



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

Giovana Menezes Nunes

**Citogenética, Citotaxonomia e Cariossistemática de moscas de
importância forense**

São José do Rio Preto
2018

Giovana Menezes Nunes

**Citogenética, Citotaxonomia e Cariossistemática de moscas de
importância forense**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências, área de concentração em Genética e Biologia Evolutiva, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biociências do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Orientadora: Profa. Dra. Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira

São José do Rio Preto
2018

Nunes, Giovana Menezes.

Citogenética, Citotaxonomia e Cariossistemática de moscas de importância forense / Giovana Menezes Nunes . -- São José do Rio Preto, 2018

80 f. : il.

Orientador: Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Citogenética. 2. Entomologia forense. 3. Cromossomos.
4. Espermatogênese. I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. II. Título.

CDU – 576.3:575

Giovana Menezes Nunes

Citogenética, Citotaxonomia e Cariossistemática de moscas de importância forense

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências, área de concentração em Genética e Biologia Evolutiva, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biociências do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

Profa. Dra. Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto
Orientadora

Profa. Dra. Lilian Castiglioni
FAMERP – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

Profa. Dra. Márcia Maria Urbanin Castanhole Nunes
FAMERP – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
19 de fevereiro de 2018

Local de Realização

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Celular, do Departamento de Biologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP de São José do Rio Preto, com bolsa de estudos financiada pela CAPES.

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, Gilberto e Giselda, a quem agradeço pela vida e amor que incondicionalmente dedicaram a mim, por todos os ensinamentos que proporcionaram meu crescimento pessoal e por todo o apoio as minhas decisões e a minha vida acadêmica.

Agradecimentos

*Agradeço a **Deus**, por iluminar os meus passos.*

*A toda minha família, principalmente aos meus pais **Gilberto e Giselda**, por todo amor, carinho, apoio e compreensão, e aos meus irmãos **Guilherme e Gabriel**, e as minhas primas **Luísa e Laura** pelo incentivo e por estarem sempre presentes em minha vida.*

*Aos meus **amigos** do Laboratório de Biologia Celular, **Amanda, Ana Beatriz, Ana Letícia, Fernanda, Kaio, Nathália, Yara e Yago**, pelos ensinamentos, pelo companheirismo, pela compreensão nos momentos difíceis e por todos os momentos de diversão.*

*A todos os **amigos** da faculdade que de alguma forma fizeram parte desta etapa da minha vida, agradeço pelo apoio e por todo o carinho e amizade. Um agradecimento especial a **Alexandre Mondin, Ana Maria Rocchi, Cecília Banho, Fernando César, Gabriel Oliveira, Luis Felipe Siqueira, Marina Francisquetti e Stephanie Rissati**, pela grande amizade e pela proximidade nos momentos de alegria e de tristeza. Também agradeço aos meus grandes amigos **Ellen Mallagoli, Fernanda Gomes, Ian Siqueira, José Francisco, Maira Coelho, Marília Botelho, Marina Neves, Mônica Mayumi, Rafael Ferreira e Thaís Troleis**, que mesmo distantes, foram imprescindíveis à esta conquista. Obrigada a todos por toda torcida e ajuda, por todos os conselhos e por toda energia positiva emanada não só durante o processo, e sim, por toda a vida. Vocês são muito especiais.*

*A **Profa. Dra. Patricia Jacqueline Thyssen**, colaboradora do projeto, pelo material fornecido ao estudo. Seu auxílio foi fundamental para que esse trabalho fosse concluído com sucesso, então agradeço por todo apoio e conhecimento provido.*

*A minha orientadora **Profa. Dra. Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira**, pela oportunidade, pela amizade, pela paciência, pela confiança, por todos os ensinamentos e por acreditar no meu crescimento.*

*E, por fim, a **CAPES** pela minha bolsa de estudos, ao **Programa de Pós-graduação em Biociências** pela oportunidade de realizar essa pesquisa e a **banca** por ter aceito contribuir com o trabalho.*

"Aprender é a chave que abre todas as portas para o mundo."

Egedenny Rodrigues

Resumo

RESUMO

O desenvolvimento da entomologia forense no país tem sido concretizado pelos estudos de insetos das ordens Diptera e Coleoptera, sendo os dípteros considerados o principal grupo de interesse médico legal. Geralmente, o primeiro grupo de insetos a colonizar um cadáver são as varejeiras, mais especificamente, as moscas da família Calliphoridae e Sarcophagidae, seguido do grupo Fanniidae, presente no quarto e quinto estágio de decomposição do cadáver. Ao se estabelecer as principais diretrizes e metas da entomologia forense no Brasil, destacou-se a necessidade do conhecimento taxonômico dos grupos de interesse forense, uma vez que, sem essas informações, não é possível realizar a identificação segura das espécies. Em casos de espécies próximas evolutivamente, por exemplo, os caracteres morfológicos podem ser insuficientes para diferenciá-las, sendo necessários outros métodos de análise para auxiliar na categorização distinta dos táxons como, por exemplo, análises citogenéticas e moleculares. Assim como pode ocorrer erros na distinção entre as moscas adultas (o que levou a diversas sinonimizadas de espécies dos grupos Sarcophagidae e Fanniidae), para distinguir as larvas é um processo ainda mais complicado, por apresentarem uma morfologia extremamente similar. Dessa forma, o presente projeto teve como objetivo descrever as características citogenéticas de larvas de terceiro *instar* de *Fannia sabrosky* (Seago, 1954) (Fanniidae) e *Peckia (Squamatodes) ingens* (Walker, 1849) (Sarcophagidae) e comparar com os dados citogenéticos descritos na literatura para todas outras espécies da ordem Diptera de importância forense, com ênfase biológica (biologia reprodutiva), taxonômica (citotaxonômica e cariosistemática) e evolutiva. Nossos resultados demonstraram que *P. (S.) ingens* ($2n=10$) e *F. sabrosky* ($2n=14$) possuem cariótipos incomuns quando comparados as outras varejeiras ($2n = 12$), o que possibilita distingui-las de outros sarcófagídeos, califorídeos e muscídeos presentes na fauna cadavérica. *P. (S.) ingens* e *F. sabrosky* também puderam ser diferenciadas pelas análises citogenéticas do cromocentro, da heterocromatina, do nucléolo e da atividade transcricional. Além disso, caracterizamos pela primeira vez as fases de espermatogênese dessas espécies, destacando a importância dessas ferramentas para a entomologia forense.

