sobre uma carcaça animal numa área do estado de São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira de Biologia*, v. 47, p. 289-295, 1987.
- MOURA, M. O.; CARVALHO, C. J. B.; MONTEIRO-FILHO, E. L. A. A Preliminary analysis of insects of medico-legal importance in Curitiba, State of Paraná. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 92, p. 269-274, 1997.
- MOREIRA-LIMA, M. A.; MOYA-BORJA, G. E. Estudo comparativo de miíases por *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel, 1858) e *Lucilia cuprina* (Wiedmann, 1830) (Diptera: Calliphoridae) em ovinos artificialmente infestados. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v. 19, p. 200-205, 1997.
- NASCIMENTO, E. M. F.; OLIVEIRA, J. B.; PAES, M. J.; LOBO, A. P.; SILVA, A. L. A.; JÚNIOR, E. R. S.; LEAL, J. L. F.; MOYA-BORJA, G. E. Miíases humanas por *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel, 1858) (Diptera, Calliphoridae) em hospitais públicos na cidade do Recife, Pernambuco, Brasil. *Entomologia y Vectores*, v. 12, p. 37-51, 2005.

- NELSON, L. A.; WALLMAN, J. F.; DOWNTON, M. Using COI barcodes to identify forensically and medically important blowflies. *Medical and Veterinary Entomology*, v. 21, p. 44–52, 2007.
- NORRIS, K. R. The Bionomics of Blowflies. *Annual Review of Entomology*, v. 10, p. 47-68, 1965.
- NUORTEVA, P. Synanthropy of blowflies (Dipt. Calliphoridae) in Finland. *Annales Entomologici Fennici*, v. 29, p. 1-49, 1963.
- OLIVA, A. Insectos de interés forense de Buenos Aires (Argentina). Primeira lista ilustrada y dados bionomicos. *Revista del Museo Argentino Ciencias Naturales “Bernardino Rivadavia”*, v. 7, p. 13-59, 1997.
- OLIVEIRA, H. G.; GOMES, G.; MORLIN, J. J.; VON ZUBEN, C. J.; LINHARES, A. X. The Effect of Buscopan[®] on the Development of the Blow Fly *Chrysomya megacephala* (F.) (Diptera: Calliphoridae). *Journal of Forensic Science*, v. 54, p. 202-206, 2009.
- OLIVEIRA, T. C.; VASCONCELOS, S. D. Insects (Diptera) associated with cadavers at the Institute of Legal Medicine in Pernambuco, Brazil: Implications for forensic entomology. *Forensic Science International*, v. 198, p. 97-102, 2010.
- OLIVEIRA, V. C.; D'ALMEIDA, J. M.; ABALÉM-DE-SÁ, I. V.; MANDARINO, J. R.; SOLARI, C. A. Enterobactérias associadas a adultos de *Musca domestica* (Linnaeus, 1758) (Diptera: Muscidae) e *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1754) (Diptera: Calliphoridae) no Jardim Zoológico, Rio de Janeiro. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 58, p. 556-561, 2006.
- OLIVEIRA-COSTA, J. Entomologia Forense - quando os insetos são vestígios. 1ª Edição, Campinas, SP. Millenium Editora. 2003.
- OLIVEIRA-COSTA, J. Entomologia Forense - quando os insetos são vestígios. 2ª Edição, Campinas, SP. Millenium Editora. 2007.
- OLIVEIRA-COSTA, J.; MELLO-PATIU, C. A.; LOPES, S. M. Dípteros muscoides associados com cadáveres humanos no local da morte no estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Boletim do Museu Nacional* 464: p.16-19, 2001.
- OLIVEIRA-COSTA, J.; MENDONÇA, P. M.; QUEIROZ, M. M. C. Laboratório de Entomologia Forense: Montagem e Procedimentos de Rotina e Pesquisa. In: Insetos “Peritos”: A Entomologia Forense no Brasil. Campinas, SP. Millennium Editora. 2013
- OLSEN, A. R. Regulatory action criteria for filth and other extraneous materials. III. Review of flies and foodborne enteric disease. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. 28, p. 199-211, 1998.
- PAPE, T. Catalogue of the Sarcophagidae of the World (Insecta: Diptera). *Memoirs of Entomology International*, v. 8, p. 1-558, 1996.
- PARALUPPI, N. D.; VASCONCELOS, J. C.; AQUINO, J. S.; CASTELLÓN, E. G.; SILVA, M. S. B. C. Calliphoridae (Diptera) in Manaus: IV Bacteria isolated from blowflies collected in street markets. *Acta Amazonica*, v. 26, p. 93-96, 1996.
- PAYNE, J. A. A summer carrion of the baby pig *Sus scrofa* Linnaeus. *Ecology*, v. 46, p. 592-602, 1965.

