



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE – CCBS
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

JOSÉ HUGO DO RÊGO SILVA

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE DÍPTEROS IMATUROS ASSOCIADOS A
CADÁVERES NO ESTADO DA PARAÍBA**

**CAMPINA GRANDE
2015**

JOSÉ HUGO DO RÊGO SILVA

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE DÍPTEROS IMATUROS ASSOCIADOS A
CADÁVERES NO ESTADO DA PARAÍBA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Estadual da Paraíba, em cumprimento às exigências para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Simone Silva dos Santos Lopes.

**CAMPINA GRANDE
2015**

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação.

S586i Silva, José Hugo do Rêgo.
Identificação molecular de dípteros imaturos associados a cadáveres no estado da Paraíba [manuscrito] / José Hugo do Rêgo Silva. - 2015.
55 p. : il. color.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2015.

"Orientação: Profa. Dra. Simone Silva dos Santos Lopes, Departamento de Biologia".

1. Entomologia Forense. 2. DNA Mitocondrial. 3. Chrysomya albiceps. 4. Cochliomyia macellaria. I. Título.

21. ed. CDD 576

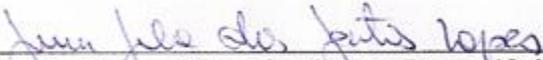
JOSÉ HUGO DO RÊGO SILVA

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE DÍPTEROS IMATUROS ASSOCIADOS A
CADÁVERES NO ESTADO DA PARAÍBA**

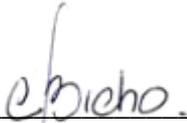
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Estadual da Paraíba, em cumprimento às exigências para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

APROVADO EM 09 / 09 / 2015

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr.^a Simone Silva dos Santos Lopes (Orientadora)
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)


Prof. Dr. Valdir de Queiroz Balbino
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)


Prof.^a Dr.^a Carla de Lima Bicho
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

Eis o meu primeiro passo ao futuro, à progressão, por um bem comum, e que seja esta a primeira memória de meu ingresso àquilo que me dedicarei para o resto da vida... [A Ciência].

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq e a Universidade Federal de Pernambuco, por contribuir no estímulo desta pesquisa.

Ao Núcleo de Medicina e Odontologia Legal de Campina Grande e ao Ilmo. Dr. Humberto Jorge de Araújo Pontes, por ceder a coleta das larvas necessárias ao desenvolvimento deste trabalho.

Ao Laboratório de Bioinformática e Biologia Evolutiva (LABBE) da UFPE, por contribuir na ajuda teórica e prática nas etapas deste trabalho.

Ao Laboratório de Genética e Biologia Molecular da UEPB, local o qual foi realizado a maior parte deste trabalho.

À UEPB, por me fazer superar todas as dificuldades à uma formação verdadeiramente Biólogo.

Ao professor Dr. Valdir, por me fornecer os subsídios necessários para um trabalho de qualidade, e por, junto à Bárbara, confiar-nos juntos o sucesso deste trabalho.

À professora Dr^a. Simone Lopes, por me abrir as portas da Genética, por me acolher como uma amiga íntima e cuidadosa, e pela confiança nos trabalhos a mim desempenhado. Sempre citarei seu nome e sua magnífica experiência no esforço ao aprendizado e futuro dos seus orientandos.

À professora Dr^a. Carla Bicho por me abrir as portas da Ciência Forense, por ter me mostrado que a vida acadêmica só é proveitosa quando fazemos por amor, com toda força e dedicação, e pelo apoio ao meu ingresso na Genética.

Às técnicas que tanto amo, Renata Leandro e Patrícia Rocha, pela forte amizade, pelos laços dentro e fora do complexo Três Marias, e por sempre me apoiarem nas dificuldades e no nunca desistir.

Aos funcionários da UEPB, em especial Edilma, pela presteza, alegria, diversão e atendimento sempre quando precisei.

A Deus, por transformar um jovem crente e cego em um adulto de mente expandida. Por me mostrar ao longo de quatro anos que se pode crescer dez. Por não desistir de mim e por me confiar melhorias à sociedade. Longe e desprovido de religião, me fez ter fé plena nas suas obras. Obrigado por mostrar neste meio tempo que o amor é minha religião.

À minha família pelo estímulo, pela paciência, compreensão, por me inserirem sem poupar esforços no universo da graduação, em especial aos meus pais, que juntos me

ensinaram o dom do caráter, da competência, do zelo, e do amar com todas as forças algo que tanto me dedico – a Biologia. Amo vocês!

Aos meus colegas de laboratório da UEPB, que contribuíram ao longo de meses por meio de auxílios, debates, alegrias e festas. Em especial à Nathalya Carvalho, que me acompanhou até as últimas, ajudando e descontraindo sempre que necessário.

Aos colegas de classe antigos e aos que persistiram até o final – Rebeca Kianny, Graciele Barros, Fernanda Silva, Hayanne Araújo, pelos momentos de amizade e apoio, e especialmente a Laís Barros, como confidente e amiga, e que, até o fim, fez desses quatro longos anos da minha vida acadêmica e pessoal algo realmente inesquecível e marcante. Junto a ela, meus agradecimentos também à professora Dr^a. Márcia Adelino, que sejamos sempre esse aglomerado de risos e alegria.

A todos do passado e presente que contribuíram e contribuem no avanço da Ciência e da Genética. Já dizia Paulo Freire que todo amanhã se cria num ontem, através de um hoje e que temos de saber o que fomos para saber o que seremos, que seja então este trabalho um fruto produtivo graças ao passado, que agora presente garantirá melhorias para o futuro da sociedade, da Genética e da Ciência.

“ A tarefa não é ver o que ninguém viu ainda, mas pensar aquilo que ninguém pensou a respeito daquilo que todo mundo vê. ”

Arthur Schopenhauer

RESUMO

A Entomologia Forense é útil nas investigações criminais ao utilizar-se de insetos e outros artrópodes na identificação do intervalo pós-morte (IPM). É por meio da análise da idade do inseto que a estimativa do IPM mínimo pode ser alcançada, sendo a correta identificação da espécie uma etapa crucial. A utilização de marcadores moleculares é uma abordagem alternativa frente às dificuldades na identificação de dípteros imaturos por meio de caracteres morfológicos. A região do DNA mitocondrial chamada de Citocromo C Oxidase Subunidade I, ou apenas pela abreviatura COI, é o marcador mais utilizado para esse fim. O presente estudo objetivou identificar espécies de dípteros imaturos com potencial forense utilizando a região *BARCODE* do COI. Os espécimes foram coletados de três cadáveres no Núcleo de Medicina e Odontologia Legal (NUMOL) do Estado da Paraíba. As amplificações foram realizadas com *primers* específicos já descritos na literatura para a porção final do COI, que corresponde à região do DNA *BARCODE*. Foram identificadas duas espécies de importância forense pertencentes a família Calliphoridae: *Cochliomyia macellaria* (Fabricius, 1775) e *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819). As sequências foram confirmadas por BLASTn como pertencentes às espécies correspondentes. Os modelos utilizados para a construção das árvores filogenéticas foram o Kimura 2 parâmetros (K2P) e o Tamura-Nei. Por meio da análise por Neighbour-Joining, foi possível constatar a região *BARCODE* do COI como uma ferramenta que permite resolução suficiente na caracterização molecular de espécies de Diptera, suportando os indivíduos de cada espécie em grupos monofiléticos. As análises de divergência genética dos subgrupos populacionais de *C. macellaria* coletados nos diferentes cadáveres mostraram relevantes índices de polimorfismos nas sequências dessa espécie, possivelmente decorrentes do processo natural de diferenciação genética entre subpopulações, sobretudo ao se tratar de uma espécie nativa. A identificação mediante a utilização da sequência COI surge como apreciável alternativa à taxonomia convencional, permitindo uma rápida e acurada identificação a nível de espécie de califorídeos imaturos.

Palavras-Chave: DNA Mitocondrial. Citocromo Oxidase. *Chrysomya albiceps*. *Cochliomyia macellaria*.

ABSTRACT

The Forensic Entomology is useful in criminal investigations to use on insects and other arthropods in identifying the postmortem interval (PMI). It is through the insect's age analysis to estimate the minimum PMI can be achieved, being the correct identification of the species a crucial stage. The use of molecular markers is an alternative the face of difficulties in identifying immature flies by morphological characters. The region of DNA called the mitochondrial Cytochrome C Oxidase Subunit I, or just the abbreviation COI, is the most widely used marker for this purpose. This study aimed to identify species of immature flies with forensic potential using the COI Standard BARCODE region. The specimens were collected of three bodies in Medicine and Forensic Dentistry Center (NUMOL) the State of Paraíba. The amplicons were performed with specific primers described in the literature for the final portion of the COI, which corresponds to the DNA BARCODE region. Were identified two species of forensic importance belonging to the family Calliphoridae: *Cochliomyia macellaria* (Fabricius, 1775) and *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819). The sequences were confirmed by BLASTn as belonging to the matching species. The models used for the construction of phylogenetic trees were the Kimura 2-parameter (K2P) and the Tamura-Nei. Through analysis by Neighbour-Joining, it was established the COI BARCODE region as a tool that allows sufficient resolution in the molecular characterization of species of Diptera, supporting individuals of each species in monophyletic groups. Analysis of genetic diversity of subpopulations of *C. macellaria* collected in different bodies showed polymorphisms relevant indexes in the sequences of this species, possibly due to the natural process of genetic differentiation between subpopulations, particularly when it is a native species. The identification by using the COI sequence appears as appreciable alternative to conventional taxonomy, allowing a rapid and accurate identification at the species level of immature blowflies.

Keywords: Mitochondrial DNA. Cytochrome Oxidase. *Chrysomya albiceps*. *Cochliomyia macellaria*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Árvore filogenética molecular combinada para a ordem Diptera e a maioria de suas famílias.....	21
Figura 2	– Mostruário da diversidade da ordem Diptera.....	22
Figura 3	– Indivíduos adultos das espécies <i>Calliphora loewi</i> (A), <i>Chrysomya albiceps</i> (B), <i>Phaenicia sericata</i> (C) e <i>Chrysomya megacephala</i> (D) pertencentes à família Calliphoridae e de importância forense.....	22
Figura 4	– Representação de <i>Cochliomyia macellaria</i> em três estágios de seu desenvolvimento. Indivíduo adulto (a), forma imatura (b) e pupário (c).....	23
Figura 5	– Método de corte dos espécimes coletados no estudo (A) e maceração por pistilo dos segmentos excisados.....	31
Figura 6	– Eletroforese em gel de agarose (1,0%), corado com brometo de etídio, de <i>amplicons</i> resultantes da PCR.....	34
Figura 7	– Sequências nucleotídicas pós alinhamento do gene COI de <i>C. macellaria</i> e <i>C. albiceps</i> (CG2_1R e CG2_5) dos três corpos coletados no NUMOL de Campina Grande, PB.....	35
Figura 8	– Topologia determinada por Neighbor-Joining pelo modelo Kimura 2 parâmetros resultante do alinhamento múltiplo das sequências consenso da região do Citocromo C Oxidase Subunidade I (COI).....	37
Figura 9	– Topologia determinada por Neighbor-Joining e pelo modelo Tamura-Nei resultante do alinhamento múltiplo das sequências consenso da região do Citocromo C Oxidase Subunidade I (COI).....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Relação das localidades e respectivas datas de coleta dos imaturos.....	30
Tabela 2 –	Iniciadores utilizados na reação de PCR e sequenciamento.....	31
Tabela 2 –	Substituições de nucleotídeos encontradas nas sequências COI das espécies identificadas.....	36
Tabela 3 –	Análise molecular dos polimorfismos nas populações de <i>Cochliomyia macellaria</i> provenientes dos três cadáveres do NUMOL de Campina Grande, PB.....	39
Tabela 5 –	Frequência haplotípica das populações de <i>Cochliomyia macellaria</i> provenientes dos três cadáveres do NUMOL de Campina Grande, PB.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BLAST	Ferramenta de Pesquisa em Alinhamento Local Básico
COI	Citocromo C Oxidase Subunidade I
COII	Citocromo C Oxidase Subunidade II
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNAsp	Programa de análises de polimorfismos em sequências de DNA
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
GenBank	Banco de Dados Online de Nucleotídeos do NCBI
GDA	Cálculo do Grau-Dia Acumulado
IPM	Intervalo Pós-Morte
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
JTT	Modelo Jones-Taylor-Thornton
K2P	Kimura 2 parâmetros
L1	Primeiro instar larval
L2	Segundo instar larval
L3	Terceiro instar larval
mM	mM
MiliMol	MiliMol
MEGA 6	MEGA 6
Muscle	Programa para geração de alinhamentos múltiplos
mtDNA	Ácido desoxirribonucleico mitocondrial
NUMOL	Núcleo de Medicina e Odontologia Legal
ng	Nanograma
NCBI	Centro Nacional de Informação Biotecnológica
NJ	Algoritmo Neighbor-Joining
PCR	Reação em Cadeira da Polimerase
pH	Potencial Hidrogeniônico
TBE	Tris/Borato/EDTA
UPGMA	Método de agrupamento de pares não ponderadas
UEPB	Universidade Estadual da Paraíba
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco

LISTA DE SÍMBOLOS

™ Trade Mark

ng NanoGrama

nm NanoMol

μL Micro Litro

kb Quilo Base

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	17
2.1	Objetivo geral	17
2.2	Objetivos específicos	17
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	18
3.1	Entomologia Forense	18
3.2	A ordem Diptera e a família Calliphoridae	20
3.3	O DNA como ferramenta útil na identificação de imaturos – Uma nova abordagem à Entomologia Forense	23
3.4	O DNA mitocondrial e a região <i>BARCODE</i> do citocromo c oxidase na identificação molecular	24
3.5	Filogenia molecular	26
4	METODOLOGIA	30
4.1	Local de estudo	30
4.2	Amostragem	30
4.3	Crerios de inclusão e exclusão	30
4.4	Extração do DNA	31
4.5	Amplificação do DNA	31
4.6	Sequenciamento do DNA e análise dos dados	32
4.7	Comitê de ética e permissão para coleta	33
5	RESULTADOS	34
5.1	Extração, amplificação, sequenciamento e alinhamento dos nucleotídeos	34
5.2	Construção das árvores filogenéticas	36
5.3	Análise de variabilidade genética intrapopulacional	38
6	DISCUSSÃO	42
7	CONCLUSÃO	46
	REFERÊNCIAS	47
	APÊNDICE A – Concentração e pureza total dos nucleotídeos	56
	ANEXO A – Permissão para coleta de material biológico	57
	ANEXO B – Cromatogramas e suas respectivas mutações	58
	ANEXO C – Cromatogramas e suas respectivas mutações	61

1 INTRODUÇÃO

A Entomologia Forense compreende o estudo dos insetos e outros artrópodes nas investigações de âmbito cível e criminalístico, associado também a outros procedimentos legais (BYRD; CASTNER, 2010). Na medicina-legal, essa ciência pode ser aplicada em investigações envolvendo tráfico de entorpecentes, maus tratos ou mesmo morte violenta (FRANÇA, 2005; OLIVEIRA-COSTA, 2011).

No que diz respeito aos casos em que houve morte violenta, os insetos podem ser úteis nas investigações ao contribuir nos esclarecimentos quanto à identidade do morto, como se deu a morte, o lugar onde ocorreu, a causa, se foi natural, acidental ou criminal, e, principalmente, na estimativa do Intervalo Pós-Morte (IPM), que compreende o intervalo de tempo entre a data do óbito e a data em que o corpo foi encontrado (WOLFF et al., 2001; OLIVEIRA-COSTA, 2011).

A análise da idade do inseto é a fonte que permite ao entomologista forense as estimativas do IPM mínimo. A averiguação do instar larval pode ser verificada por meio de hidrocarbonetos cuticulares, tamanho do imaturo ou pela análise das fendas espiraculares, características estas dependentes da identificação correta da espécie (ZHU et al., 2006; ZHU et al., 2007; OLIVEIRA-COSTA, 2011).