Palavras-chave: Entomologia forense, *Fannia sabrosky*, *Peckia (Squamatodes) ingens*, Varejeiras, Cromossomos, Espermatogênese.

Abstract

ABSTRACT

The development of the forensic entomology in the country has been concretized by the insect studies of the orders Diptera and Coleoptera, being dipterous considered the main group of legal medical interest. Generally, the first group of insects to colonize a corpse are the blowflies, more specifically the flies of the family Calliphoridae and Sarcophagidae, followed by the group Fanniidae, present in the fourth and fifth stage of decomposition of the corpse. When establishing the main guidelines and goals of forensic entomology in Brazil, the need for taxonomic knowledge of forensic interest groups was emphasized, since, without this information, it is not possible to carry out the safe identification of the species. In cases of evolutionarily close species, for example, morphological characters may be insufficient to differentiate them, and other methods of analysis are necessary to aid in the distinct categorization of taxa such as cytogenetic and molecular analyzes. As errors can occur in the distinction between adult flies (which led to several species synonyms of Sarcophagidae and Fanniidae), to distinguish the larvae is an even more complicated process, because they present an extremely similar morphology. Thus, the present project aims to describe the cytogenetic characteristics of larvae from the third instar of *Fannia sabrosky* (Seago, 1954) (Fanniidae) and *Peckia (Squamatodes) ingens* (Walker, 1849) (Sarcophagidae) and compare it with the cytogenetic data described in the literature for all other species of the order Diptera of forensic importance, with biological emphasis (reproductive biology), taxonomic (cytotaxonomic and karyosystematic) and evolutionary. Our results showed that *P. (S.) ingens* ($2n = 10$) and *F. sabrosky* ($2n = 14$) have uncommon karyotypes when compared to others blowflies ($2n = 12$), which makes it possible to distinguish them from others sarcophagids, calliphorids and muscids present in the cadaverous fauna. *P. (S.) ingens* and *F. sabrosky* could also be differentiated by cytogenetic analyzes of chromocenter, heterochromatin, nucleolus and transcriptional activity. In addition, we characterize for the first time the phases of spermatogenesis of these species, highlighting the importance of these tools for forensic entomology.

Key-words: Forensic entomology, *Fannia sabrosky*, *Peckia (Squamatodes) ingens*, Blowflies, Chromosomes, Spermatogenesis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Introdução. Larvas de 3º instar de moscas necrófagas.....	24
Figura 2. Material e Métodos. Amostras das larvas de <i>P. (Squamatodes) ingens</i> e <i>F. sabrosky</i> armazenadas em metanol ácido acético.....	31
Figura 3. Material e Métodos. Amostras das larvas de <i>C. albiceps</i> , <i>C. putoria</i> e <i>C. megacephala</i> armazenadas em metanol ácido acético.....	31
Figura 4. Material e Métodos. Larvas de 3º instar utilizadas no estudo.....	32
Figura 5. Material e Métodos. Moscas necrófagas adultas do gênero <i>Chrysomya</i>	32
Figura 6. Material e Métodos. Moscas necrófagas adultas das famílias Fanniidae e Sarcophagidae.....	32
Figura 7. Discussão. Estágios de decomposição observados em carcaças de suínos (<i>Sus scrofa</i> L.), expostas no município de Cabreúva, SP, Brasil.....	63
Figura 1A. Resultados. Artigo 1. Cariótipo de <i>Peckia (Squamatodes) ingens</i>	45
Figura 1B. Resultados. Artigo 1. Cariótipo de <i>Fannia sabrosky</i>	46
Figura 2. Resultados. Artigo 1. Características citogenéticas de <i>Peckia (Squamatodes) ingens</i>	49
Figura 3. Resultados. Artigo 1. Características citogenéticas de <i>Fannia sabrosky</i>	50
Figura 1. Resultados. Artigo 2. Espermatogênese de <i>Peckia (Squamatodes) ingens</i>	59
Figura 2. Resultados. Artigo 2. Espermatogênese de <i>Chrysomya albiceps</i> ..	60
Anexo 1A, B, C, D, E. Resultados. Artigo 1. Cariótipo de <i>Peckia (Squamatodes) ingens</i>	47
Anexo 2A, B, C, D. Resultados. Artigo 1. Cariótipo de <i>Fannia sabrosky</i>	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Cariótipos de diferentes espécies das famílias Sarcophagidae, Calliphoridae, Muscidae e Fanniidae encontradas em cadáveres.....	51
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

SUMÁRIO

1	Introdução.....	22
2	Objetivos	29
2.1	Objetivo geral	29
2.2	Objetivos específicos	29
3	Material e Métodos.....	31
3.1	Obtenção e procedência das espécies	31
3.2	Órgão analisado	33
3.3	Fixação dos túbulos seminíferos.....	33
3.4	Preparação das lâminas	33
3.5	Técnicas citogenéticas convencionais e moleculares	33
3.5.1	Azul de Toluidina	33
3.5.2	DAPI.....	33
3.5.3	Fluorocromo Acridine Orange	34
3.5.4	Impregnação por íons prata	34
3.5.5	Orceína Lacto-Acética.....	34
3.6	Forma de análise dos resultados	34
4	Resultados	37
4.1	Artigo I - Citogenética como uma ferramenta para a entomologia forense: os casos de <i>Peckia (Squamatodes) ingens</i> e <i>Fannia sabrosky</i>	37
4.2	Artigo II - Novos dados biológicos sobre moscas com importância forense: espermatogênese de <i>Peckia (Squamatodes) ingens</i> , <i>Fannia sabrosky</i> , <i>Chrysomya albiceps</i> , <i>C. putoria</i> e <i>C. megacephala</i>	52
5	Discussão	62
6	Conclusão	67
7	Referências.....	69
8	Apêndice.....	78