- PRADO, A. P.; GUIMARÃES, J. H. Estado atual da dispersão e distribuição do gênero *Chrysomya* Robineau-Desvoidy na região neotropical (Diptera, Calliphoridae). *Revista Brasileira de Entomologia*, v. 26, p. 225-231, 1982.
- PUJOL-LUZ, J. R.; FRANCEZ, P. A. C.; URURAHY-RODRIGUES, A.; CONSTANTINO, R. The Black Soldier-fly, *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae), used to estimate the postmortem interval in a case in Amapá State, Brazil. *Journal of Forensic Science*, v. 53, p. 476-478, 2006.
- QUEIROZ, M. M. C.; MELLO, R. P.; LIMA, M. M. Morphological aspects of the larval instars of *Chrysomya albiceps* (Diptera: Calliphoridae) reared in the laboratory. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 92, p. 187-196, 1997.
- RAFAEL, J. A.; AGUIAR, A. P.; AMORIM, D. S. Knowledge of insect diversity in Brazil: Challenges and Advances. *Neotropical Entomology*, v. 38, p. 565-570, 2009.
- RAMARAJ, P.; SELVAKUMAR, C.; GANESH, A.; JANARTHANAN, S. Report on the occurrence of synanthropic derived form of *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae) from Royapuram fishing harbour, Chennai, Tamil Nadu, India. *Biodiversity Data Journal* 2: e1111 doi: 10.3897/BDJ.2.e1111, 2014.
- REY, L. Bases da Parasitologia Médica. 3ª Edição, Guanabara-Koogan, 2010, 420p.
- SALVIANO, R. J. B.; MELLO, R. P.; BECK, L. C. N. H., FERREIRA, A. Calliphoridae (Diptera) associated with human corpses in Rio de Janeiro, RJ, Brazil. *Entomologia y Vectores*, v. 3, p. 145-146, 1996.
- SALVIANO, R. J. B.; MELLO, R. P.; SANTOS, R. F. S.; BECK, L. C. N. H.; FERREIRA, A. Ocorrência de dípteros caliptrados em cadáver humano. [Apresentação no XX Congresso Brasileiro de Zoologia; 1994. Rio de Janeiro, RJ].
- SANDOVAL, R. C. S. *Marcadores moleculares como ferramentas para a identificação de dípteros de importância forense (Calliphoridae, Muscidae)*. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 56p. 2011.
- SCHROEDER, H.; KLOTZBACH, H.; ELIAS, S.; AUGUSTIN, C.; PUESCHEL, K. Use of PCR-RFLP for differentiation of Calliphoridae larvae (Diptera: Calliphoridae) on human corpses. *Forensic Science International*, v. 132, p. 76-78, 2003.
- SERRA-FREIRE, N. M.; MELLO, R. P. *Entomologia & Acarologia na Medicina Veterinária*. Rio de Janeiro. LF Livros. 2006.
- SILVA, J. O. A.; CARVALHO-FILHO, F. S.; ESPOSITO, M. C.; REIS, G. A. First record of *Chrysomya rufifacies* (Macquart) (Diptera, Calliphoridae) from Brazil. *Revista Brasileira de Entomologia*, v. 56, p. 115-118, 2012.
- SIMON, C.; FRATI, F.; BECKENBACH, A.; CRESPI, B.; LIU, H.; FLOOK, P. Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America*, v. 87, p. 651-670, 1994.
- SMITH, K. G. V. *A Manual of Forensic Entomology*, British Museum (Natural History). London. Ed. Cornell University. 1986.