Mesmo sendo um instrumento útil em investigações criminais, o uso da Entomologia Forense na identificação de dípteros imaturos é dificultada no tocante às suas características morfológicas, mesmo para taxonomistas bem treinados, já que na fase larval estas são muito semelhantes, carecendo de maiores caracteres diagnósticos (THYSSEN et al., 2005; THYSSEN, 2008; WELLS; STEVENS, 2007). Não obstante, se faz necessário a criação dos espécimes em laboratório, necessitando de dietas específicas e mantidos vivos até alcançarem a fase adulta, o que requer maior tempo para identificação, algo de extrema importância no âmbito jurídico (LIU; GREENBERG, 1989; THYSSEN et al., 2005).

Alternativamente aos estudos tradicionais, os quais são pautados em caracteres morfológicos e etiológicos, os marcadores moleculares surgem como uma apreciável alternativa, úteis em estudos de caracterização de variabilidade genética e diagnóstico espécie-específico em insetos (SPERLING et al., 1994; OTRANTO; STEVENS, 2002).

As ferramentas moleculares são descritas como um método eficaz na identificação de espécies especialmente devido à agilidade em que se obtém os resultados na identificação de indivíduos em qualquer estágio de vida, incluindo estágios imaturos, e em qualquer condição de preservação. Além do mais, a informação proveniente da utilização das ferramentas

moleculares pode diminuir os erros ou dificuldades na identificação. Todas essas vantagens podem assim direcionar a investigação criminal (JUNQUEIRA et al., 2002; OTRANTO; STEVENS, 2002; THYSSEN et al., 2005; THYSSEN et al., 2008; OLIVEIRA-COSTA, 2011).

A região específica do DNA mitocondrial, chamada de Citocromo C Oxidase Subunidade I, ou apenas pela abreviatura COI, é o marcador molecular mais utilizado devido à sua organização genômica simples e uniforme, bem como a falta de recombinação e a presença de elevadas taxas de substituições nucleotídicas. O fragmento chamado de DNA *BARCODE*, é a região do COI proposta para identificação de eucariontes. Vale salientar também a sua utilidade pela capacidade de recuperação de informações gênicas de amostras em estados avançados de decomposição ou preservação inadequada (ZHANG; HEWITT, 1997; HEBERT; GREGORY, 2005).

São poucos os trabalhos pautados nas principais famílias de dípteros de importância forense na região Nordeste (ALVES et al., 2014a), e se tratando de aplicações da Biologia Molecular na Entomologia Forense, os estudos são ainda mais escassos para essa região, especialmente na Paraíba, sendo este estudo pioneiro para esse Estado.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Identificar espécies de dípteros imaturos com potencial forense coletados em cadáveres no Núcleo de Medicina e Odontologia Legal (NUMOL) do Estado da Paraíba, utilizando a região *BARCODE* do Citocromo C Oxidase Subunidade I (COI) pertencente ao DNA mitocondrial e validar sua eficácia como ferramenta útil em investigações criminais.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar o levantamento de espécies oriundas de cadáveres no Estado da Paraíba utilizando marcador molecular.
- Amplificar e sequenciar a região *BARCODE* do COI de imaturos utilizando iniciadores de sequências universais já calibrados e presentes na literatura.
- Verificar a eficácia da região *BARCODE* na identificação das espécies através das sequências obtidas.
- Caracterizar a diversidade intrapopulacional das espécies encontradas nos cadáveres
- Comparar os dados obtidos por meio das análises moleculares com dados taxonômicos provenientes na literatura para o estado da Paraíba e região.

3.FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Entomologia Forense

Os estudos com insetos e sua aplicabilidade relacionados a questões criminais é um ramo da Ciência com relatos antigos que datam da China do século XIX, até trabalhos mais próximos ocorridos em 1850, por Bergeret (GENNARD, 2007; BENECKE, 2008). Mas foi nas últimas décadas do século XX que tais estudos obtiveram progressos, tornando-se suficientemente úteis bem como aplicáveis a questões jurídicas e em procedimentos legais em diversos países. Tal área de conhecimentos é chamada de Entomologia Forense (CATTS; GOFF, 1992; OLIVEIRA-COSTA, 2011).

A Tanatologia Médico-Legal é a parte da Medicina Legal responsável por estudar a morte e suas repercussões na esfera jurídico-social. É neste âmbito que entra o conceito de Tanatocronodiagnose, Cronotanatognose ou ainda Diagnóstico Cronológico da Morte, o qual é o espaço de tempo verificado em diversas fases do cadáver e o momento que se verificou o óbito, em que, quanto maior for o espaço, mais dificultosa é a perícia (FRANÇA, 2005).

A razão básica para a utilização de insetos em investigações criminais reside no fato de que os insetos de importância forense são os primeiros a detectar e vir ao encontro de um cadáver, já que, minutos após a morte, atraídas pelo odor da decomposição, utilizam o substrato como sítio de cópula, fonte proteica e estímulo a oviposição, estando presentes em todos os estágios de decomposição. Assim, a medida que passa o tempo de morte, mais aplicável é a estimativa pelo uso de insetos (CARVALHO et al., 2000; CAMPOBASSO et al., 2001; FRANÇA, 2005; OLIVEIRA-COSTA, 2011).

Há várias aplicabilidades fornecidas pela Entomologia Forense os quais são direcionadas as seguintes indagações: maus tratos a crianças e incapazes; uso de entorpecentes, com base na identificação dos insetos acompanhantes da droga; se a morte foi violenta ou natural, ao detectar, por exemplo, a presença de larvas em ferimentos; como a morte ocorreu, já que o estado do cadáver pode afetar a velocidade da decomposição e a fauna cadavérica envolvida; onde a morte ocorreu, ao detectar deslocamento do cadáver pela presença de insetos endêmicos; quando a morte se deu, utilizando de estimativas do intervalo pós morte; e sequestro e crime sexual, ao identificar, por exemplo, criminosos por métodos moleculares graças ao sangue ingerido por insetos hematófagas (CROSBY et al., 1986; SMITH, 1986; REPOGLE et al., 1994; BENECKE; LESSIG, 2001; BENECKE et al., 2004; OLIVEIRA-COSTA, 2011).

Contudo, quando confrontados com a tarefa de estimar um intervalo temporal desde a morte ao encontro do corpo, há geralmente dois pontos existentes ao Entomologista Forense: O tempo em que o corpo foi encontrado e a última vez que o indivíduo provavelmente esteve vivo (AMENDT et al., 2010).

A estimativa do IPM pelo método entomológico, bem como o cálculo do Grau-Dia Acumulado (GDA), visa a estabelecer o período mínimo e máximo de tempo entre a morte e a data em que o corpo foi encontrado, ou, pelo menos, entre o momento em que o corpo foi exposto aos primeiros grupos de insetos e a sua descoberta. Isso se dá através do período de atividade em que o inseto está presente no cadáver, sabendo que não será precisamente determinado o momento da morte (KEH, 1985; CATTS; GOFF, 1992; AMENDT et al., 2010; OLIVEIRA-COSTA, 2011).

Benecke (2008) ressalva que uma vez que são artrópodes, o maior grupo biológico e mais diversificado da terra, eles podem ser encontrados em uma ampla variedade de locais incluindo cenas de crime. De tal maneira, pode-se abrir uma ampla gama de aplicações em investigações, através do inquérito de insetos recuperados em cenas de crime e em cadáveres.

Smith (1986) reconhece quatro categorias ecológicas, já que nem todo inseto se alimentar diretamente da carcaça, São elas:

- Espécies necrófagas: as quais se alimentam diretamente da carcaça, constituindo a categoria mais importante a estabelecer o momento da morte. Por exemplo, Diptera (moscas): Calliphoridae, Sarcophagidae, Faniidae, Muscidae; Coleoptera (besouros): Cleridae, Dermestidae, Silphidae (em parte);
- Predadores e parasitos (predam e parasitam as espécies necrófagas): constitui a segunda categoria forense de maior importância, por exemplo, Coleoptera: Silphidae (em parte), Staphylinidae; como também da ordem Diptera: alguns representantes se tornam predadores em instares mais tarde, por exemplo, Chrysomya (Calliphoridae), Ophyra e Hydrotaea (Muscidae).
- Onívoros: os insetos que se alimentam tanto do cadáver quanto de seus habitantes; Exemplos: as vespas, formigas e alguns coleópteros.
- Espécies adventícias ou acidentais: usam o cadáver como uma extensão do seu ambiente, muitas vezes como abrigo. Por exemplo, Collembola (colêmbolos) e aranhas (estes podem tornar-se predadores acidentais).

Os primeiros estudos de Entomologia Forense no Brasil iniciaram-se com os trabalhos pioneiros de Edgard Roquette Pinto e Oscar Freire, nos Estados do Rio de Janeiro e da Bahia em 1908 e 1914-1923, respectivamente (PUJOL-LUZ et al., 2008; OLIVEIRA-COSTA, 2011).

3.2 A ordem Diptera e a família Calliphoridae

A ordem Diptera é uma das quatro ordens megadiversas de insetos, em que seus representantes verdadeiros são cosmopolitas, com cerca de 153 mil espécies descritas em 160 famílias (figura 1). Para a região Neotropical, estima-se que mais de 31 mil espécies em 118 famílias sejam reconhecidas (CARVALHO et al., 2012).

Essa ordem é uma das maiores de insetos em termos de abundância de indivíduos e de espécies em quase todo o globo terrestre. A maioria dos seus representantes consiste em insetos relativamente pequenos e de corpo mole, e alguns são minúsculos, porém muitos possuem grande importância econômica. A maioria dos Diptera pode ser facilmente identificados pela presença de um par de asas anteriores, em que as posteriores são reduzidas a pequenas estruturas nodosas chamadas de halteres, funcionando como órgãos de equilíbrio, conforme a representação simbólica na figura 2 (TRIPLEHORN; JOHNSON, 2011).

Dentro da ordem Diptera, os indivíduos adultos das espécies de Calliphoridae são caracterizados pela cor de reflexos metálicos azulados, esverdeados, cúpricos ou violáceos, principalmente no abdome (figura 3). Possuem importância forense por serem os primeiros e mais abundantes dípteros a alcançar um cadáver humano, compondo a primeira linha de sucessão faunística nesse substrato, junto às famílias Sarcophagidae, Muscidae e Fanniidae. (SMITH, 1986; GOFF; CATTS, 1990; BUZZI, 1994; LENKO; PAPAVERO, 1996; CARVALHO; MELO-PATIU, 2008; OLIVEIRA-COSTA, 2011).

As moscas desta família são comumente chamadas de moscas varejeiras “blowflies”, estando presentes em todas as regiões biogeográficas, compreendendo cerca de 1500 espécies (THOMPSON, 2008). Na região Neotropical, cerca de 130 espécies são conhecidas (CARVALHO; MELLO-PATIU, 2008). Um estudo de compilação dos registros de espécies das principais famílias de Diptera que habitam em carcaças e cadáveres na região Neotropical, Alves et al., (2014b) descreve as espécies *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819), *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794), *Cochliomyia macellaria* (Fabricius, 1775) (figura 4) e *Lucilia eximia* (Wiedemann, 1819) como uns dos principais membros da família Calliphoridae em termos de amplitude de distribuição no neotrópico.

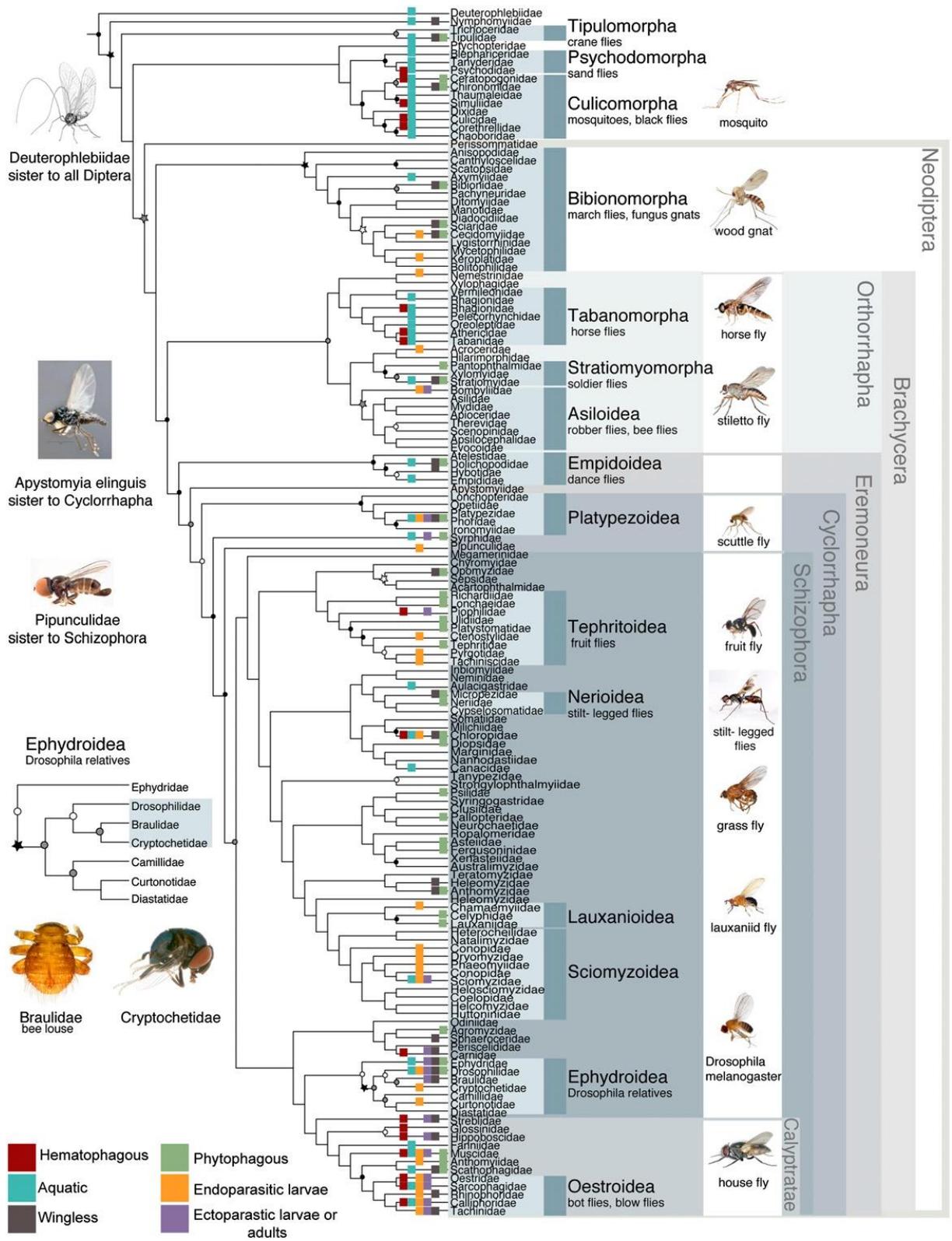


Figura 1. Árvore filogenética molecular combinada para a ordem Diptera e a maioria de suas famílias. Filogenia baseada no método de máxima verossimilhança particionada (Fonte: WIEGMANN et al., 2011).

Os imaturos da maioria das suas espécies são necrófagas e as fêmeas realizam a ovipostura em todos os tipos de carcaças, incluindo cadáveres humanos, enquanto poucas espécies são predadoras de outras larvas nas carcaças, como *Chrysomya albiceps* (Wiedmann). Além do mais, as moscas pertencentes a esta família também são causadoras de miíases em animais, tendo, portanto, importância econômica (BAUMGARTNER; GREENBERG, 1984; TEIXEIRA et al., 1999; OLIVEIRA-COSTA, 2011).