1 Introdução

A entomologia forense é caracterizada como a ciência aplicada ao estudo dos insetos, ácaros e outros artrópodes na medicina legal (BALTAZAR et al., 2011). O estudo da entomofauna cadavérica, baseado na sucessão entomológica da carcaça, é a aplicação mais importante da entomologia forense. A diferença na exploração do cadáver, ao longo de cada etapa de decomposição, em conjunto com o conhecimento do tempo ocupado por cada estágio de desenvolvimento do inseto no cadáver (levando em consideração aspectos abióticos), possibilitam a utilização desses invertebrados para auxiliar na estimativa do intervalo pós-morte, ou mais conhecido como “intervalo *post-mortem*” (CATTS; GOFF, 1992; OLIVEIRA-COSTA, 2011).

Geralmente, o primeiro grupo de insetos a colonizar um cadáver são as varejeiras causadoras de miíases secundárias, tendo hábitos saprófagos, podendo ser parasitas facultativos ou obrigatórios. Muitas dessas moscas são de grande importância médico-veterinária no Brasil devido ao seu papel como principais insetos-pragas e vetores de patógenos, além de serem consideradas importantes evidências legais na entomologia forense (AZEREDO-ESPIN; LESSINGER, 2006).

Desse modo, os grupos de insetos da família Calliphoridae, Sarcophagidae e Muscidae se caracterizam por estarem presentes nos estágios iniciais de decomposição, colonizando o cadáver de duas a três horas após sua exposição, sendo atraídos pelos odores e gases liberados durante o processo pós-morte de decomposição da matéria orgânica. Já os grupos de insetos da família Sphaeroceridae, Piophilidae, Fanniidae e Phoridae estão, normalmente, presentes no quarto e quinto estágio, em que são atraídos pelas gorduras rançosas (fermentação butírica) e fermentação amoniacal, com deterioração do tecido podre, ocorrendo de três a seis meses após a morte do indivíduo (CAMPOBASSO et al., 2001).

As varejeiras do gênero *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) são um exemplo de moscas que além de transmitirem doenças humanas (MONZÓN et al., 1991; LINDSAY et al., 2012), e serem usualmente as primeiras a colonizarem o cadáver, estão presentes em maior abundância na fauna cadavérica (CARVALHO et al., 2004). Entre as espécies do gênero *Chrysomya*, *C. albiceps* (Wiedemann, 1819), *C. putoria* (Wiedemann, 1818) e *C. megacephala* (Fabricius, 1794) são consideradas de grande relevância forense em regiões urbanas (CARVALHO et al., 2004).

Devido à importância destas três espécies (figura 5) para a saúde pública e para a medicina legal, foram realizados estudos para melhor compreensão da taxonomia (GRELLA et al., 2015), genética (PARISE-MALTEMPI; AVANCINI, 2001), ecologia (CARVALHO et al., 2004) e o desenvolvimento dessas varejeiras em diferentes ambientes (THYSSEN et al., 2014).

Já o segundo grupo de insetos de maior interesse forense no Brasil são os besouros, pertencentes à ordem Coleoptera. Na carcaça são encontrados tanto em sua fase imatura (larvas) quanto em sua fase adulta, sendo as famílias Scarabaeidae, Cleridae, Dermestidae, Histeridae, Silphidae e Staphylinidae de maior relevância no grupo (CARVALHO et al., 2000).

Dessa forma, a taxonomia, em conjunto com aspectos ecológicos e biológicos desses insetos, é considerada como aspecto fundamental para os estudos forenses (PUJOL-LUZ et al., 2008). Os autores, ao estabelecerem as principais diretrizes e metas da entomologia forense no Brasil, destacam a necessidade do conhecimento taxonômico dos grupos de interesse forense, uma vez que, sem essas informações, não é possível realizar a identificação segura das espécies.

Sendo assim, quando as espécies são próximas evolutivamente, os caracteres morfológicos podem ser insuficientes para diferenciá-las, sendo necessário combinar diversos métodos de análises que contribuam para uma categorização distinta dos táxons. Um exemplo disso é a relação entre a espécie *Chrysomya putoria* com *C. chloropyga*, *C. albiceps* e *C. rufifacies* que são relacionadas do ponto de vista morfológico e cromático, respectivamente, o que acarretou em confusão por diversos autores (ZUMPT, 1965; GRELLA et al., 2015).

Isso demonstra como uma identificação imprecisa dessas espécies, principalmente em áreas em que se sobrepõem, pode comprometer a investigação, já que apresentam importância tanto para estudos ecológicos, quanto para entomologia forense. Sendo assim, quando o uso de caracteres morfológicos não é confiável, análises moleculares e citogenéticas podem ser ferramentas eficientes para auxiliar na identificação de moscas varejeiras de importância forense (PARISE-MALTEMPI; AVANCINI, 2000; CHIRINO et al., 2015; GRELLA et al., 2015).

Além disso, as larvas de moscas varejeiras, comumente, são muito semelhantes morfolologicamente (figura 1) e a identificação taxonômica incerta ou incorreta dessas larvas

e/ou de seus estágios larvais pode trazer consequências imprevisíveis tanto para espécies utilizadas na terapia larval, quanto aquelas de importância forense. Portanto, os estudos citogenéticos têm valor significativo por permitirem a diferenciação entre espécies crípticas e/ou morfologicamente parecidas, particularmente em seus estádios larvais, e fornecem informações e caracteres diagnósticos úteis ao nível da espécie (SRIVASTAVA et. al., 2012; CHIRINO et. al., 2015).