- SOUZA, A. M. *Sucessão entomológica na decomposição de carcaça animal, com ênfase nas famílias Calliphoridae e Sarcophagidae (Diptera)*. Dissertação de Mestrado, Unicamp, Campinas. 1994.
- SOUZA, F. L. S.; SOUZA, C. W. O.; HIPOLITO, M.; BALDASSI, L.; MARTINS, M. L. Cases of buccal myiasis in the bullfrog (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802), with larvae of *Notochaeta* sp. Aldrich, 1916 (Diptera: Sarcophagidae) in São Paulo, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 84, p. 517–518, 1990.
- STEVENS, J.; WALL, R. L. Genetic relationships between blowflies (Calliphoridae) of forensic importance. *Forensic Science International*, v. 120, p. 116-123, 2001.
- SUKONTASON, K.; SUKONTASON, K. L.; BOONCHU, N.; CHAIWONG, T.; PIANGJAI, S. Ultrastructure of eggshell of *Chrysomya nigripes* Aubertin (Diptera: Calliphoridae). *Parasitology Research*, v. 93, p.151-154, 2004.
- SUKONTASON, K. L.; NARONGCHAI, P.; KANCHAI, C.; VICHAIKAT, K.; PIANGJAI, S.; BOONSRIWONG, W.; SRIPAKDEE, D.; CHAIWONG, T.; KUNTALUE, B.; SIRIWATTANARUNGSEE, S.; SUKONTASON, K. Morphological comparison between *Chrysomya rufifacies* (Macquart) and *Chrysomya villeneuvei* Patton (Diptera: Calliphoridae) puparia, forensically important blow flies. *Forensic Science International*, v. 164, p. 230-234, 2006.
- SUKONTASON, K. L.; NARONGCHAL, P.; SRIPAKDEE, D.; BOONCHU, N.; CHAIWONG, T.; NGERNKLUN, R.; PIANGJAI, S.; SUKONTASON, K. First report of human myiasis caused by *Chrysomya megacephala* and *Chrysomya rufifacies* (Diptera: Calliphoridae) in Thailand, and its implication in forensic entomology. *Journal of Medical Entomology*, v. 42, p. 702-704, 2005.
- THOMPSON, F. C. *The Diptera site*. The biosystematic database of world Diptera. Nomenclator status statistics. Version 10.5 www.sl.barc.usda.gov/diptera/names/Status/bdwdstat.htm Acesso em maio 2014, 2008.
- THYSSEN, P. J. Decomposição e sucessão entomológica em carcaças de suínos de tamanhos diferentes: estudos em ambiente de mata natural, na região de Campinas, SP. Dissertação de Mestrado (Parasitologia). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP. 2000.
- THYSSEN, P. J. Caracterização de formas imaturas e determinação das exigências térmicas de duas espécies de califorídeos (Diptera) de importância forense. Tese de Doutorado (Parasitologia). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP. 2005.
- THYSSEN, P. J.; LINHARES, A. X. First description of the immature stages of *Hemilucilia segmentaria* (Diptera: Calliphoridae). *Biological Research*, v. 40, p. 271-280, 2007.
- THYSSEN, P. J.; NASSU, M. P.; COSTELLA, A. M.; COSTELLA, M. L. Record of oral myiasis by *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae): case evidencing negligence in the treatment of incapable. *Parasitology Research*, v. 111, p. 957-959, 2012.
- TWNEND, C. Sheep strike and mulesing. *Parasitology Today*, v. 11, p. 252-261, 1987.
- UMECHE, N.; MANDAH, L. E. *Musca domestica* as a carrier of intestinal helminthes in Calabar, Nigeria. *East African Medicine Journal*, v. 66, p. 349-352, 1989.
- VAIRO, K. P. Sarcophagidae (Diptera) de potencial interesse forense de Curitiba, Paraná: chave pictórica para as espécies e morfologia dos estágios imaturos de *Sarcodexia lambens* (Wiedemann). Dissertação de Mestrado (Entomologia), Universidade Federal do Paraná, 2011.

- VASCONCELOS, S. D.; CRUZ, T. M.; SALGADO, R. L.; THYSSEN, P. J. Dipterans Associated with a Decomposing Animal Carcass in a Rainforest Fragment in Brazil: Notes on the Early Arrival and Colonization by Necrophagous Species. *Journal of Insect Science*, v. 13, p. 1-11, 2013.
- WALLMAN, J. F.; DONNELLAN, S. C. The utility of mitochondrial DNA sequence for the identification of forensically important blowflies (Diptera: Calliphoridae) in Southeastern Australia. *Forensic Science International*, v. 120, p. 60-67, 2001.
- WELLS, J. D.; SPERLING, F. A. H. Molecular Phylogeny of *Chrysomya albiceps* and *C. rufifacies* (Diptera: Calliphoridae). *Journal of Medical Entomology*, v. 36, p. 222-226, 1999.
- WELLS, J. D.; SPERLING, F. A. H. DNA-base identification of forensically important Chrysomyinae (Diptera: Calliphoridae). *Forensic Science International*, v. 120, p. 110-115, 2001.
- WELLS, J. D.; STEVENS, J. R. Application of DNA-based methods in Forensic Entomology. *Annual Review of Entomology*, 53, p. 103-120, 2008.
- WELLS, J. D.; WALL, R.; STEVENS, J. R. Phylogenetic analysis of forensically important *Lucilia* flies based on cytochrome oxidase I sequence: a cautionary tale for forensic species determination. *International Journal of Legal Medicine*, v. 121, p. 229–233, 2007.
- WIEGMANN, B. M.; TRAUTWEIN, M. D.; WINKLER, I. S.; BARR, N. B.; KIM, J. W.; LAMBKIN, C.; BERTONE, M. A.; CASSEL, B. K.; BAYLESS, K. M.; HEIMBERG, A. M.; WHEELER, B. M.; PETERSON, K. J.; PAPE, T.; SINCLAIR, B. J.; SKEVINGTON, J. H.; BLAGODEROV, V.; CARAVAS, J.; KUTTY, S. N.; SCHMIDT-OTT, U.; KAMPMEIER, G. E.; THOMPSON, F. C.; GRIMALDI, D. A.; BECKENBACH, A. T.; COURTNEY, G. W.; FRIEDRICH, M.; MEIER, R.; YEATES, D. K. Episodic radiations in the fly tree of life. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 108, p. 5690-5695, 2011.
- YEATES, D. K.; WIEGMANN, B. M.; COURTNEY, G. W.; MEIER, R.; LAMBKIN, C.; PAPE, T. Phylogeny and systematics of Diptera: Two decades of progress and prospects. *Zootaxa*, v. 1668, p. 565–590, 2007.
- ZUMPT, F. Myiasis in Man and Animals in the Old World. London. Ed. Butterworths. 1965.

4. ANEXOS