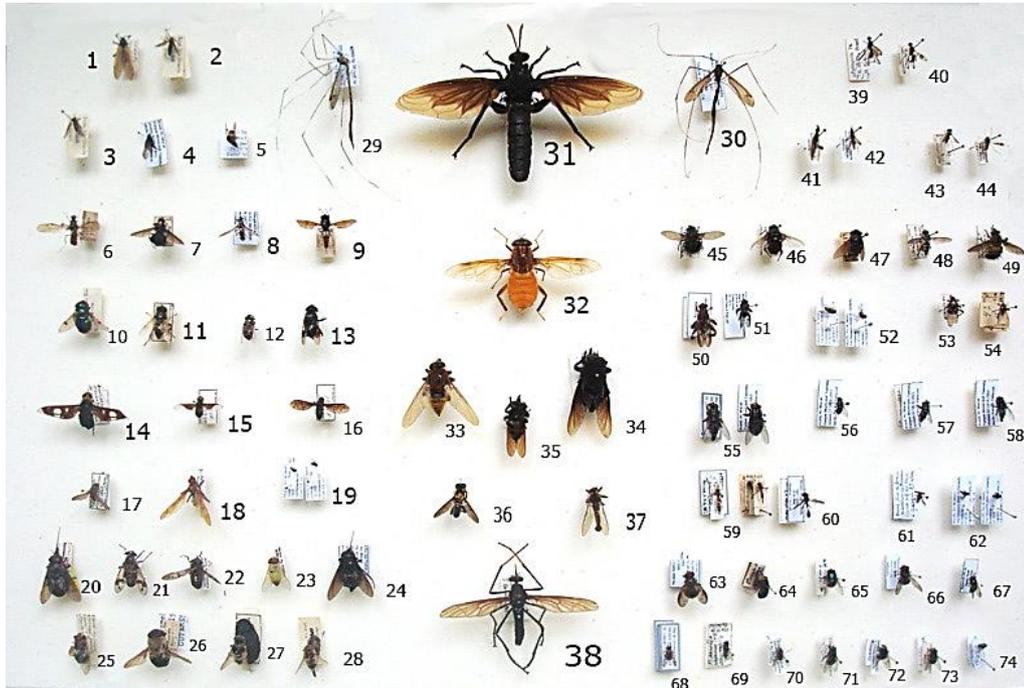


Figura 2. Mostruário da diversidade da ordem Diptera (Fonte: <<http://www.museunacional.ufrj.br/>>, Acesso 11/08/2015).



Figura 3. Indivíduos adultos das espécies *Calliphora loewi* (A), *Chrysomya albiceps* (B), *Phaenicia sericata* (C) e *Chrysomya megacephala* (D) pertencentes à família Calliphoridae e de importância forense (Fonte: Modificado de BYRD; CASTNER, 2010).

Essa família é de grande importância forense para estimativa de intervalo pós-morte em cadáveres humanos, tendo preferência pelos estágios iniciais de decomposição. Seus imaturos apresentam corpo cilíndrico, uma placa espiracular em leve depressão, tendo as aberturas do espiráculo posterior de forma não sinusiosas (CARVALHO; LINHARES, 2001; OLIVEIRA-COSTA, 2011).

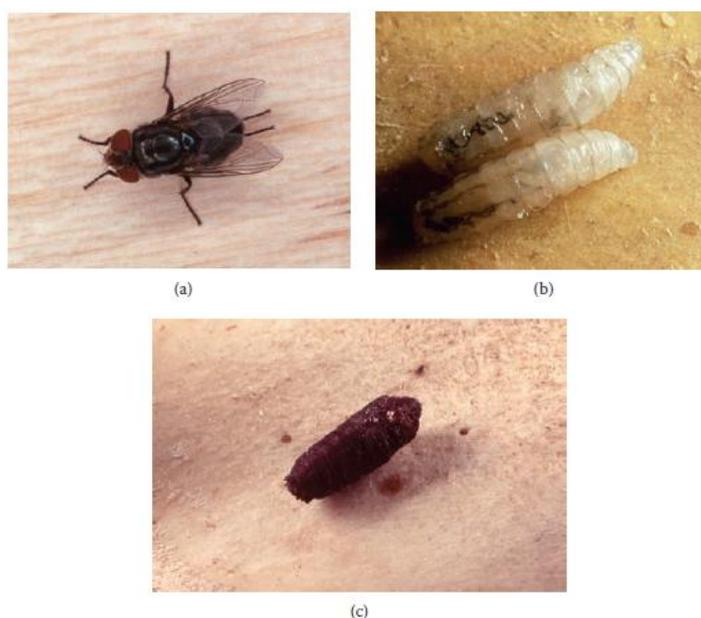


Figura 4. Representação de *Cochliomyia macellaria* em seus três estágios de seu desenvolvimento. Indivíduo adulto (a), forma imatura (b) e pupário (c). (Fonte: BYRD; CASTNER, 2010).

3.3 O DNA como ferramenta útil na identificação de imaturos – Uma nova abordagem à Entomologia Forense

Não há dúvidas sobre a necessidade de uma correta identificação das moscas úteis na Entomologia Forense, no entanto, torna-se difícil realizar essa identificação através de fases imaturas, espécimes danificados ou até mesmo adultos completos (SMITH, 1986).

No que diz respeito aos imaturos, a elevada diversidade de grupos que são encontrados explorando o mesmo recurso e as diferenças morfológicas bastante sutis, fazem com que os insetos presentes no substrato em decomposição nem sempre sejam tão facilmente identificados. Além do mais, mesmo a identificação sendo realizada por meio dos adultos, a taxonomia é dificultada devido as espécies serem estreitamente relacionadas entre si (THYSSEN et al., 2005; WALLMAN; DONNELLAN, 2011; SONET et al., 2013).

Embora a identificação possa ser realizada através da criação de imaturos, o recolhimento das larvas, à espera do seu total desenvolvimento até o estágio adulto, as condições adequadas de criação e a eventual morte dos exemplares antes do total

desenvolvimento podem além de acarretar a perda de evidências criminais, tornar o procedimento demorado e não contribuir para a agilidade dos processos penais (LITJENS et al., 2001; SCHROEDER et al., 2003; AMES et al., 2006). Dessa forma, a necessidade de métodos alternativos ou complementares para suprimir essa carência na identificação taxonômica de imaturos.

A vantagem na identificação de organismos baseada em DNA é a possibilidade de usar qualquer estágio da vida do organismo, além de reduzir o tempo necessário para obter as identificações (SPERLING et al., 1994).

A rápida amplificação de pequenas quantidades de sequências de DNA molde é uma das principais vantagens ao utilizar as técnicas moleculares, permitindo um grande número de informações importantes de uma espécie desejada, seja por meio de amostras danificadas, fragmentos, estágios iniciais, pupários vazios ou exúvias, bem como material danificado. Além do mais, a informação proveniente da utilização das ferramentas moleculares pode diminuir os erros ou dificuldades na identificação (JUNQUEIRA et al., 2002; OTRANTO; STEVENS, 2002; OLIVEIRA-COSTA, 2011).

Diferentemente dos caracteres morfológicos, os marcadores moleculares apresentam neutralidade fenotípica, sendo herdados co-dominantemente e podem ser utilizados tanto em indivíduos jovens quanto em adultos (BRAMMER, 2000). Essa abordagem é possível devido ao avanço das pesquisas e estudos de muitos grupos de genes espalhados pelo genoma (OTRANTO; STEVENS, 2002).

A metodologia molecular oferece de tal modo uma alternativa óbvia ou pelo menos um complemento aos métodos clássicos (WELLS; STEVENS, 2008). Para que essa identificação seja realizada de maneira correta é necessário obter uma sequência de DNA a partir de uma espécie desconhecida coletada de uma evidência e correspondê-la a uma sequência de indivíduos referência de uma espécie previamente identificados e utilizados como referência (BYRD; CASTNER, 2010).

3.4 O DNA mitocondrial e a região *BARCODE* do Citocromo C Oxidase na identificação molecular

Técnicas moleculares vem sendo utilizadas em várias pesquisas ao redor do mundo para identificar espécies e auxiliar na estimativa do IPM. Esse avanço vem utilizando, por exemplo, do isolamento, amplificação e caracterização do material genético humano encontrado no trato digestivo de artrópodes hematófagos e necrófagos, contribuindo no avanço da Entomologia Forense. Estudos como estes podem fornecer importantes indícios da

associação de larvas e o possível corpo no qual elas habitavam em diversas situações, como em casos de morte violenta, onde há dúvidas se os imaturos encontrados realmente se alimentaram e se desenvolveram na vítima encontrada, na determinação da identidade e do sexo da vítima, na presença de drogas e outras substâncias tóxicas, ou mesmo em corpos em estado avançado de decomposição (BENECKE, 2004; THYSSEN, 2007; GUNN, 2009).

As técnicas moleculares de identificação de dípteros se dá graças a utilização de marcadores moleculares. Um marcador molecular é, por definição, qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou de um segmento específico DNA, com o poder de distinguir entidades geneticamente diferentes (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1996; MILACH, 1998). O uso de marcador molecular para insetos em estudos de caracterização de variabilidade genética bem como o diagnóstico espécie-específico constitui uma abordagem alternativa aos estudos que utilizam apenas caracteres morfológicos e etiológicos (SPERLING et al., 1994; OTRANTO; STEVENS, 2002).

As principais características que os marcadores moleculares exibem são a neutralidade fenotípica, já que geralmente são herdados co-dominantemente e podem ser utilizados tanto em indivíduos jovens como em adultos (BRAMMER, 2000). Os genes presentes no genoma mitocondrial, são fontes de informações bastante úteis nos mais diversos estudos moleculares (HOLLAND; PARSONS, 1999). Isso se dá porque na maioria dos animais, os espermatozoides não passam suas mitocôndrias ao zigoto durante a fecundação, logo, as mitocôndrias limitam-se apenas à linhagem materna, o que faz de sua origem unicamente uniparental. No entanto, devido as suas altas taxas de alterações durante o processo evolutivo, o DNA mitocondrial pode ser muito útil para apontar alterações que ocorreram a pelo menos 15 milhões de anos atrás, sendo úteis, portanto, na separação de gêneros e espécies atuais (MOORE, 2006).

O DNA mitocondrial (mtDNA) além de ser útil na identificação de espécies de insetos, possui algumas vantagens atuais em usar a variação de sequência de DNA de sua molécula, incluindo seu tamanho pequeno e facilidade de manipulação, o fato de que ele está presente em múltiplas cópias por célula e, dessa forma, é robusto à degradação, sua aparente ausência de recombinação e a taxa rápida de evolução molecular de sua sequência (HARTL; CLARK, 2010). Essas características permitiram aos cientistas forenses proporcionar a identificação de espécies de moscas dentro de um dia, isto é, de maneira rápida (GENNARD, 2007). Este DNA é um pequeno genoma circular com cerca de 16.000 pares de bases de cadeia dupla, sendo herdado apenas de fonte materna (LESSINGER et al., 2000).

Embasado nesses argumentos que surgiu o projeto “*DNA Barcode - The Barcode Life Project*”, propondo um sistema único e universal com o objetivo de identificar todos os eucariontes, tendo como base uma região específica do DNA mitocondrial, um fragmento da extremidade 5’ da Subunidade I do gene Citocromo c Oxidase (COI ou COXI). Essa região possui um comprimento aproximado de 650 pares de bases na maioria dos grupos, sendo envolvida por sequências conservadas, portanto, relativamente fácil de ser isolada e analisada. (HEBERT; GREGORY, 2005).

O COI é o marcador molecular mais útil na caracterização de espécies, devido a sua organização genômica uniforme e simples, a ausência de recombinação e de taxas elevadas de substituições nucleotídicas, além da possibilidade de recuperar de maneira eficaz informações gênicas provenientes de amostras em mal preservado (ZHANG; HEWITT, 1997).

Sperling et al., (1994) foram os primeiros a propor a identificação de espécies de potencial forense a partir do DNA. Eles sequenciaram diretamente os genes das subunidades c do citocromo oxidase (COI e COII) do mtDNA, além de também utilizarem endonucleases em sítios específicos de restrição.

Uma vez obtida, as sequências das regiões do mtDNA que codificam para as subunidades de citocromo oxidase I e II (COI e COII) são comparados com espécies conhecidas como "assinaturas" no banco de dados online chamado de GenBank, a partir de programas de computador. GenBank é um banco de dados de perfis genéticos que são ratificados e disponíveis ao público. O software utilizado e bastante acessado via web como plataforma para o GenBank é o NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<www.ncbi.nlm.gov>) (GENNARD, 2007).

3.5 Filogenia molecular

De acordo com os princípios da evolução, os seres vivos partilham de um único ancestral comum, e os organismos são fontes de informação de sua própria história evolutiva, onde surge interesse no estudo das relações de parentescos entre organismos. Assim, a existência de conexões entre espécies, ou filogenia, nos remete a verificar como essas relações surgiram. Atualmente, muitas abordagens e dados tanto moleculares como morfológicos foram sendo desenvolvidos para inferir relações filogenéticas (AMORIM, 2002).

Todos os organismos têm uma história; esta história é refletida em suas relações e o conhecimento da história e das relações afeta nossa interpretação de sua biologia. Já que os caracteres em um único indivíduo ali chegaram em momentos diferentes do passado, os

organismos são mosaicos de traços recentes e antigos. Somente uma filogenia pode dizer-nos a ordem na qual os traços evoluíram (STEARNS; HOEKSTRA, 2003).

As relações evolutivas entre um grupo de organismos são chamadas de filogenia e são expressas em uma árvore filogenética, um diagrama ramificado que mostra as relações entre as espécies e são reconstruídas deduzindo-se as mudanças que ocorreram em características homólogas. Tais características evoluíram a partir da mesma característica de um ancestral comum. Uma representação gráfica de uma filogenia é chamada de árvore filogenética, e estas são criadas para representar as relações evolutivas entre os organismos; elas também podem ser criadas para representar as relações evolutivas entre sequências de DNA. Neste último caso, a árvore filogenética será chamada de árvore gênica (RIDLEY, 2006; PIERCE, 2011).

Existem dois enfoques diferentes para deduzir as correlações evolutivas e construir árvores filogenéticas. No primeiro enfoque, chamado de abordagem de distância, as relações evolutivas são deduzidas do grau geral de similaridade entre organismos. O segundo enfoque, chamado de enfoque da parcimônia, deduz as correlações filogenéticas com base no número mínimo das mudanças evolutivas que devem ter ocorrido desde que os primeiros organismos tiveram um ancestral comum (PIERCE, 2011).

Matrizes de distância são aquelas matrizes que são preenchidas com o valor das distâncias resultantes da comparação entre cada par de objetos. Estes objetos podem ser, por exemplo, unidades taxonômicas ou mesmo espécies. Tais distâncias podem ser calculadas através de diversos modelos de evolução, alguns exemplos são os modelos Jukes-Cantor, Kimura, Dayhoff e Jones-Taylor-Thornton (JTT) (OLIVEIRA, 2010). Após o cálculo das distâncias e preenchimento da matriz, algoritmos tais como UPGMA e Neighbor-Joining (NJ) são utilizados para inferir agrupamentos filogenéticos (HARTL; CLARK, 2010; OLIVEIRA, 2010). Neighbor-Joining (NJ) é um método para construção de *clusters* que foi introduzido por Saitou; Nei (1987).

O Método de agrupamento de pares não ponderadas (**UPGMA**), ou método da distância média usando médias aritméticas, é a técnica de agrupamento mais utilizada (TOTTI et al., 2001; HARTL; CLARK, 2010). Esse método requer que todas as sequências evoluam numa mesma taxa, construindo uma árvore com raiz (dendrograma) que reflete a estrutura presente em uma matriz de distância ou similaridade par a par (HARTL; CLARK, 2010).

No algoritmo do UPGMA, com uma matriz de todas as distâncias par a par, uma árvore primária é construída agrupando primeiramente duas espécies com menor distância, as quais formam uma nova matriz de distância com suas espécies agrupadas e agora

consideradas unidades, ocorrendo sempre neste sentido em nível hierárquico de distância por similaridade. Todo o processo é repetido através da média das distâncias entre os agrupamentos de unidades de menor a maior distância, até que todas as espécies estejam agrupadas em uma árvore (HARTL; CLARK, 2010).