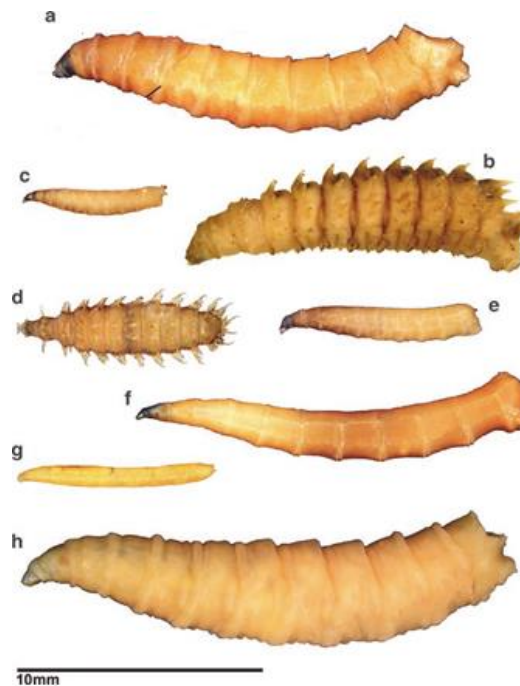


Figura 1. Larvas de 3º instar de moscas necrófagas. a.Calliphoridae (*Calliphora vomitoria*); b.Calliphoridae (*Chrysomya albiceps*); c. Sepsidae (*Nemopoda nitidula*); d. Fanniidae (*Fannia coracina*); e. Heleomyzidae (espécie não identificada); f. Muscidae (*Hydrotaea dentipes*); g. Piophilidae (*Stearibia foveolata*); h. Sarcophagidae (*Sarcophaga caerulescens*) (Szpila, 2010).

O gênero *Lucilia*, por exemplo, apresenta espécies com autossomos menos variáveis e raramente heterocromáticos em comparação com os cromossomos sexuais, os quais apresentam uma considerável variação interespecífica no tamanho e na forma. *Lucilia illustris* tem um cromossomo X relativamente longo em relação a *L. ampullacea* e *L. cesar* que apresentam cromossomos sexuais heteromórficos curtos (CHIRINO et. al., 2015). Já os cromossomos de *L. sericata*, corados com a técnica de bandamento C, apresentaram bandas intersticiais positivas no braço longo do par de cromossomos II, que não são observadas em outras moscas varejeiras (MORERA et al., 2011). As análises citogenéticas também foram fundamentais para ressaltar o *status* específico de *Chrysomya*

chloropyga, espécie morfológicamente semelhante a *C. putoria* (BOYES; SHEWELL, 1975; ÜLLERICH, 1976) destacando, dessa forma, a aplicabilidade de análises citotaxonômicas para diferenciar espécies de importância forense.

O gênero *Fannia* (Robineau-Desvoidy, 1830) é encontrado em todas as regiões biogeográficas, com exceção dos pólos, sendo o maior gênero da família Fanniidae, com aproximadamente 260 espécies. As larvas desse gênero são saprófagas, podendo se desenvolver em matéria orgânica animal, vegetal, e até em fungos e fezes. Já as moscas adultas são encontradas em áreas de florestas, sobre arbustos ou em flores. Além disso, possuem grande importância econômica por terem hábito sinantrópico, e estão relacionadas à decomposição de cadáveres, tendo importância na entomologia forense (WENDT; CARVALHO, 2009).

No Brasil, comprovou-se que, ao menos, 18 espécies estão associadas a atividades humanas (CARVALHO; MOURA; RIBEIRO, 2002) e diversas outras foram redescritas por problemas de classificação taxonômica (WENDT; CARVALHO, 2009). *F. tigripeda*, por exemplo, descrita pela primeira vez por Xue, Wang e Li (2001), quando reexaminado seu holótipo, foram encontrados diversos caracteres morfológicos semelhantes a *F. stigi*, descrita por Rognes em 1982, especialmente a terminália masculina. Sendo assim, Wang, Li e Zhang (2011), sugerem que *F. tigripeda* seja sinônimo de *F. stigi*. Por outro lado, *F. nudifemorata*, apesar de sua semelhança morfológica com *F. ardua* e *F. umbrosa*, foi classificada como uma nova espécie (WANG; LI; ZHANG, 2011).

Encontrada na Guiana e no Brasil, mais especificamente no Rio de Janeiro, São Paulo e Paraná, *F. sabrosky* (figura 6) é uma das espécies que se tem menos informação dentro do grupo (WENDT; CARVALHO, 2009). O conhecimento taxonômico de *Fannia* é limitado a análises morfológicas sendo reconhecidos, até o momento, oito grupos e três subgrupos nessa área (ALBUQUERQUE; PAMPLONA; CARVALHO, 1981) e estudos filogenéticos estão ausentes, sendo assim, expandir o conhecimento no gênero *Fannia* com estudos citogenéticos pode contribuir para a biologia e taxonomia dessas moscas de importância forense.

O grupo Sarcophagidae está dividido em três subfamílias, Miltogramminae, Paramacronychiinae e Sarcophaginae, sendo os dois últimos grupos irmãos. As moscas da subfamília Sarcophaginae são, em sua maioria, neotropicais, apresentando diferentes hábitos, podendo ser necrófagos, predadores ou parasitas causadores de mífases. Estudos recentes comprovam que este grupo é monofilético (RUIZ, 2009; BUENAVENTURA;

PAPE, 2015), porém as relações filogenéticas de seus gêneros e subgêneros ainda não foram completamente estudadas. O gênero *Peckia*, presente nesta subfamília, é um exemplo de como as abordagens conceituais e metodológicas utilizadas podem diferir consideravelmente, pois alguns estudos baseados em dados morfológicos sugerem que esse grupo seja monofilético, mas quando baseadas em dados moleculares, o grupo apresenta-se como parafilético (BUENAVENTURA; PAPE, 2015).

Outro problema encontrado é que as características morfológicas estão sujeitas à homoplasia devido à convergência evolutiva ou à caracterização incorreta do observador. Assim, basear as análises filogenéticas apenas em caracteres morfológicos tem sido menos recomendável (SCOTLAND; OLMSTEAD; BENNETT, 2003). Acreditava-se que *Peckia* era sustentado por sete estados de caráter homoplásticos (GIROX; PAPE; WHEELER, 2010), porém estudos recentes mostraram que várias dessas características não estavam presentes em todas as espécies do gênero, tornando sua condição monofilética questionável apenas com base na morfologia. Dessa forma, Buenaventura e Pape (2015) reuniram todas as informações contidas na literatura e realizaram novas análises sobre a filogenia do grupo, corroborando por meio de dados morfológicos e moleculares que *Peckia* é um grupo monofilético.

As espécies presentes na subfamília Sarcophaginae são muito similares em relação à sua morfologia externa, dessa forma, a identificação dessas espécies se dá pelo estudo da terminália masculina (RUIZ, 2009; BUENAVENTURA; PAPE, 2015). Em relação à citogenética, pesquisas anteriores sobre o cariótipo de algumas espécies de Sarcophagidae revelaram que o tamanho de seus cromossomos sexuais varia muito de espécie para espécie, diferente da morfologia dos autossomos que segue mais uniforme em toda a família (PARISE-MALTEMPI; AVANCINI, 2000; SRIVASTAVA et. al., 2012), mostrando-se como uma potencial ferramenta taxonômica.

O gênero *Peckia* (Robineau-Desvoidy, 1830) é o mais rico em espécies necrófagas, contendo 67 espécies distribuídas em cinco subgêneros agrupados em dois clados, sendo eles, *Pattonella* + *Squamatodes* e *Sarcodexia* (*Peckia* + *Euboettcheria*). Assim como *Fannia*, em *Peckia* também existem casos de sinonimização. O subgênero *Sarcodexia*, por exemplo, é sinônimo do subgênero *Peckia*, e a espécie *Peckia (Peckia) adolenda* foi excluída do grupo e transferida para o gênero *Retrocitomyia*, devido a sua maior

similaridade, sendo considerada por alguns autores como “sinônima” deste gênero (RUIZ, 2009; BUENAVENTURA; PAPE, 2015).

Uma espécie pouco estudada, mas de extrema relevância desse grupo é a *Peckia (Squamatodes) ingens* (figura 6), encontrada em regiões neotropicais, mais especificamente na Argentina, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Equador, Guiana, México, Nicarágua, Panamá, Paraguai, Peru, Porto Rico e Venezuela. No Brasil, sua distribuição também é grande, sendo encontrada no Amazonas, Bahia, Ceará, Distrito Federal, Mato Grosso, Minas Gerais, Pará, Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro e São Paulo (RUIZ, 2009). Todas as espécies de *Peckia* são larvíparas, o que significa que os ovos eclodem dentro da mãe e, em seguida, as larvas são colocadas no substrato, estando presentes durante a decomposição de cadáveres de animais, especialmente de seres humanos (BARROS; MELLO-PATIU; PUJOL-LUZ, 2008). Os estudos sobre a citogenética desse grupo são extremamente escassos, dessa forma, os caracteres genéticos, em conjunto com os caracteres morfológicos e taxonômicos, são informações relevantes nos estudos forenses (RUIZ,2009).

Objetivos

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Dessa forma, o presente projeto teve como objetivo descrever as características citogenéticas de larvas de terceiro *instar* de *Fannia sabrosky* (Seago, 1954) (Fanniidae) e *Peckia (Squamatodes) ingens* (Walker, 1849) (Sarcophagidae) e comparar com os dados citogenéticos descritos na literatura para todas outras espécies da ordem Diptera de importância forense, com ênfase biológica (biologia reprodutiva), taxonômica (citotaxonomia e cariosistemática) e evolutiva. Com foco ainda na biologia reprodutiva, os dados foram comparados com outras três espécies do gênero *Chrysomya*, sendo elas *C. albiceps*, *C. megacephala* e *C. putoria*.

2.2 Objetivos específicos

- a) Descrição do cariótipo de *F. sabrosky* e *P. (Squamatodes) ingens*, com foco nas análises das possíveis diferenças cromossômicas.
- b) Descrição da espermatogênese de *C. albiceps*, *C. megacephala*, *C. putoria*, *F. sabrosky* e *P. (Squamatodes) ingens*, com foco no conhecimento da biologia reprodutiva dessas moscas de importância forense.
- c) Análise do padrão de heterocromatina constitutiva de *F. sabrosky* e *P. (Squamatodes) ingens*, com foco nas possíveis diferenças da disposição da heterocromatina constitutiva nos cromossomos/cromatina desses insetos.
- d) Caracterização do nucléolo das células de *F. sabrosky* e *P. (Squamatodes) ingens*.
- e) Agrupamento de todas as informações citogenéticas e cariotípicas descritas para moscas de importância forense, com foco cariosistemático.

3 Material e Métodos

3.1 Obtenção e procedência das espécies

Foram analisadas citogeneticamente, pelo menos, dez larvas machos de terceiro instar de cada espécie (figura 4) [*C. albiceps*, *C. megacephala*, *C. putoria*, *F. sabrosky* e *P. (Squamatoles) ingens*], provenientes do Laboratório de Entomologia Integrativa, instalado no Instituto de Biologia da UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brasil, sob coordenação da Profa. Dra. Patricia Jacqueline Thyssen, colaboradora do presente projeto. O material foi armazenado em metanol ácido acético (Figura 2 e 3) e classificado a nível de espécie.

A coordenada geográfica do local de coleta das espécies de *C. albiceps*, *C. megacephala*, *C. putoria* e *F. sabrosky* é 22°54'23" S; 47°3'42" O e de *P. (Squamatoles) ingens* é 23°18'21" S; 47°7'55" O.