O método de construção de árvores com base em medidas de distância genética, chamado de **Neighbor-Joining**, foi proposta por Saitou; Nei (1987) para reconstruir uma árvore filogenética única a partir do princípio de evolução mínima, em que as linhagens da árvore não necessitam evoluir na mesma taxa, tendo como resultado uma árvore binária e sem raiz (OLIVEIRA, 2010). Este método foi promovido como uma ferramenta para a construção rápida de árvores, a partir de sequências com baixa divergência, nesse caso a região *BARCODE* do COI no DNA mitocondrial (HEBERT et al., 2003; BALL et al., 2005; NELSON et al., 2007).

O método de *Neighbor-Joining* é também chamado de agrupamento de vizinhos, porque agrupa as espécies que têm a propriedade de serem “vizinhas”, e de um modo geral, é particularmente adequado à situação na qual não é sabido se as taxas de substituição são constantes entre os clados da árvore. O critério do *neighbor-joining* é minimizar a soma dos tamanhos dos ramos (HARTL; CLARK, 2010).

No entanto, vale salientar que não existe nenhuma teoria geral que forneça uma única maneira ótima para construir árvores filogenéticas, e por mais básicas que as matrizes de distância possam garantir ser, elas não são necessárias em todos os métodos. Um método conhecido como **máxima parcimônia**, usa o menor número de eventos mutacionais necessários para explicar a evolução de um conjunto de sequências a partir de um ancestral comum para construir as árvores. Existem diversos métodos de parcimônia com base nas árvores com o menor número de substituições, mas nenhum garante que a árvore mais parcimoniosa seja a árvore correta (HARTL; CLARK, 2010).

Como existem muitas topologias possíveis, é importante avaliar quanta confiança estatística pode ser posta em uma árvore em particular. Não é possível colocar uma medida numérica de erro-padrão em uma árvore; por sua natureza geométrica, uma árvore é na verdade uma estimativa complexa de relações filogenéticas; assim, pode-se ter uma confiança alta para alguns ramos e uma confiança baixa em outros (HARTL; CLARK, 2010).

Um método amplamente utilizado para acessar a confiabilidade dos nós de uma árvore é o teste de **bootstrap**. A ideia deste teste é bastante simples: um subconjunto dos dados originais é amostrado com reposição, e a partir desse novo conjunto de dados uma árvore é

estimada. Para cada nó na árvore original, é verificado se a nova árvore contém o mesmo agrupamento de sequências. A operação completa de reamostragem dos dados, desenho da árvore e contagem dos nós que estão presentes na árvore original é repetida frequentemente por mil vezes. O resultado final é apresentado graficamente, como um número próximo a cada nó indicando a porcentagem das vezes na qual aquele agrupamento esteve presente nas árvores de reamostragem. Se a fração for alta, então pode-se ter confiança de que aquele agrupamento existe realmente (HARTL; CLARK, 2010).

4 METODOLOGIA

4.1 Local de Estudo

A Pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Genética e Biologia Molecular do departamento de Biologia da UEPB, em Campina Grande, Paraíba e no Laboratório de Bioinformática e Biologia Evolutiva do departamento de Genética da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), em Recife, Pernambuco.

4.2 Amostragem

Foram analisadas amostras de DNA extraídas de imaturos necrófilos coletados diretamente de cadáveres do Núcleo de Medicina e Odontologia Legal (NUMOL) de Campina Grande, perfazendo um número de 10 (dez) larvas por cadáver, armazenados posteriormente em álcool a 70% no intuito de preservá-los. As localidades de origem, a atribuição (distinção) dos exemplares por cadáver e as datas de coleta estão descritas na tabela 1. O perfil do cadáver também foi diagnosticado de acordo com as fases descritas por Bonnet (1978) e Gomes (1997), sendo as mais utilizadas na Medicina Legal em países neotropicais, segundo Oliveira-Costa (2011). A localização do cadáver 2 (dois) não foi obtida.

Tabela 1: Relação das localidades e respectivas datas de coleta dos imaturos

Cadáver	Atribuição	Origem	Data de Coleta	Perfil do Cadáver
1	CG1	Campina Grande	27/02/2015	Fase Gasosa
2	CG C1	Sem Localização	24/10/2015	Fase Coliquativa
3	CG2	Sumé	07/03/2015	Fase Gasosa

4.3 Critérios de Inclusão e Exclusão

Com fins uni e exclusivos de identificação, foram incluídos na pesquisa imaturos da ordem Diptera de qualquer instar larval coletados diretamente de cadáveres em estágio de decomposição, sem distinguir pontos específicos de coleta no cadáver. Os critérios de exclusão serão àqueles que não cumpram os requisitos dos critérios de inclusão, excluindo qualquer possibilidade que não para identificação molecular.

4.4 Extração do DNA

A extração foi realizada através do protocolo descrito por Isola et al., (1994), no qual utiliza a técnica de fenol-clorofórmio. Para obtenção do máximo de DNA e de baixo resíduo proteico, *a priori* foram excisados e utilizados no máximo três segmentos de larvas em L2 ou L3 e aproveitadas por inteiro aquelas larvas cujo tamanho fosse característico de L1 (figura 4), macerados posteriormente em microtubos e dado seguimento ao protocolo *a posteriori*.

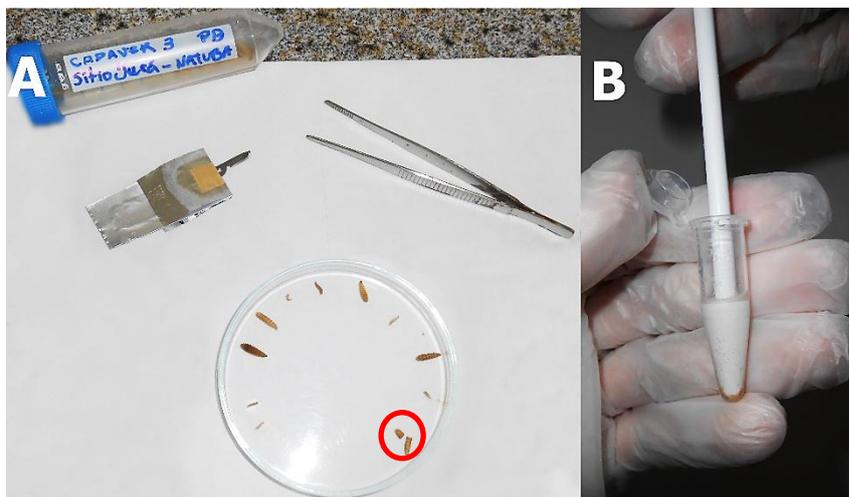


Figura 5. Método de corte dos espécimes coletados no estudo (A) e maceração por pistilo dos segmentos excisados. Excisão no círculo vermelho.

4.5 Amplificação do DNA

A região de DNA mitocondrial utilizada foi a porção final da citocromo c oxidase subunidade I (COI), que corresponde à região do DNA *BARCODE* (HEBERT et al. 2003). Este seguimento foi amplificado através do conjunto de iniciadores propostos por Nelson et al. (2007) e descritos na tabela 2. A amplificação foi realizada utilizando-se de 40 ng de DNA; 25 mM de dNTP; 20 mM de cada iniciador; 2,5 U de Taq e 3-4 mM de MgCl².

Tabela 2: Iniciadores utilizados na reação de PCR e sequenciamento

Iniciador	Orientação	Sequência
HCO2198-L	<i>Forward</i>	5' -TAAACTTCWGGRTGWCCAAARAATCA-3'
LCO1490-L	<i>Reverse</i>	5'-GGTCWACWAATCATAAAGATATTGG-3'

Nomenclatura dos nucleotídeos de acordo com as normas da IUPAC (2015).

Os ciclos de temperatura de PCR consistiram em um passo de desnaturação inicial de 94°C por três minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 47°C por 1 minuto, e alongação a 72°C por 1 minuto. O último ciclo foi seguido

de uma incubação a 72°C por sete minutos para completar quaisquer fitas parcialmente sintetizadas (Adaptado de Nelson et al. 2007). Em todas as reações realizadas, foram incluídos controles brancos para avaliar a presença e/ou ausência de possíveis contaminantes ou inibidores durante o processo de extração de DNA e/ou preparação das reações de PCR. Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão Tris- Borato-EDTA (TBE) (tris 0,089 M; ácido bórico 0,0089 M e EDTA 0,002M, pH 8,3), corado com brometo de etídio e visualizado em transluminador de ultravioleta.

4.6 Sequenciamento do DNA e Análise dos Dados

As sequências dos *amplicons* foram obtidas utilizando o sequenciador ABI3500XL, através do kit de sequenciamento *Big Dye Terminator Cycle Sequencing* (Applied Biosystems). A qualidade dos cromatogramas foi analisada no programa *Genetic Analyzer 3.0* (Life Technologies Corporation) e no pacote de programas Staden (<<http://staden.sourceforge.net/>>). Os *contigs* foram formados no programa Cap 3 (<<http://doua.prabi.fr/software/cap3>>). As sequências obtidas no sequenciador foram comparadas com outras sequências de Diptera do banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), por meio do algoritmo BLASTn (<<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>). As sequências de consenso também foram submetidas ao BLASTx (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para confirmação do posicionamento taxonômico das mesmas.

A identificação das espécies foi determinada baseada no melhor valor de resultado obtido quanto à similaridade e identidade. Feito isso, foi realizado um alinhamento múltiplo utilizando o programa MEGA 6: *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* versão 6.0.6 (TAMURA et al., 2013), por meio do programa *Muscle* (EDGAR, 2004) que o é implementado. Neste último, foi usado um bootstrap com 1000 repetições para determinar a distância genética das espécies encontradas.

Os cálculos de distância genética por meio do algoritmo Neighbour-Joining para construção das árvores filogenéticas geradas foram esquematizados no mesmo programa, utilizando-se dos modelos Kimura 2 parâmetros (KIMURA, 1980) e Tamura-Nei (TAMURA; NEI, 1993). Os índices de divergência genética intrapopulacional foram estimados por meio do programa *DNA Sequence Polymorphism* (DNAsp) v. 5.10.01 (LIBRADO; ROSAS, 2009).

4.7 Comitê de ética e permissão para coleta

Os imaturos necrófilos foram coletados de cadáveres em estado avançado de decomposição oriundos do Núcleo de Medicina e Odontologia Legal (NUMOL) de Campina Grande (Projeto aprovado pelo comitê de ética em pesquisa envolvendo seres humanos da Universidade Federal de Pernambuco, parecer 782.246), colhidos com auxílio de pinças cirúrgicas e preservados em álcool 70%. A permissão para coleta dos imaturos no NUMOL foi cedida pelo diretor geral do Instituto de Perícia Científica (IPC) da Paraíba (ANEXO A).

5 RESULTADOS

5.1 Extração, amplificação, sequenciamento e alinhamento dos nucleotídeos

O DNA genômico total dos 30 espécimes imaturos foi extraído com sucesso. Os dados referentes à concentração ($\eta\text{g}/\mu\text{L}$) e pureza (razão de 260/280 ηm) dos nucleotídeos totais foram obtidos por meio de nanofotometria e variaram de 900 a 31 $\eta\text{g}/\mu\text{L}$ e 1,45 a 2,04 ηm , respectivamente (APÊNDICE A). As variações observadas são resultantes provavelmente pelas diferenças quanto ao tamanho dos exemplares. Espécimes de primeiro instar tendem a ter uma menor taxa de concentração de nucleotídeos totais do que os obtidos da extração de DNA de espécimes de instares mais avançados, onde o tecido utilizado no processo de extração tende a ser maior.

Foram realizadas PCR de todas as amostras, tendo as bandas apresentado tamanho dentro do esperado, em média 649 pares de bases. Esse resultado pôde ser visualizado por meio da eletroforese em gel de agarose 1%, conforme representado na figura 5.

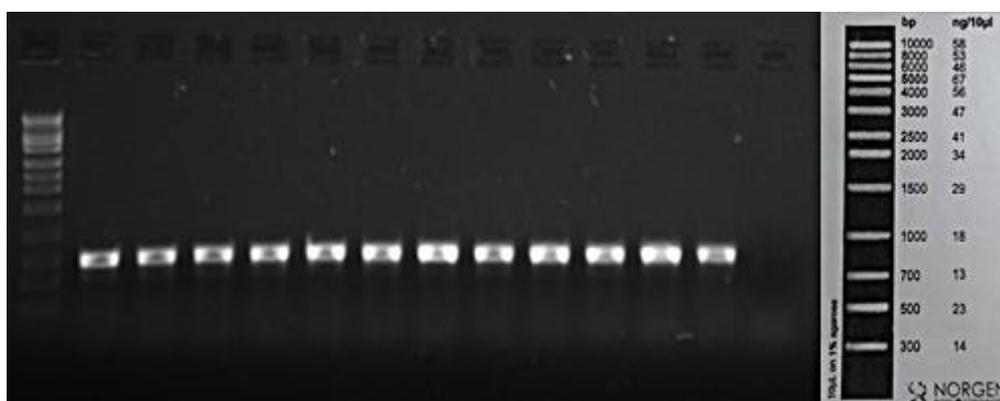


Figura 6. Eletroforese em gel de agarose (1,0%), corado com brometo de etídio, de *amplicons* resultantes da PCR. COI \pm 649 pares de bases Marcador molecular: NorgenBiotekCorp™ HighRanger 1 kb DNA Ladder.

O resultado do sequenciamento dos espécimes imaturos coletados nos três cadáveres gerou 30 seqüências nucleotídicas, conforme o objetivo do estudo (figura 6). As 30 seqüências consenso obtidas da região *BARCODE* do COI variaram de 574 a 678 pares de bases e, de modo geral, com baixa incidência de códons de parada (gaps) nas sequencias da região COI (Tabela 3).

Os eletroferogramas resultantes do processo de sequenciamento apresentaram no geral nucleotídeos com picos bem estabelecidos, bem como valores de confiança (Phred) superior ou igual a 30.

No alinhamento múltiplo das seqüências (figura 6) realizados no programa MEGA 6.0.6, foram acrescentadas as três seqüências controles identificadas pelo alto índice de

homologia e identidade. Para alcançar o sucesso no alinhamento ao agrupar os controles junto às sequências do presente estudo, foram feitos o reverso complemento das três sequências controle.

Por meio do algoritmo BLAST, foi identificado que as sequências apresentavam alta similaridade com sequências do gene COI de duas espécies de dípteros de importância forense pertencentes à família Calliphoridae e depositadas no GenBank, demonstrando pertencer as mesmas espécies (Tabela 3). A espécie *Cochliomyia macellaria* (Fabricius, 1775) fez 28 dos indivíduos imaturos coletados, enquanto dois foram identificados como pertencentes à espécie *Chrysomya albiceps* (figura 6) (Wiedemann, 1819).

Ainda utilizando do mesmo programa, foram realizados duplos alinhamentos de cada sequência individual deste estudo com a sequência controle correspondente depositadas no GenBank nas versões KC602452.1 e KC602453.1, ambos por Fresia et al., (2013) (*C. macellaria*), e KM407601.1 por Salem et al., (2015) (*C. albiceps*), de maneira a identificar os sítios de substituição de nucleotídeos que as diferenciam dos controles (Tabela 3).

Das 30 sequências analisadas, 22 apresentaram 100% de identidade e similaridade, enquanto oito apresentaram sítios de substituição em relação às sequências controle do banco de dados, ambas apresentando cromatogramas com picos bem definidos e com valores de confiança (Phred) iguais ou superiores a 38. Os cromatogramas podem ser visualizados no ANEXO B. Das mutações analisadas, apenas o imaturo CG C1_18 do corpo dois apresentou uma substituição do tipo transversão.



Figura 7. Sequências nucleotídicas pós alinhamento do gene COI de *C. macellaria* e *C. albiceps* (CG2_1 e CG2_5) dos três corpos coletados no NUMOL de Campina Grande, PB.

Tabela 3. Substituições de nucleotídeos encontradas nas sequências COI das espécies identificadas.