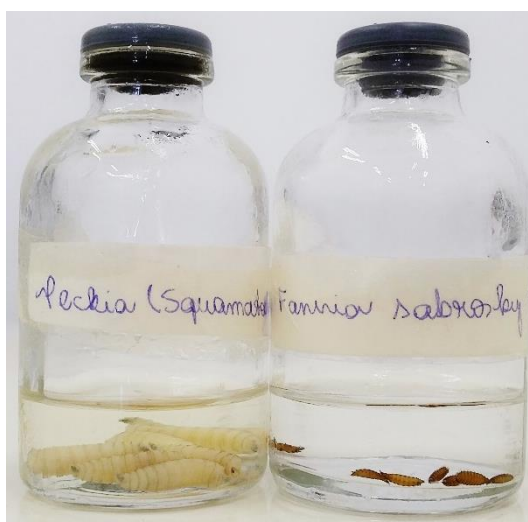


Figura 2. Amostras das larvas de *P. (Squamatoles) ingens* e *F. sabrosky*, armazenadas em metanol ácido acético.



Figura 3. Amostras das larvas de *C. albiceps*, *C. putoria* e *C. megacephala*, armazenadas em metanol ácido acético.



Figura 4. Larvas de 3º instar utilizadas no estudo. A. *F. sabrosky*; B. *C. albiceps*; C. *C. putoria*; D. *C. megacephala*; E. *P. (Squamatodes) ingens*.

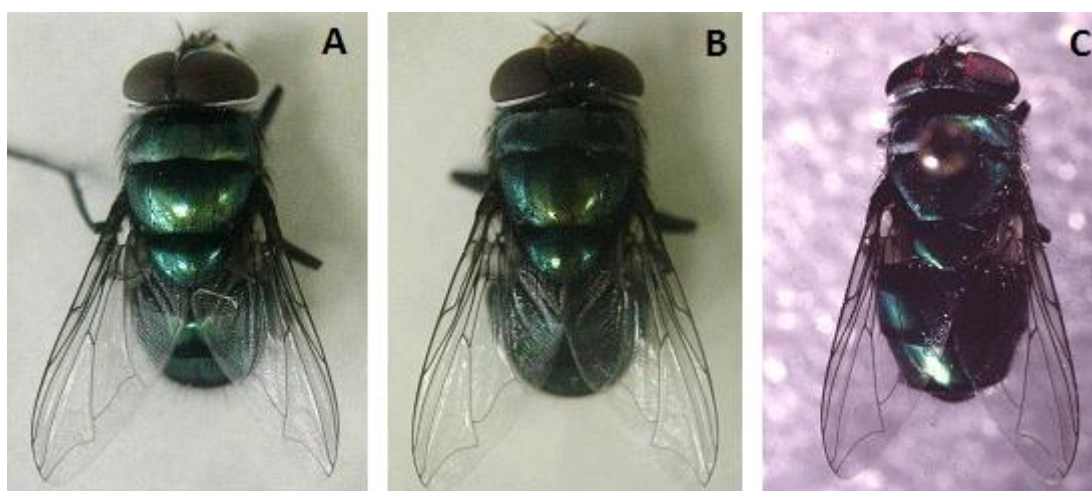


Figura 5. Moscas necrófagas adultas do gênero *Chrysomya*. A. *C. albiceps*; B. *C. megacephala*; C. *C. putoria*. Adaptado de Linhares e Thyssen (2007).

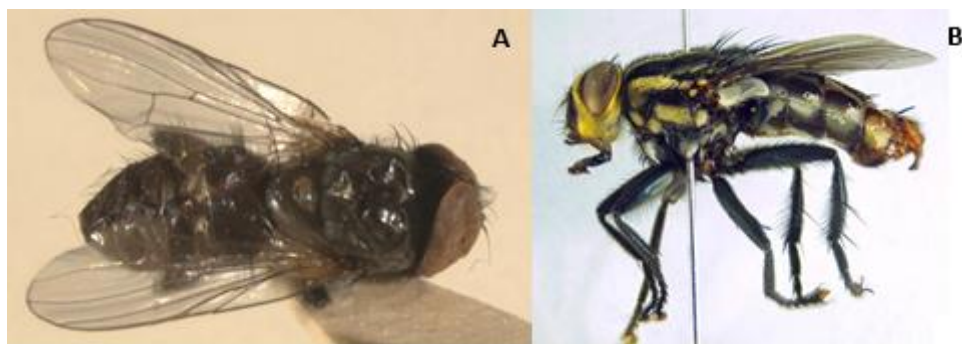


Figura 6. Moscas necrófagas adultas das famílias Fanniidae e Sarcophagidae, respectivamente. A. *F. sabrosky*; B. *P. (Squamatodes) ingens*.

3.2 Órgão analisado

Foram analisados os túbulos seminíferos de, pelo menos, dez larvas machos de terceiro *instar* de cada espécie de Diptera.

3.3 Fixação dos túbulos seminíferos

Após sua retirada, os túbulos seminíferos foram transportados para a solução fisiológica (Demerec), onde foi realizada a limpeza e individualização desses túbulos. Posteriormente, cada túbulo foi colocado em um recipiente de vidro contendo 3 partes de metanol para 1 ácido acético, e conservado no *freezer* à -20°C.

3.4 Preparação das lâminas

Para o preparo das lâminas, o material biológico foi colocado em uma lâmina limpa, onde foram realizados dois banhos de água destilada, por cinco minutos cada. Posteriormente, foi acrescentada uma gota de ácido acético 45%, durante 10 minutos. Após esse período, os túbulos seminíferos foram dilacerados e sobre esse material foi colocada uma lamínula para a realização do esmagamento celular. A remoção da lamínula ocorreu em nitrogênio líquido.

3.5 Técnicas citogenéticas convencionais e moleculares

O protocolo de cada técnica pode ser encontrado na seção Apêndice.

3.5.1 Azul de Toluidina (MELLO; VIDAL, 1980)

Princípio da técnica: Utilizada para análise da cromatina e dos cromossomos das células da linhagem germinativa.

3.5.2 DAPI (SCHWEIZER, 1976)

Princípio da técnica: A técnica de DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) tem sido utilizada com o objetivo de obter informações sobre a natureza da heterocromatina constitutiva com

respeito à sua composição de bases. Esse corante cora preferencialmente sequências de DNA ricas em pares de bases AT.

3.5.3 Fluorocromo Acridine Orange (VIDAL, 1987)

Princípio da técnica: O fluorocromo Acridine Orange ou Alaranjado de Acridina é um corante metacromático, o qual fornece emissões fluorescentes de diferentes cores para DNA e RNA. Ao se ligar eletrostaticamente aos grupamentos fosfatos dos ácidos nucleicos (RNA ou DNA fita simples), esse fluorocromo produz uma coloração vermelha, mas quando intercalado com a dupla-hélice do DNA, gera uma coloração verde/amarela fluorescente quando excitado por luz azul.

3.5.4 Impregnação por íons prata (HOWELL; BLACK, 1980)

Princípio da técnica: A técnica impregnação por íons prata é um dos métodos clássicos para a identificação das Regiões Organizadoras Nucleolares (RONs), nos cromossomos metafásicos, e das áreas nucleolares, nos núcleos interfásicos. A prata tem afinidade às proteínas associadas ao RNAr transcrito nos sítios de DNAr, tanto naqueles transcricionalmente ativos quanto naquelas que já transcreveram, sendo as proteínas B23 (numatrina) e C23 (nucleolina) as principais proteínas nucleolares a se impregnar. Enquanto a C23 indica a presença da cromatina descondensada ligada à RON, a B23 indica a localização dos precursores ribossomais (OCHS; BUSCH, 1984; CASSEB-HASSAN; AZEREDOOOLIVEIRA, 1999). Diante disso, a aplicação da técnica de impregnação por íons prata permite o estudo da nucleologênese nos eucariotos.

3.5.5 Orceína Lacto-Acética (DE VAIO et al., 1985, com modificações de acordo com ALEVI et al., 2012)

Princípio da técnica: Essa técnica é amplamente utilizada nos estudos dos cariótipos e da espermatogênese, uma vez que é simples, permite facilmente a visualização dos cromossomos e das fases da meiose, assim como ressalta as regiões heteropicnóticas.

3.6 Forma de análise dos resultados

O material submetido às técnicas citogenéticas convencionais foi analisado ao microscópio de luz *Jenaval* (Zeiss) e as moleculares ao microscópio de fluorescência

Olympus BX-FLA, acoplados à câmera digital e ao sistema analisador de imagens (*Axio Vision LE 4.8*, Zeiss -Copyright ©2006-2009 Carl Zeiss Imaging Solutions Gmb H), com aumento de 1000 vezes.

Resultados

4 Resultados

Os resultados serão apresentados na forma de dois artigos.

4.1 Cytogenetics as a tool for forensic entomology: the cases of *Peckia (Squamatodes) ingens* (Walker, 1849) (Diptera, Sarcophagidae) and *Fannia sabrosky* (Seago, 1954) (Diptera, Fanniidae)

Abstract

The first group of insects to colonize one corpse are blowflies, more specifically, the flies of the family Calliphoridae, Sarcophagidae and Muscidae, followed by Fanniidae, present in the fourth and fifth stages of decomposition of the corpse, making them important study tools for forensic entomology. Based on this, the taxonomic knowledge of the forensic interest group is essential, since, without this information, it is not possible to carry out the efficient identification of the species. In cases of evolutionary close species, for example, the morphological characters may be insufficient to differentiate them, other analysis methods are necessary to aid in the distinct categorization of the taxon. Thus, this study aimed to analyze the cytotaxonomy and karyosystematics of larvae from the third instar of *Peckia (Squamatodes) ingens* and *Fannia sabrosky*. Our results demonstrated that *P. (S.) ingens* ($2n=10$) and *F. sabrosky* ($2n=14$) have unusual karyotypes when compared to others blowflies ($2n = 12$), which makes it possible to distinguish them from other sarcophagids, calliphorids and muscids present in the cadaverous fauna. Furthermore, *P. (S.) ingens* and *F. sabrosky* could be differentiated by the cytogenetic analyzes of chromocenter, heterochromatin, nucleolus and transcriptional activity, highlighting the importance of this tool for forensic entomology.

Key-words: Cytotaxonomy; Karyosystematics; Blowflies.

Introduction

The forensic entomology is characterized as a science applied to the study of insects, mite and other arthropods in forensic medicine [4]. The study of the cadaveric entomofauna, based on the entomological succession of the carcass, is the most important application of the forensic entomology. The difference in the exploration of the corpse, during each step of the decomposition, along with the knowledge of the time occupied by every step of the development of the insect in the corpse, enable the use of these invertebrates to help in the estimate of the postmortem interval [9, 19].

Generally, the first group of insects to colonize one corpse is from the order Diptera (blowflies) [3]. The flies of the family Calliphoridae, Sarcophagidae and Muscidae are present in the initial stages of decomposition (colonizing the corpse two to three hours after its exposure), and are attracted by the odors and gases released during the postmortem process of the organic matter decomposition. The flies of the family Sphaeroceridae, Piophilidae, Fanniidae and Phoridae are, usually, present in the fourth and fifth decomposition stages, for being attracted by rancid fat after butyric and ammoniacal fermentation with deterioration of the rotten tissue, which occurs three to six months after the death of the subject [7].

The taxonomy, together with the ecologic and biologic aspects of these insects, are considered as fundamental for forensic studies [25], once it is indispensable to classify correctly the collected species from the corpse for the utilization of these invertebrates in forensic entomology. Blowfly larvae are morphologically very similar and the uncertain or incorrect taxonomy identification of these larvae and/or their larval stages can bring unpredictable consequences to the forensic investigations [10, 31]. Thereby, new approaches, as, for example, cytogenetic studies, can be very important for the differentiation among cryptic species and/or morphologic similar, and can provide useful diagnostic information and characteristics at the species level [10, 29].