CORPO 1			CORPO 2			CORPO 3		
<i>Cochliomyia macellaria</i>			<i>Cochliomyia macellaria</i>			<i>Cochliomyia macellaria</i>		
CG1_2			CG C1_17			CG2_2		
Position	Mut type	GenBank	Position	Mut type	GenBank	Position	Mut type	GenBank
m.42G>A	Trans.	KC602453.1	m.201C>T	Trans.	KC602453.1	m.212G>A	Trans.	KC602453.1
						m.371A>G	Trans.	
<i>Cochliomyia macellaria</i>			<i>Cochliomyia macellaria</i>			<i>Cochliomyia macellaria</i>		
CG1_6			CG C1_18			CG2_8		
Position	Mut type	GenBank	Position	Mut type	GenBank	Position	Mut type	GenBank
m.337G>A	Trans.	KC602453.1	m.185G>T	Transv.	KC602453.1	m.422C>T	Trans.	KC602453.1
<i>Cochliomyia macellaria</i>								
CG1_10								
Position	Mut type	GenBank						
m.447A>G	Trans.	KC602453.1						

Os sítios de mutação (*position*) da sequência *BARCODE* do COI do genoma mitocondrial mostram os tipos de mutação *trans.* (transição) e *transv.* (transversão), identificadas em relação às sequências depositadas no *GenBank* e indicados por *Mut type* (nomenclatura segundo IUPAC). Não foram identificadas substituições em *C. albiceps*.
Fonte: Autor.

5.2 Construção das árvores filogenéticas

O objetivo principal para a construção das árvores filogenéticas deste estudo foi identificar espécies e separá-las em grupos monofiléticos por meio da região *BARCODE* do gene COI, sem fins de análises filogenéticas. Para tal, foram utilizados algoritmos simples que têm como base métodos de distância, por requerer menor custo computacional. O modelo mais adequado para esse tipo de análise é *Neighbor-Joining*, por não buscar estabelecer relações filogenéticas entre as espécies, mas apenas uma única árvore parcimoniosa para fins de identificação, além da sua utilidade quando se trata de baixas divergências evolutivas (SAITOU; NEI, 1987; HEBERT et al., 2003; NELSON et al., 2007).

O modelo utilizado neste estudo foi o Kimura 2 parâmetros (K2P) (figura 7) (KIMURA, 1980), que é o mesmo empregado na metodologia do *BARCODE* descrito por Nelson et al., (2007). No entanto, de maneira a reforçar a confiabilidade dos dados obtidos, visto que um único modelo pode não ser suficientemente informativo, também foi construída uma árvore pelo modelo Tamura-Nei (TAMURA; NEI, 1993), modelo este desenvolvido para estudos específicos com o DNA mitocondrial (figura 8). *A posteriori*, as árvores filogenéticas

agruparam as diferentes espécies em dois grupos monofiléticos, como previsto pelo modelo Kimura 2 parâmetros (K2P), tendo sido obtido o mesmo resultado na árvore gerada pelo modelo empregando Tamura-Nei.

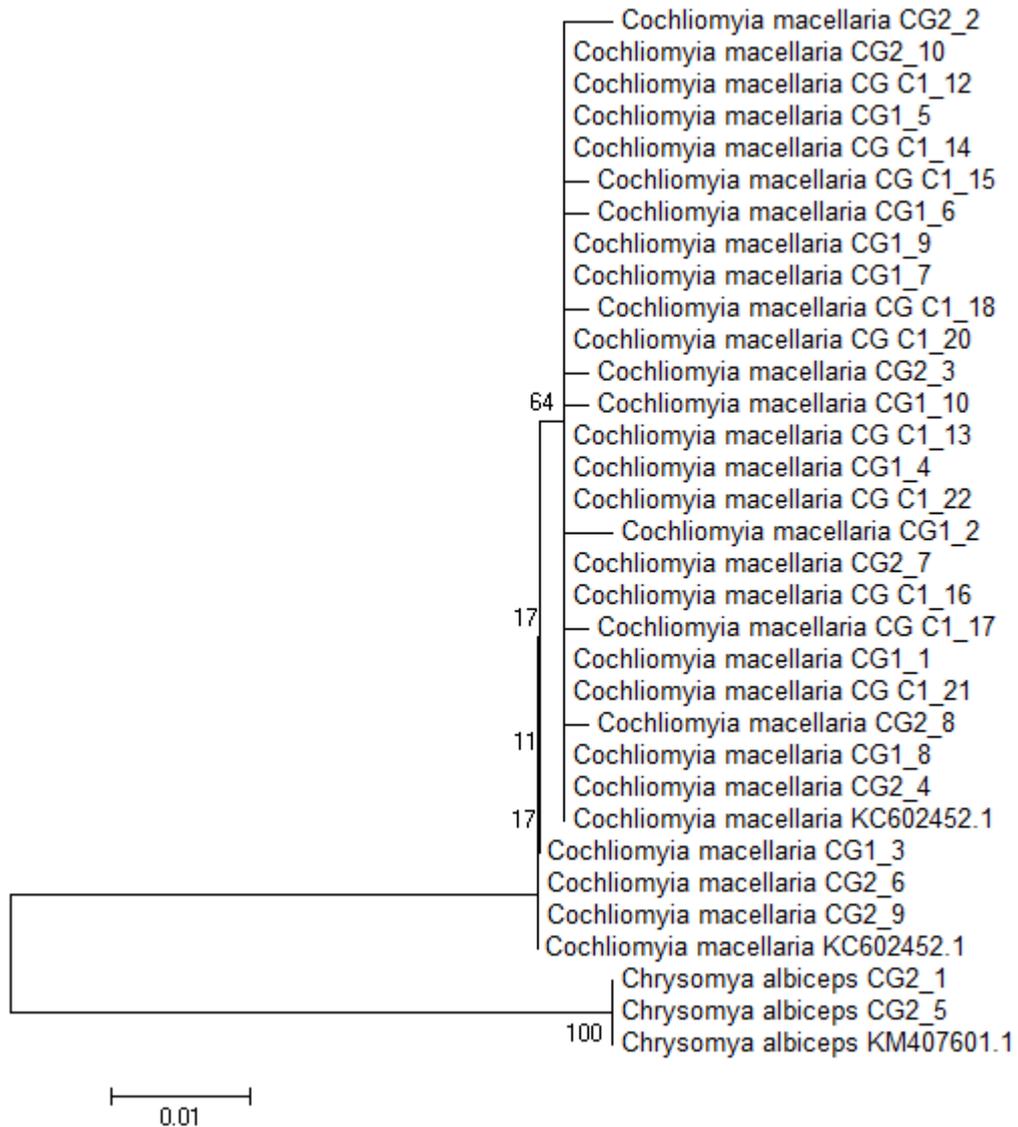


Figura 8. Topologia determinada por Neighbor-Joining pelo modelo Kimura 2 parâmetros resultante do alinhamento múltiplo das sequências consenso da região do Citocromo C Oxidase Subunidade I (COI). Valores dos ramos correspondem ao bootstrap de 1000 replicações.

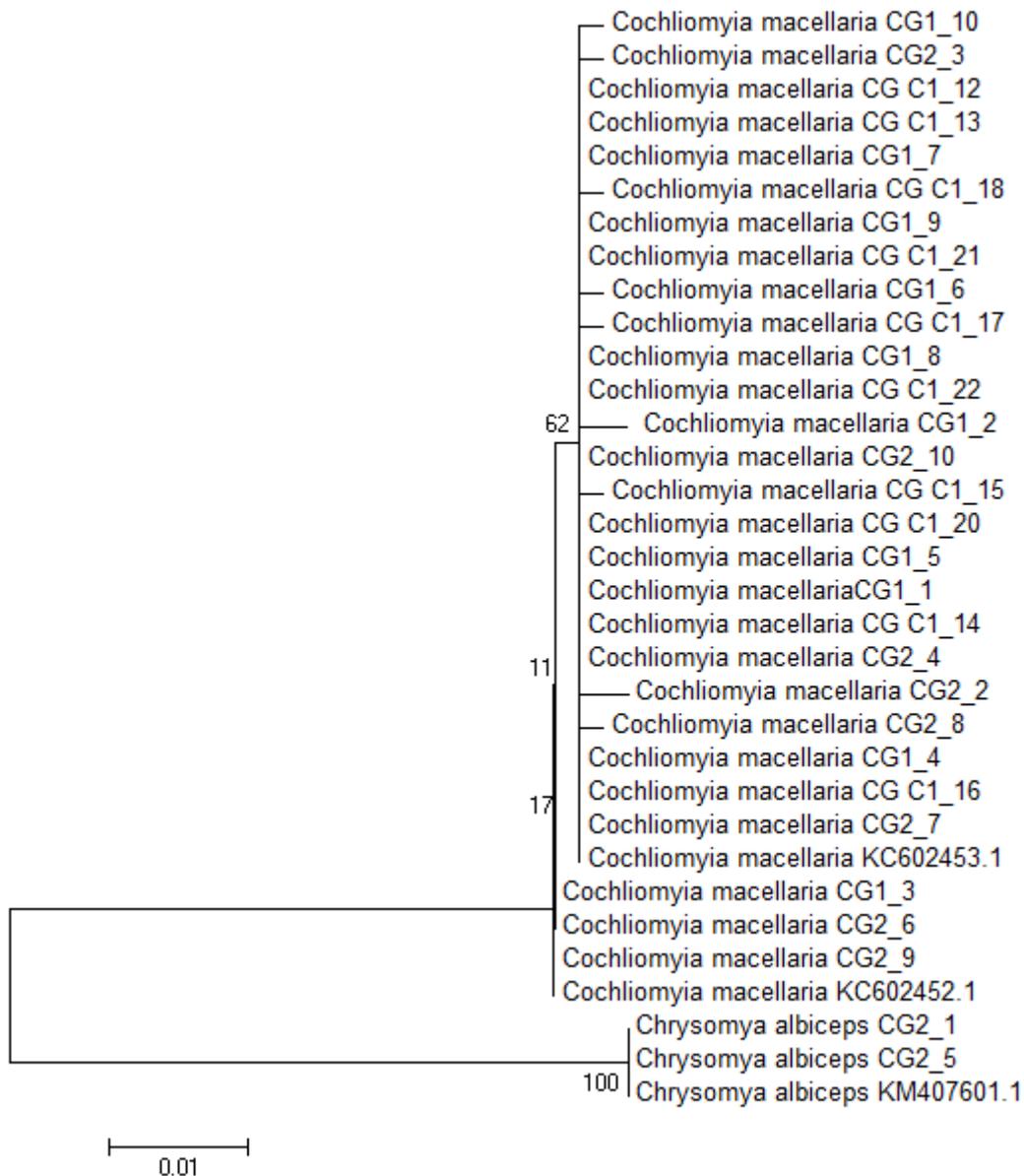


Figura 9. Topologia determinada por Neighbor-Joining e pelo modelo Tamura-Nei resultante do alinhamento múltiplo das sequências consenso da região do Citocromo C Oxidase Subunidade I (COI). Valores dos ramos correspondem ao bootstrap de 1000 replicações.

5.3 Análise de variabilidade genética intrapopulacional

Foram realizadas análises de divergência genética dos grupos populacionais de *Cochliomyia macellaria* coletados de cada corpo no programa DNAsp, possibilitando descrever em termos estatísticos as taxas de polimorfismos encontradas para essa espécie pela primeira vez no Estado da Paraíba. A análise não foi realizada para a espécie *C. albiceps* devido à baixíssima representatividade. Foram analisados os cromatogramas e valores de

confiança (Phred) definidos iguais ou superiores a 40. Os cromatogramas podem ser visualizados no ANEXO C.

As sequências da população de *C. macellaria* encontradas no corpo 1 apresentaram cinco sítios polimórficos (tabela 4), sendo os cinco em sítios variáveis únicas, constituindo cinco haplótipos (tabela 5). A diversidade haplotípica apresentou um valor de 0,6667.

As sequências da população de *C. macellaria* encontradas no corpo 2 apresentaram dois sítios polimórficos (tabela 4), constituindo quatro haplótipos (tabela 5). Das três populações, esta foi a que apresentou o valor mais baixo da diversidade haplotípica: 0,4167 (tabela 5).

As sequências da população de *C. macellaria* encontradas no corpo 3 apresentaram 5 sítios polimórficos (tabela 4), sendo quatro em sítios variáveis únicas e 1 em sítio informativo de parcimônia, constituindo cinco haplótipos. Nesta população foi observado um valor considerado alto da diversidade haplotípica em comparação as outras subpopulações, correspondendo a 0,8571 (tabela 5).

No tocante a frequência haplotípica da subpopulação coletada no primeiro corpo, o haplótipo 1 foi o que apresentou maior frequência: 0,6. Na amostra populacional proveniente do segundo corpo, o haplótipo 1 foi o que apresentou maior frequência: 0,7. No que diz respeito as amostras do terceiro corpo, o haplótipo 3 foi o que obteve a maior frequência: 0,375. As frequências haplotípicas obtidas para cada população está descrita na tabela 5.

Tabela 4. Análise molecular dos polimorfismos nas populações de *Cochliomyia macellaria* provenientes dos três cadáveres do NUMOL de Campina Grande, PB.

Corpo	Sítios polimórficos	Sítios variáveis únicas	Sítios informativos de parcimônia
1 (CG1)	5	5 (57, 111, 323, 342, 453)	0
2(CG C1)	2	2 (186, 219)	0
3 (CG2)	5	4 (123, 213, 372, 423)	1 (111)

Fonte: Autor

Tabela 5. Frequência haplotípica das populações de *Cochliomyia macellaria* provenientes dos três cadáveres do NUMOL de Campina Grande, PB.

Corpo	Número de Haplótipos	Frequência	Sítios Haplotípicos	Diversidade Haplotípica
1 (CG1)	5	0,6	Hap 1: 6 [CG1_1; CG1_4;	0,6667
		0,1	CG1_5; CG1_7; CG1_8;	
		0,1	CG1_9]	
		0,1	Hap 2: 1 [CG1_2]	
		0,1	Hap 3: 1 [CG1_3]	
			Hap 4: 1 [CG1_6]	
			Hap 5: 1 [CG1_10]	
		0,7	Hap 1: 7 [CG C1_13;	0,4167
		0,1	CG C1_14; CG C1_16;	
		0,1	CG C1_20; CG C1_21;	
	CG C1_22; CG C1_12]			
	Hap 3: 1 [CG C1_17]			
			Hap 4: 1 [CG C1_18]	
		0,125	Hap 1: 1 [CG2_2]	0,8571
		0,125	Hap 2: 1 [CG2_3]	
		0,375	Hap 3: 3 [CG2_4; CG2_7;	
		0,25	CG2_10]	
0,125	Hap 4: 2 [CG2_6; CG2_9]			
			Hap 5: 1 [CG2_8]	

Fonte: Autor

Quando as três populações foram tratadas como uma única população, a diversidade haplotípica total (Hd) correspondeu a 0,67460, já a diversidade nucleotídica foi 0,00172 e o número médio de diferenças nucleotídicas foi 0,98413.

Para medir quantitativamente o grau de diferenciação genética entre as três populações, foi analisado o índice de diversidade genética entre populações (*Gst*). A estimativa para todas as populações é feita aos pares. Dos três pares possíveis, a estimativa feita entre CG C1 e CG2 obteve 0,03055, enquanto os demais apresentaram valores negativos. No entanto, é válido ressaltar que não existe diferença genética negativa, logo, convencionou-se colocar o limite inferior deste índice como zero.

Para a determinação do grau de diferenciação genética, estabeleceu-se a definição qualitativa segundo Wright (1978) em que valores de 0,00 a 0,05 indicam pequena diferenciação genética, 0,05 a 0,15 indicam moderada diferenciação genética média, e valores de 0,15 a 0,25 indicam diferenciação genética muito grande. Portanto, os valores obtidos indicam que houve baixa diferenciação genética entre o par CG C1 e CG2, que correspondeu a 0,03055. De tal modo, no geral, o resultado da análise sugere que as três subpopulações são praticamente idênticas.

Hartl; Clark (2010) descrevem esse método de estimativa estatístico como teoricamente corrigindo os efeitos de amostragem de um número limitado de subpopulações, tal como ocorre neste trabalho. No entanto, se faz necessário maiores estudos abrangendo um

número maior de indivíduos, de maneira a reforçar as observações da população e suas subpopulações aqui estudadas.

6 DISCUSSÃO

Alternativamente ao uso de chaves taxonômicas, o uso da biologia molecular permite o alcance de um passo crucial na estimativa do IPM que é a identificação das espécies de importância forense, atuando de forma rápida, de fácil execução e custo relativamente baixo para uso em rotina (THYSSEN, 2008; MENDONÇA et al., 2014). Os insetos encontrados em carcaças estão geralmente na forma imatura do seu desenvolvimento, sendo a sua correta identificação muito importante para a realização do cálculo do intervalo pós-morte (MENDONÇA et al., 2014).

O presente estudo alcançou esse passo inicial, identificando duas espécies de importância forense pertencentes a família Calliphoridae e descritas na literatura como frequentemente encontrados em carcaças decompostas.

A família Calliphoridae é composta de espécies com uma enorme variedade de hábitos, e suas formas imaturas são muito semelhantes. A espécie *Cochliomyia macellaria* (Fabricius, 1775) possui, em seus estágios imaturos, a capacidade de se desenvolver tanto em tecido humano vivo, causando miíases secundárias ou atuando como vetor de doenças, quanto em cadáver ou carcaça animal. Neste último caso, apresentando hábitos necrófagos, junto com outros imaturos da família (QUEIROZ et al., 1999; BARRETO et al., 2002; GRISI et al., 2002; GRUNER et al., 2007; VELÁSQUEZ, 2008; MENDONÇA et al., 2014).

Graças aos seus hábitos necrófagos, *C. macellaria* possui importância ecológica, por devolver a matéria orgânica ao meio ambiente, mas também é bastante útil na investigação criminal por meio da Entomologia Forense, graças a informação fornecida pelo tempo de vida de suas larvas na estimativa do Intervalo Pós-Morte (IPM) (ERZINCLIOGLU, 1989; CATTS; GOFF, 1992).

Conhecida também como “screwworm”, ou mosca da bicheira, *C. macellaria* é amplamente distribuída nas Americas, sendo endêmica do Novo Mundo, e ocorrendo na região tropical e subtropical do hemisfério oeste e sul do Canadá para a Patagonia, incluindo as ilhas Galápagos (FERREIRA, 1983; TEIXEIRA et al., 1999).

Após a inserção de indivíduos exóticos do gênero *Chrysomya* (Robineau-Desvoidy 1830) no Brasil na década de 70, a partir do lixo de navios africanos, as espécies nativas de *Cochliomyia macellaria* sofreram decréscimos em suas populações no seu hábitat natural distribuído ao longo do país (GUIMARÃES et al., 1979; PRADO; GUIMARÃES, 1982; FURLANETTO et al., 1984).

Seja este um fato sobre a história recente de *C. macellaria* no Brasil, ainda assim esta espécie foi a mais frequente neste estudo, perfazendo 28 dos 30 indivíduos coletados. Vale salientar que o *n* amostral aqui utilizado é suficiente na utilização da região do *BARCODE* do gene do citocromo c oxidase subunidade I (COI) para fins de identificação molecular (NELSON, 2007), mas não sendo suficientes para representar a fauna cadavérica do Estado da Paraíba. Mesmo assim, os resultados foram bastante similares aos já encontrados na literatura.

Os resultados obtidos por Koller et al., (2011) no Pantanal Mato-grossense foram semelhantes, tendo *C. macellaria* com o maior número de indivíduos coletados, e *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819) em quarto. Os estudos conduzidos por Corrêa et al., (2010) destacam a expressividade de *C. albiceps* sobre outras espécies no pantanal Sul-Mato-Grossense. No Sudeste brasileiro, Moretti et al., (2008) colheram resultados semelhantes, em que *C. albiceps* sobressaiam em número *C. macellaria* e outras espécies nativas.

Já Rosa (2011) descreve *C. macellaria* em segundo mais representativo da família Calliphoridae em estudo conduzido em uma vegetação do Cerrado de Minas Gerais, com os resultados similares aos obtidos por Souza; Linhares (1997) e Gomes et al., (2009) no estado de São Paulo, dando ênfase a ao impacto nas populações pela competição e predação do gênero exótico *Chrysomya*. A respeito do estudo realizado por Ribeiro et al., (2015) no Rio de Janeiro, *C. macellaria* apresentou baixíssima representatividade comparada a *C. albiceps*, onde é perceptível a drástica diminuição da população de *C. macellaria* nos ambientes rico em espécies do gênero *Chrysomya*.

No que diz respeito à região Norte e Nordeste, Ururahy-Rodrigues et al., (2013) obtiveram um baixo número de *C. macellaria* numa reserva florestal em Manaus comparado as outras espécies, incluindo *C. albiceps*, que apresentou alta expressividade. Resultados obtidos por Sousa et al., (2015) no Maranhão descreve *C. macellaria* como a segunda espécie mais abundante, atrás de *Chrysomya albiceps*. O estudo realizado em cadáveres por Andrade et al., (2005) no Rio Grande do Norte mostram a espécie *C. macellaria* como presente em apenas um dos seis cadáveres estudados, não tendo sido encontrada nos outros corpos em que as espécies do gênero *Chrysomya* foram abundantes, demonstrando mais uma vez que a presença de espécies do gênero *Chrysomya* é preponderante no número da mosca da bicheira.

Em Pernambuco, Vasconcelos et al., (2013) em estudo realizado em mata atlântica, não identificaram *C. macellaria*. Vasconcelos et al., (2015) realizou o estudo dividindo-o em quatro ambientes distintos, onde *C. macellaria* não foi encontrada em ambiente estuariano e urbano, mas apenas no campo em fragmento de floresta atlântica, onde ressalta que as

espécies invasivas *Chrysomya megacephala* (Fabricius) e *C. albiceps* estavam presentes em grande abundância em todos ambientes, algo que foi similar a todos os estudos supracitados. No estudo conduzido por Vasconcelos; Salgado (2014), os autores ressaltam que a codominância evidenciada de *C. macellaria* e *C. albiceps* demonstra que esta última espécie é uma concorrente direta com as *C. macellaria*, o que pode representar ameaças para populações de espécies nativas.

A evidência supracitada é observada claramente no estudo realizado em cadáveres por Oliveira; Vasconcelos (2010), no instituto de medicina legal de Pernambuco, em que abundância de *Chrysomya albiceps* foi considerada alta enquanto a de *C. macellaria* foi intermediária. Isso pode ser visto na média de indivíduos coletados em todos os corpos, em que *C. albiceps* obteve 89,11, enquanto *C. macellaria* obteve apenas 9,7.

Na Paraíba, os trabalhos publicados ainda são incipientes. Alves et al., (2014a) realizaram um estudo no município de São José dos Cordeiros utilizando duas carcaças para cada período típico da região, isto é, seco e chuvoso. A análise mostrou que a espécie *Cochliomyia macellaria* foi coletada apenas na estação seca, com 52,2%, enquanto *C. albiceps* fez 39,9%, o que corrobora com o presente estudo.

Na análise dos trabalhos supracitados, também foi visto uma maior abundância de *C. macellaria* nos períodos secos do ano, o que condiz com o presente estudo em vista que as coletas dos imaturos foram realizadas durante o período de seca que atingiu a região Nordeste no final de 2014 e no primeiro semestre de 2015, onde especula-se uma possível influência nos resultados obtidos, sendo necessário maiores estudos. Dentro deste contexto, é válido ressaltar que a sazonalidade de *C. macellaria* resulta de condições climáticas ao longo do território brasileiro, como descrito por Koller et al., (2011), enquanto que a competição com *C. albiceps* pode reduzir as populações emergentes por predação (AGUIAR-COELHO; MILWARD-DE-AZEVEDO, 1995).

Métodos diversos são propostos para identificação de espécies baseadas na sequência de DNA, sendo o método aqui utilizado buscando encontrar grupos monofiléticos. Por meio da análise por Neighbour-Joining, foi possível evidenciar a região *BARCODE* do COI como uma ferramenta que permitiu resolução suficiente na identificação de duas espécies do gênero *Cochliomyia* e *Chrysomya*, suportando os indivíduos de cada espécie em grupos monofiléticos nas árvores geradas (HERBERT et al., 2003; NELSON, 2007).

Foram verificados relevantes índices de polimorfismos nas sequências de *Cochliomyia macellaria* provenientes de uma das amostras populacionais coletadas dos três cadáveres.

Sabendo da ampla distribuição endêmica dessa espécie nas Américas, sendo nativa sobretudo na região tropical e subtropical (FERREIRA, 1983; TEIXEIRA et al., 1999), é possível esclarecer justificativas para o alto índice de polimorfismo genético nas subpopulações estudadas.

A maioria das populações naturais são agrupadas em subpopulações menores, nas quais geralmente ocorrem os cruzamentos. Quando há subdivisão populacional, é quase inevitável que ocorra alguma diferenciação genética entre as subpopulações, sendo um processo natural e quase universal entre os organismos. A diferenciação genética pode resultar de seleção natural em favor de diferentes genótipos em subpopulações dissimilares, mas também pode resultar de processos aleatórios na transmissão de alelos de geração a geração ou de diferenças casuais na frequência alélica entre os fundadores iniciais das subpopulações (HARTL; CLARK, 2010).

Segundo Lima (2013), a região *BARCODE* do COI é ineficaz na detecção da diferenciação genética intraespecífica de populações introduzidas recentemente, tal como são as espécies exóticas do gênero *Chrysomya*, o que explicaria o baixo polimorfismo genético entre as populações analisadas em seu estudo. Em complemento, Stoeckle et al., (2005) ressalta que as limitações na utilização da região *BARCODE* do COI também estariam relacionadas a grupos que venham a apresentar baixa diversidade gênica nas sequências, detecção de híbridos, bem como resolução de espécies com divergência.

Resultados semelhantes com a espécie *Chrysomya megacephala* coletados nos Estados de Pernambuco e Ceará foram relatados por Figueirêdo-Júnior (2015), destacando a ausência de estruturação populacional e a baixa diversidade genética nas populações de no Estado de Pernambuco como decorrência de um provável efeito fundador, possivelmente associado a introdução recente do gênero *Chrysomya*.

Por fim, é válido destacar a ressalva de GilArriortua et al., (2014), ao descrever que para aumentar o poder informativo das sequências, pode ser conveniente também combinar diferentes marcadores moleculares a fim de aumentar o poder de resolução na identificação e na diferenciação de espécies.

7 CONCLUSÃO

A identificação das espécies *Cochliomyia macellaria* (Fabricius, 1775) e *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819) por fragmentos específicos do DNA mitocondrial (mtDNA) propostas pelo código de barras do projeto *BARCODE* foi eficiente neste estudo, demonstrando a eficácia da região e alcançado os objetivos almejados.

O gene do Citocromo C Oxidase Subunidade I (COI) foi de fácil amplificação e sequenciamento, tendo os dados moleculares obtidos de *Cochliomyia macellaria* (Fabricius, 1775) mostrado diferenças genéticas nas populações coletadas dos diferentes cadáveres, o que poderia indicar a possibilidade futura de associar as sequências das espécies ao ambiente geográfico.

No entanto, se faz necessário maiores estudos para confirmar esse observado, incluindo o crescimento de marcadores moleculares alternativos descritos na literatura de maneira a ampliar a acurácia dos dados fornecidos por apenas um marcador.

O presente trabalho é pioneiro ao utilizar de estudos moleculares em dípteros de potencial forense coletados em cadáveres para o estado da Paraíba. Espera-se que mais trabalhos sejam desenvolvidos para enriquecer o banco de dados ao utilizar-se de moscas de potencial forense.

Por fim, a identificação mediante a utilização da sequência COI, surge como apreciável alternativa à taxonomia convencional, permitindo uma rápida e acurada identificação a nível de espécie de califorídeos imaturos em todas as suas fases de vida, podendo ser vitais em uma investigação forense para estimar o IPM mínimo, contribuindo potencialmente na agilidade dos processos criminais.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR-COELHO, V. M.; MILWARD-DE-AZEVEDO, E. Association between *Chrysomya megacephala* (Fabricius) and *Chrysomya albiceps* (Wiedemann), *Chrysomya megacephala* (Fabricius) and *Cochliomyia macellaria* (Fabricius) larvae (Calliphoridae, Diptera), under laboratory conditions. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 12, n. 4, p. 991-1000, 1995.
- ALVES, A. C. F.; SANTOS, W. E.; FARIAS, R. C. A. P.; CREÃO-DUARTE, A. J. Blowflies (Diptera, Calliphoridae) associated with pig carcasses in a Caatinga area, Northeastern Brazil. **Neotropical entomology**, v. 43, n. 2, p. 122-126, 2014a.
- ALVES, A. C. F.; SANTOS, W. E.; CREÃO-DUARTE, A. J. Diptera (Insecta) de importância forense da região Neotropical. **Entomotropica**, v. 29, n. 2, p. 77-94, 2014b.
- AMENDT, J.; GOFF, M. L.; CAMPOBASSO, C. P.; GRASSBERG, M. **Current Concepts in Forensic Entomology**. Springer Science & Business Media, 2010. ISBN 978-1-4020-9683-9.
- AMES, C.; TURNER, B.; DANIEL, B. Estimating the post-mortem interval (I): The use of genetic markers to aid in identification of Dipteran species and subpopulations. In: **International Congress Series**. Elsevier, v. 1288, p. 795–797, 2006.
- AMORIM, D. de S. et al. Estado do conhecimento dos Diptera neotropicais. Proyecto de Red Iberoamericana de Biogeografía y Entomología Sistemática (C. Costa, SA Vanin, JM Lobo, A. Melic, orgs.). **Sociedad Entomológica Aragonesa y CYTED**, Zaragoza, p. 29-36, 2002.
- ANDRADE, H. T.; VARELA-FREIRE, A. A.; BATISTA, M. A.; MEDEIROS, J. F. Calliphoridae (Diptera) coletados em cadáveres humanos no Rio Grande do Norte. **Neotropical Entomology**, v. 34, n. 5, p. 855-856, 2005.
- BRAMMER, S. P. **Marcadores moleculares: princípios básicos e uso em programas de melhoramento genético vegetal**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2000.
- BENECKE, M. A. brief survey of the history of Forensic Entomology. **Acta Biologica Benrodis**, Köln, v. 14, n. 2008, p. 15-38, 2008.
- BENECKE, M.; JOSEPHI, E.; ZWEIHOFF, R. Neglect of the Elderly: Forensic Entomology Cases and Considerations. **Forensic Science International**, v.146, p. 195-199, 2004.
- BENECKE, M.; LESSIG, R. Child neglect and Forensic Entomology. **Forensic Science International**, v. 120, n. 1, p. 155-159, 2001.
- BUZZI, Z. J. **Coletânia de nomes populares de insetos do Brasil**. Curitiba: JZ Buzzi, 1994.
- BAUMGARTNER, D. L.; GREENBERG, B. The genus *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) in the New World. **Journal of Medical Entomology**, v. 21, n. 1, p. 105-113, 1984.

BYRD, J. H.; CASTNER, J. L. **Forensic entomology: The utility of arthropods in legal investigations**. Florida: CRC Boca Raton, 2010. ISBN 978-0-8493-9215-3.

BALL, S. L.; HEBERT, P. D.; BURIAN, S. K.; WEBB, J. M. Biological identifications of mayflies (Ephemeroptera) using DNA barcodes. **Journal of the North American Benthological Society**, v. 24, n. 3, p. 508-524, 2005.

BARRETO, M.; BURBANO, M. E.; BARRETO, P. Flies (Calliphoridae, Muscidae) and beetles (Silphidae) from human cadavers in Cali, Colombia. **MEMORIAS-INSTITUTO OSWALDO CRUZ**, v. 97, n. 1, p. 137-138, 2002.

BONNET, Emilio Federico Pablo. **Lecciones de medicina legal**. Buenos Aires: López Libreros, 1978.

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, n. 3, p. 390-406, 2008.

CATTS, E. P.; GOFF, M. L. Forensic Entomology in Criminal Investigations. **Annual Reviews**, v. 37, n. 1, p. 253-72, 1992.

CAMPOBASSO, C. P.; DI VELLA, G.; INTRONA, F. Factors affecting decomposition and Diptera colonization. **Forensic Science International** v. 120, n. 1, p. 18-27, 2001.

CARVALHO, L. M. L.; THYSSEN, 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**, Rio de Janeiro, v. 95, n. 1, p. 135-138, 2000.

CARVALHO, C. J. B.; RAFAEL, J. A.; COURI, M. S.; SILVA, V. C. **Insetos do Brasil: Diversidade e Taxonomia**. Ribeirão Preto: Holos Editora, 2012.

CROSBY, T.; WATT, J.; KISTEMAKER, A.; NELSON, P. Entomological identification of the origin of imported *Cannabis*. **Forensic Science Society**, v.26, n. 1, p. 35-44, 1986.

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, n. 3, p. 604-608, 2001.

CORRÊA, E. C; KOLLER, W. W.; BARROS, A. T. M. Abundância relativa e sazonalidade de espécies de *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) no Pantanal Sul-Mato-Grossense, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia e Veterinária**, v. 19, n. 2, p. 85-88, 2010.

ERZINCLIOGLU, Y. Z. The value of chorionic structure and size in the diagnosis of blowfly eggs. **Medical and veterinary entomology**, v. 3, n. 3, p. 281-285, 1989.

EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 5, p. 1792-97, 2004.

FRANÇA, G. V. **Fundamentos de medicina legal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. ISBN 8527709597.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1996.

FRESIA, P.; AZEREDO-ESPIN, A. M. L.; LYRA, M. L. The phylogeographic history of the new world screwworm fly, inferred by approximate Bayesian computation analysis. **PloSone**, v. 8, n. 10, p. e76168, 2013.

FERREIRA, M. J. M. Sinantropia de Calliphoridae (Diptera) em Goiânia, Goiás. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 43, n. 2, p. 199-210, 1983.

FIGUEIRÊDO JÚNIOR, C. A. S. **Diversidade genética de dípteros Calliphoridae de importância forense**. Recife: UFPE, 2015.

FURLANETTO, S. M. P.; CAMPOS, M. L. C.; HÁRSI, C. M. Microrganismos enteropatogênicos em moscas africanas pertencentes ao gênero *Chrysomya* (Diptera, Calliphoridae) no Brasil. **Revista de Microbiologia**, v. 15, n. 3, p. 170-174, 1984.

GOFF, M. L.; CATTS, E. P. **Arthropods basic structure and biology**. In: CATTS, E. P.; HASKEL, N. H. (Ed.). *Entomology & Death: a procedure guide*. South Carolina: Joyce's Print Shop, 1990.

GUNN, A. **Essential Forensic Biology**. Liverpool: U.K. Wiley-Blackwell, 2009. ISBN 978-0470758038.

GENNARD, D. E. **Forensic Entomology: An Introduction**. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2007. ISBN 978-0-470-01478-3.

GILARRIORTUA, M. et al. Molecular differentiation of Central European blowfly species (Diptera, Calliphoridae) using mitochondrial and nuclear genetic markers. **Forensic science international**, v. 242, p. 274-282, 2014.

GRISI, L.; MASSARD, C. L.; BORJA, G. E. M.; PEREIRA, J. B. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. **A hora veterinária**, v. 21, n. 125, p. 8-10, 2002.

GRUNER, S. V.; SLONE, D. H.; CAPINERA, J. L. Forensically important Calliphoridae (Diptera) associated with pig carrion in rural north-central Florida. **Journal of medical entomology**, v. 44, n. 3, p. 509-515, 2007.

GUIMARÃES, J. H.; PRADO, A. P.; BURALLI, G. M. Dispersal and distribution of three newly introduced species of *Chrysomya* Robineau-Desvoidy in Brazil (Diptera, Calliphoridae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 23, n. 4, p. 245-255, 1979.

GOMES, L.; GOMES, G.; DESUÓ, I. C. A preliminary study of insect fauna on pig carcasses located in sugarcane in winter in southeastern Brazil. **Medical and veterinary entomology**, v. 23, n. 2, p. 155-159, 2009.

GOMES, H. **Medicina Legal**. Rio de Janeiro: Freitas Bastos, 2007.

HOLLAND, M. M.; PARSONS, T. J. Mitochondrial DNA sequence analysis-validation and use for forensic casework. **Forensic Science review**, v. 11, p. 21-50, 1999.

HARTL, D. L.; CLARK, A. G. **Princípios de genética de populações**. Porto Alegre: Artmed, 2010. ISBN-13: 978-8536323053.

HEBERT, P. D. N.; GREGORY, T. R. The promise of DNA barcoding for taxonomy. **Systematic Biology**, v. 54, n. 5, p. 852–859, 2005.

HEBERT, P. D.; CYWINSKA, A.; BALL, S. L. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 270, n. 1512, p. 313-321, 2003.

ISOLA, J.; DEVRIES, S.; CHU, L.; GHAZVINI, S.; WALDMAN, F. Analysis of changes in DNA sequence copy number by comparative genomic hybridization in archival paraffin-embedded tumor samples. **Am J Pathol**, v. 145, n. 6, p. 1301-1308, 1994.

JUNQUEIRA, A. C. M.; LESSINGER, A. C.; AZEREDO-ESPIN, A. M. L. Methods for the recovery of mitochondrial DNA sequences from museum specimens of myiasis-causing flies. **Medical and veterinary entomology**, v. 16, n. 1, p. 39-45, 2002.

LIMA, T. L. D. **Caracterização molecular de duas populações de *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae) do Estado de Pernambuco, Brasil**. Recife: UFPE, 2013.

KEH, B. Scope and applications of forensic entomology. **Annual Review of Entomology** v. 30, n. 1, p. 137–154, 1985.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of molecular evolution**, v. 16, n. 2, p. 111-120, 1980.

KOLLER, W. W.; BARROS, A. T. M.; CORRÊA, E. C. Abundance and seasonality of *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae) in Southern Pantanal, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 1, p. 27-30, 2011.

LIU, D.; GREENBERG, B. Immature stages of some flies of forensic importance. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 82, n. 1, p. 80-93, 1989.

LENKO, K.; PAPAVERO, N. **Insetos no folclore**. São Paulo: Conselho Estadual de Artes e Ciências Humanas, 1996.

LITJENS, P.; LESSINGER, A. C.; AZEREDO-ESPIN, A. M. L. Characterization of the screwworm flies *Cochliomyia hominivorax* and *Cochliomyia macellaria* by PCR-RFLP of mitochondrial DNA. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 15, n. 2, p. 183-188, 2001.

LESSINGER, A. C.; AZEREDO-ESPIN, A. M. L. Evolution and structural organisation of the mitochondrial DNA control region of myiasis-causing flies. **Med. Vet. Entomol**, v. 14, n. 1, p. 71-80, 2000.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, v. 25, n. 11, p. 1451-1452, 2009.

MILACH, S. C. K. Marcadores de DNA. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 5, p. 14-17, 1998.

MOORE, J. The pattern of evolution: methods of investigation. **An Introduction to the Invertebrates**. New York: Cambridge University Press, 2006. ISBN: 978-0521674065.

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**, v. 113, n. 10, p. 3675-3683, 2014.

MORETTI, T. D. C.; RIBEIRO, O. B.; THYSSEN, P. J.; SOLIS, D. R. Insects on decomposing carcasses of small rodents in a secondary forest in Southeastern Brazil. **European Journal of Entomology**, v. 105, p. 691-696, 2008.

NELSON, L. A.; WALLMAN, J. F.; DOWTON, M. Using COI barcodes to identify forensically and medically important blowflies. **Med Vet Entomol**, v. 21, n. 1, p. 44-52, 2007.

OTRANTO, D.; STEVENS, J. R. Molecular approaches to the study of myiasis-causing larvae. **International Journal of Parasitology**, v. 32, n. 11, p. 1345-1360, 2002.

OLIVEIRA, K. Z. **Construção de árvores filogenéticas baseadas em genomas completos**. Campinas: UNICAMP, 2010.

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, n. 1, p. 97-102, 2010.

OLIVEIRA-COSTA, J. **Entomologia Forense: Quando os insetos são vestígios**. Campinas: Millennium Editora, 2011. ISBN 978-85-7625-227-6.

PUJOL-LUZ, J. R., ARANTES, L. C., CONSTANTINO, R. Cem anos da Entomologia Forense no Brasil (1908-2008). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 52 n. 4, p. 485-492, 2008.

PIERCE, B. A. **Genética, um enfoque conceitual**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. ISBN-13: 9788527716642.

PRADO, A. D.; GUIMARÃES, J. H. Estado atual de dispersão e distribuição do gênero *Chrysomya* Robineau-Desvoidy na região Neotropical (Diptera: Calliphoridae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 26, n. 3-4, p. 225-31, 1982.

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. In: **Rio de Janeiro, Brasil, Apresentação no XIV Congresso Latinoamericano de Parasitologia**. 1999.

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

RIDLEY, M. **Evolução**. São Paulo: Artmed, 2006. ISBN: 8536306351.

ROSA, T. A.; BABATA, M. L.; SOUZA, C. M. D.; SOUSA, D. D.; MELLO-PATIU, C. A. D.; VAZ-DE-MELLO, F. Z.; MENDES, J. Arthropods associated with pig carrion in two vegetation profiles of Cerrado in the State of Minas Gerais, Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 55, n. 3, p. 424-434, 2011.

RIBEIRO, C.; PAULINO, A. M.; PROENÇA, B.; LUZ, R. T.; LESSA, C. S.; AGUIAR, V. M. Influência de depósito de lixo em califorídeos (Diptera: Calliphoridae) de uma Área de Preservação Ambiental (APA) no município de Rio Bonito, Rio de Janeiro, Brasil. **Entomotropica**, p. 92-104, 2015.

SALEM, A. M.; ADHAM, F. K.; PICARD, Christine J. Survey of the Genetic Diversity of Forensically Important *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) from Egypt. **Journal of Medical Entomology**, v. 52, n. 3, p. 320-328, 2015.

SPERLING, F. A. H.; ANDERSON, G. S.; HICKEY, D. A. A DNA-based approach to the identification of insect species used for post-mortem interval estimation. **Journal of Forensic Sciences**, v. 39, n. 2, p. 418-427, 1994.

SMITH, K. G. V. **A manual of forensic entomology**. London: Trustees of the British Museum (Natural History), 1986. ISBN 0-565-00990-7.

SONET, G.; JORDAENS, K.; NAGY, Z. T.; BREMAN, F. C.; DE MEYER, M.; BACKELJAU, T.; VIRGILIO, M. Adhoc an: R package to calculate ad hoc distance thresholds for DNA barcoding identification. **ZooKeys**, n. 365, p. 329, 2013.

SCHROEDER, H.; KLOTZBACH, H.; ELIAS, S.; AUGUSTIN, C.; PUESCHEL, K. Use of PCR-RFLP for differentiation of calliphorid larvae (Diptera, Calliphoridae) on human corpses. **Forensic Science Internacional**, v. 132, n. 1, p. 76-81, 2003.

SPERLING, F. A. H.; ANDERSON, G. S.; HICKEY, D. A. A DNA-based approach to the identification of insect species used for post-mortem interval estimation. **Journal of Forensic Sciences**, v. 39, n. 2, p. 418-427, 1994.

STEARNS, S. C.; HOEKSTRA, R. F. **Evolução: uma introdução**. São Paulo: Atheneu, 2003. ISBN: 85-7454-077-3.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular biology and evolution**, v. 4, n. 4, p. 406-425, 1987.

SOUZA, A. M.; LINHARES, A. X. Diptera and Coleoptera of potential forensic importance in southeastern Brazil: relative abundance and seasonality. **Medical and veterinary entomology**, v. 11, n. 1, p. 8-12, 1997.

SOUZA, J. R. P.; CARVALHO-FILHO, F. S.; ESPOSITO, M. C. Distribution and Abundance of Necrophagous Flies (Diptera: Calliphoridae and Sarcophagidae) in Maranhão, Northeastern Brazil. **Journal of Insect Science**, v. 15, n. 1, p. 70, 2015.

STOECKLE, M.; WAGGONER, P.; AUSUBEL, J. H. **Barcoding Life, Illustrated - Goals, Rationale, Results**, 2005. Disponível em: <http://phe.rockefeller.edu/PDF_FILES/BLIllustrated26jan04print%20v1-3.pdf>. Acessado em 08 de maio de 2015.

THYSSEN, P. J.; LESSINGER, A. C.; AZEREDO-ESPIN, A. M.; LINHARES, A. X. The value of PCR-RFLP molecular markers for the differentiation of immature stages of two necrophagous flies (Diptera: Calliphoridae) of potential forensic importance. **Neotropical Entomology**, v. 34, n. 5, p. 777-783, 2005.

THYSSEN, P. J. As aplicações do DNA na entomologia forense e no contexto legal. **Biológico, São Paulo**, v. 70, n. 2, p. 49-50, 2008.

THOMPSON, F. C. 2008. **Nomenclator Status Statistics. The Diptera Site - The BioSystematic Database of World Diptera**. Disponível em: <<http://www.sel.barc.usda.gov/diptera/names/Status/bdwdstat.htm>>. Acessado em 07/08/2015.

TRIPLEHORN, C. A.; JOHNSON, N. F. **Estudo dos insetos**. Tradução da 7ª Edição de Borror and DeLong's introduction to the study of insects. São Paulo: Cengage Learning, 2011. ISBN: 978-85-2210-799-5

TEIXEIRA, D. M.; GUIMARÃES, J. H.; PAPAVERO, N. Myiasis in man and animals in the Neotropical Region. **FAPESP**, 1999.

THYSSEN, P. J. A aplicação da análise molecular na Entomologia Forense. In: Janyra Oliveira-Costa. (Org.). **Entomologia Forense Quando os insetos são vestígios**. Campinas: Millennium, 2007. ISBN: 8576252279.

TOTTI, R.; VENCOSKY, R.; BATISTA, L. A. R. Utilização de métodos de agrupamentos hierárquicos em acessos de *Paspalum* (Graminea (Poaceae)). **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v. 22, n. 1, p. 25-35, 2004.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725-2729, 2013.

TAMURA, K.; NEI, M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. **Molecular biology and evolution**, v. 10, n. 3, p. 512-526, 1993.

- URURAHY-RODRIGUES, A.; RAFAEL, J. A.; PUJOL-LUZ, J. R. Temporal distribution of blowflies of forensic importance (Diptera: Calliphoridae), in man-size domestic pigs carcasses, in the Forest Reserve Adolpho Ducke, Manaus, Amazonas, Brazil. **EntomoBrasilis**, v. 6, n. 1, p. 9-22, 2013.
- VELÁSQUEZ, Y. A checklist of arthropods associated with rat carrion in a montane locality of northern Venezuela. **Forensic Science International**, v. 174, n. 1, p. 68-70, 2008.
- 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, n. 1, p. 145, 2013.
- VASCONCELOS, S. D.; BARBOSA, T. M.; OLIVEIRA, T. P. B. Diversity of forensically-important dipteran species in different environments in northeastern Brazil, with notes on the attractiveness of animal baits. **Florida Entomologist**, v. 98, n. 2, p. 770-775, 2015.
- VASCONCELOS, S. D.; SALGADO, R. L. First Record of Six Calliphoridae (Diptera) Species in a Seasonally Dry Tropical Forest in Brazil: Evidence for the Establishment of Invasive Species. **Florida Entomologist**, v. 97, n. 2, p. 814-816, 2014.
- WIEGMANN, B. M. et al. Episodic radiations in the fly tree of life. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 14, p. 5690-5695, 2011.
- WALLMAN, J. F.; DONNELLAN, S. C. The utility of mitochondrial DNA sequences for identification of forensically important blowflies (Diptera: Calliphoridae). In southeastern Australia. **Forensic Science International**, v. 120, n. 1, p. 60-67, 2001.
- WELLS, J. D.; STEVENS, J. R. Application of DNA-based methods in forensic entomology. **Annual Review of Entomology**, v. 53, n. 1, p. 103, 2007.
- WEIR, B. S. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, v. 38, p. 1358-1370, 1984.
- WOLFF, M.; URIBE, A.; ORTIZ, A.; DUQUE, P. A preliminary study of forensic entomology in Medellín, Colombia. **Forensic Science International**, v. 120, n. 1, p. 53-59, 2001.
- WRIGHT, S. Evolution and the genetics of population. Chicago: **University of Chicago Press**, 1978.
- ZHANG, D. X.; HEWITT, G. M. Insect mitochondrial control region: a review of its structure, evolution and usefulness in evolutionary studies. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 25, n. 2, p. 99-120, 1997.
- ZHU, G. H. et al. Development changes of cuticular hydrocarbons in *Chrysomya rufifacies* larvae: potential for determining larval age. **Medical and veterinary entomology**, v. 20, n. 4, p. 438-444, 2006.

ZHU, Guang H. et al. Puparial case hydrocarbons of *Chrysomya megacephala* as an indicator of the postmortem interval. **Forensic science international**, v. 169, n. 1, p. 1-5, 2007.

APÊNDICE A – Concentração e pureza total dos nucleotídeos

Amostra	Concentração	260/280	Amostra	Concentração	260/280	Amostra	Concentração	260/280
CG C1_1	61,1	1,61	CG1_1	228,3	1,94	CG2_1	511	2,1
CG C1_2	31	1,48	CG1_2	40,5	1,74	CG2_2	473,6	2,1
CG C1_3	100,9	1,91	CG1_3	154,4	1,94	CG2_3	930	2,1
CG C1_4	95,1	1,93	CG1_4	225	2,04	CG2_4	661,3	2,1
CG C1_5	57,6	1,5	CG1_5	153	1,45	CG2_5	161	2,03
CG C1_6	319,1	1,91	CG1_6	186,5	1,92	CG2_6	602,7	2,05
CG C1_7	137,4	1,71	CG1_7	92,6	1,86	CG2_7	445,5	2,09
CG C1_8	54,2	1,99	CG1_8	62,4	2,04	CG2_8	559	2,1
CG C1_9	75,4	1,69	CG1_9	97,4	1,9	CG2_9	316,3	2,09
CG C1_10	38,5	1,59	CG1_10	182	2	CG2_10	423,9	2,04

ANEXO A – Permissão para coleta de material biológico



SECRETARIA DA SEGURANÇA E DA DEFESA SOCIAL
INSTITUTO DE POLÍCIA CIENTÍFICA

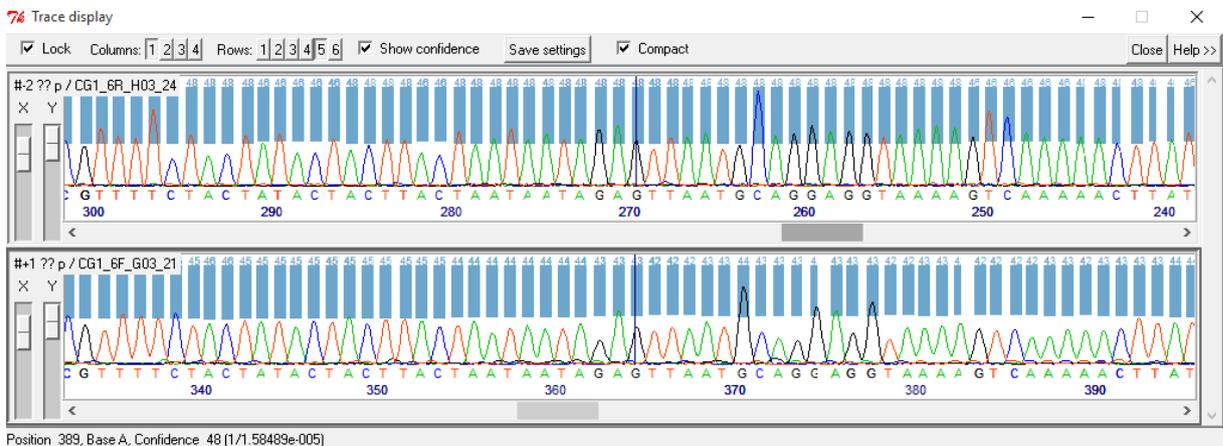
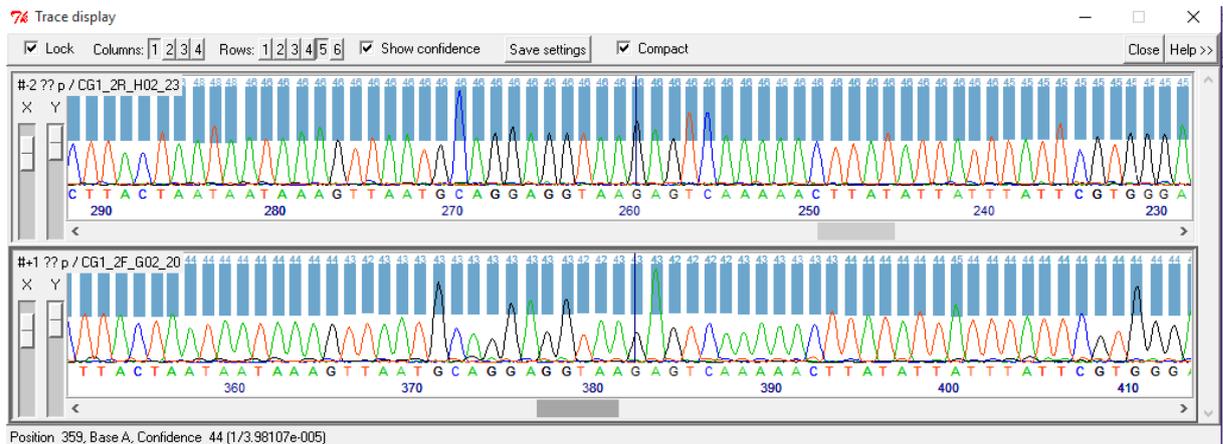
CARTA DE ANUÊNCIA

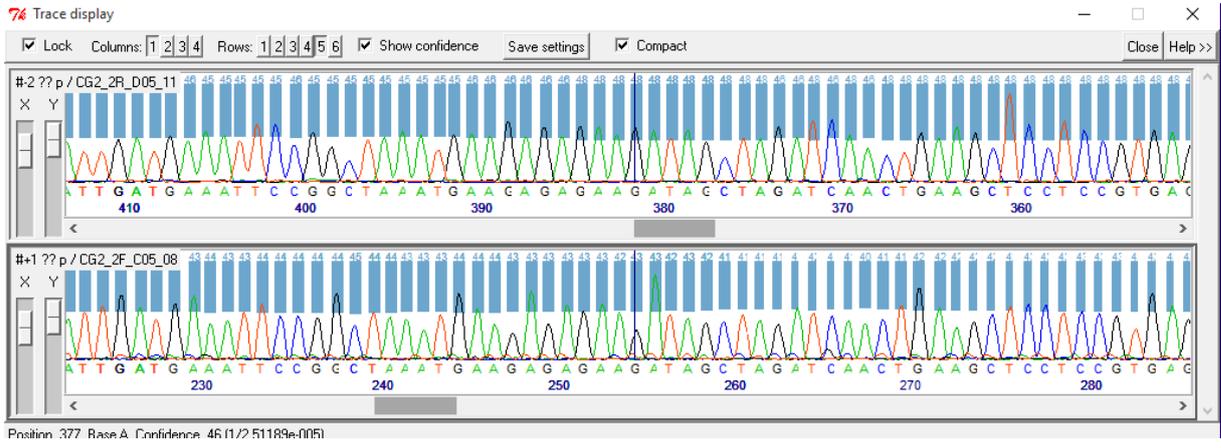
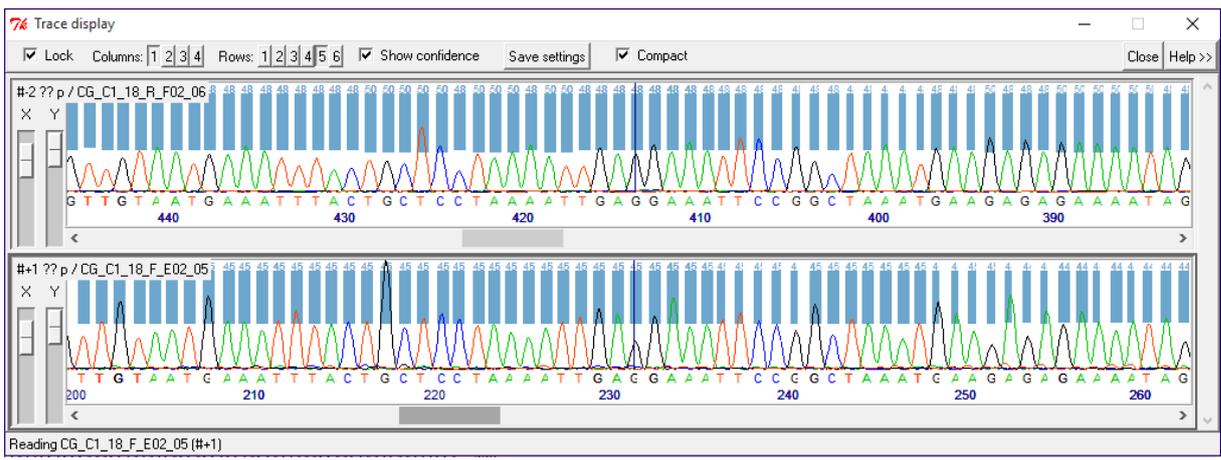
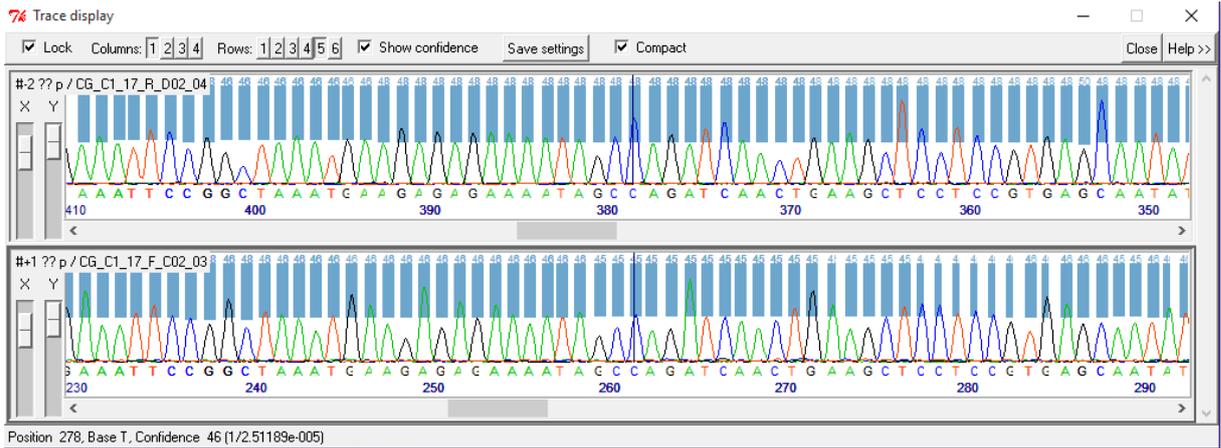
Declaro, para os devidos fins, que a Sr. José Hugo do Rego Silva, CPF 082.782.184-04, residente a Rua José Maia, 49A, Centro, Queimadas, PB, será a responsável pela coleta dos espécimes (larvas e adultos) de califorídeos necessários ao desenvolvimento do projeto **Identificação Molecular de Dípteros recuperados de cadáveres humanos oriundos do Instituto de Medicina Legal dos estados da Paraíba e Pernambuco**, coordenado pelo Dr. Valdir Queiroz Balbino. Informo que a Sr. José Silva é discente do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Estadual da Paraíba e o material biológico a ser obtido nessas coletas é parte essencial ao desenvolvimento de seu projeto de conclusão de curso. Informo ainda, que o citado discente cumprirá os requisitos da Resolução 466/12 e suas complementares, comprometendo-se a utilizar os dados e materiais coletados exclusivamente para os fins da pesquisa.

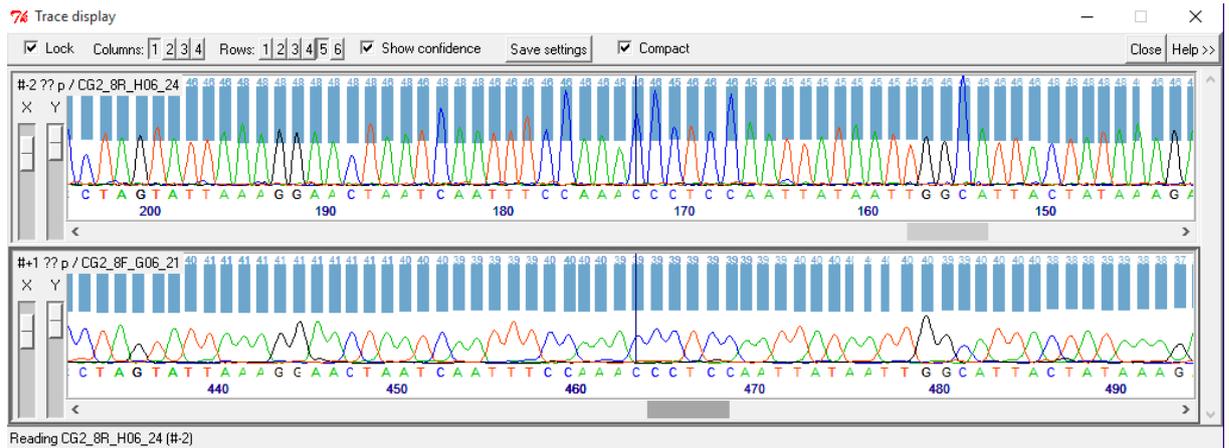
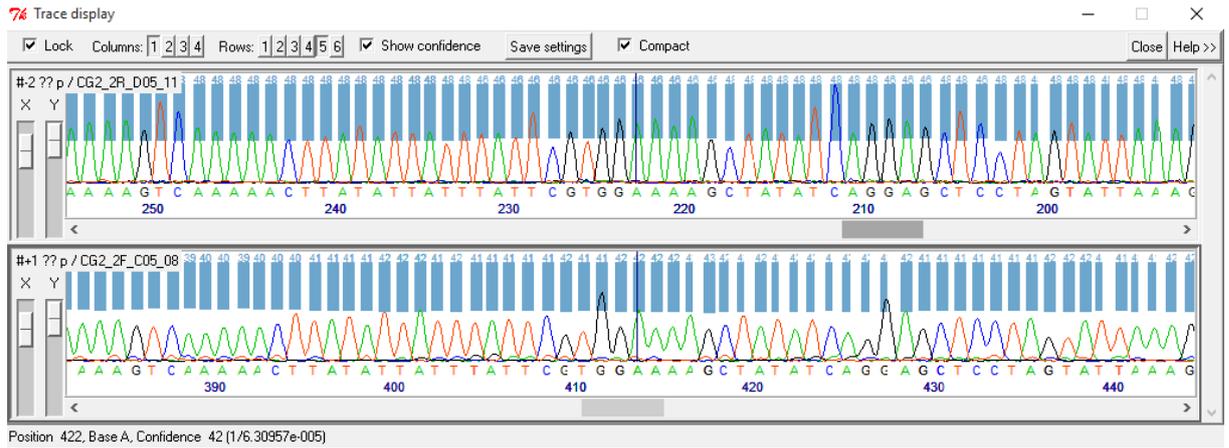
João Pessoa, 12 de agosto de 2014


Humberto Jorge de Araújo Pontes
Diretor Geral do IPC

ANEXO B – Cromatogramas e as respectivas mutações apontadas por cursor, bem como seus valores de confiança (Phred) respectivos.







ANEXO C – Cromatogramas e as respectivas mutações apontadas por cursor, bem como seus valores de confiança (Phred) respectivos.