Thus, the present work analyzes the cytotaxonomy and karyosystematics of *Peckia (Squamotodes) ingens* (Diptera, Sarcophagidae) and *Fannia sabrosky* (Diptera, Fanniidae), with the purpose of assisting in the correct and rapid differentiation of these blowflies with forensic importance.

Materials and methods

Ten male larvae from the third instar of *P. (S.) ingens* e *Fannia sabrosky*, from the Laboratory of Integrative Entomology, installed at the Institute of Biology of UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brazil, were analyzed. The insects were dissected, their testicles removed, and the seminiferous tubules were lacerated, crushed and put on a blade in liquid nitrogen and colored with lacto-acetic orcein [11], for karyotype and heteropicnotic pattern analysis, with toluidine blue [16], for analysis of heterochromatin pattern, with DAPI [28], for characterization of DNA regions rich in AT, with impregnation by silver ions [13], for characterization of the nucleolus and with Acridine Orange [32], for analysis of DNA and RNA ratio. At least fifty cells for each species were analyzed on a microscope with *Jenaval* (Zeiss) light and fluorescence microscope *Olympus BX-FLA*, attached to the digital camera and to the image analyzer system (Axio Vision LE 4.8, Zeiss). Besides, based on the literature, we brought together the karyotype of the main flies with forensic importance in a table (Table 1).

Results and discussion

P. (S.) ingens presented $2n = 10$ (8A + XY) chromosomes (Figure 1A, Annex 1). This number of chromosomes is uncommon among the sarcophagids, which have scavenger habits present in the initial stages of decomposition, once most analyzed species until now presented $2n = 12$ (Table 1). *F. sabrosky* presented $2n=14$ (12A + XY) chromosomes (Figure 1B, Annex 2). Although there are no reports in the literature on the karyotype of other species present in the final stages of decomposition this number of chromosomes also allows to differentiate it from all the blowflies of Sarcophagidae, Calliphoridae and Muscidae family found in the corpses (Table 1).

The karyosystematics of Diptera of forensic importance was unusual until now, since most species present 12 chromosomes (Table 1). Consequently, other cytogenetic tools were used, such as the size of the sex chromosomes and the constitutive heterochromatin pattern, which made it possible to differentiate species of the genus *Lucilia* [10, 17]. Moreover, the technique of in situ hybridization (FISH) was also used to differentiate species of the genus *Chrysomya* (*C. megacephala* e *C. putoria*) [22] and

Lucilia (*L. cluvia* e *L. sericata*) [10], but the markings were identical and restricted to sex chromosomes.

Cytogenetic analyzes of *P. (S.) ingens* and *F. sabrosky* allowed to differentiate them, because *P. (S.) ingens* presented a heteropicnotic chromocenter (Figure 2A, arrowhead) and heterochromatic (Figure 2B, arrowhead) formed by the sex chromosomes, few blocks of heterochromatin dispersed in the nucleus (Figure 2B, arrow) were shown to be rich in AT (Figure 2C, arrows) and a large nucleolus (Figure 2D, arrow) with high transcriptional activity (Figure 2E, F, arrows) and *F. sabrosky* presented a heteropicnotic chromocenter (Figure 3A, arrowhead), heterochromatic (Figure 3B, arrowhead) and rich in AT (Figure 3C, arrowhead) formed by the sex chromosomes, several heterochromatin regions dispersed in the nucleus (Figure 3B, arrows) that are rich in AT (Figure 3C, arrows), besides several nucleolar corpuscles (Figure 3D, arrow) which had high transcriptional activity (Figure 3E, F, arrows).

The genus *Peckia* is the richest in necrophagous species, containing 67 species distributed in five subgenera grouped in two clades: *Pattonella* + *Squamatodes* and *Sarcodexia* (*Peckia* + *Euboettcheria*) [6]. Morphological studies suggest that this group is monophyletic [12, 20]. However, based on molecular studies, the group appears as paraphyletic [15, 24, 26]. Recently, Buenaventura e Pape (2015) grouped all the morphological and molecular information present in the literature about *Peckia* and support that the genus is a monophyletic group.

Although cytotaxonomic and karyosystematic studies have not yet been performed in the genus *Peckia*, the karyotypes of two species [*Peckia (Euboettcheria)* sp. and *P. (P.) intermutans*] was described as $2n = 12$ (Table 1). This chromosome number is different from that observed for *P. (S.) ingens* ($2n = 10$), highlighting the importance of karyosystematics in the differentiation of *P. (S.) ingens* when compared to the other species of the genus *Peckia*. Besides, the karyotype observed for *P. (S.) ingens* allows it to differentiate it from all other blowflies that initially colonize a corpse (sarcophagids, calliphorids and muscids) with the number of chromosomes described (Table 1) showing as an important taxonomic tool for forensic entomology.

Chromosomal comparisons of these species of the genus *Peckia* to others from the family Sarcophagidae revealed a considerable variation among the sexual chromosomes [which were extremely small when compared to the autosomes (Figure 1)], different from

the morphology of the autosomes which follows more uniform throughout the family [21, 29]. Evolutionary events of chromosomal loss or fusion have been reported for species of the Muscidae family that also present karyotype $2n = 10$, but are of agricultural importance [5, 14, 18, 23, 30]. Taking into account that the type karyotype is $2n = 12$ [because it is present in most sarcophagids, including *Peckia* (Table 1)], possibly, these same events are related to the karyotype evolution of *P. (S.) ingens* when compared to the other species of this genus (Table 1).

The genus *Fannia* is found in all biogeographical regions, with the exception of the poles, being the largest genus of the Fanniidae family, with approximately 260 species [34]. Besides being related to the decomposition of corpses, they are of great economic importance because they have a synanthropic habit [34]. The large number of nucleolar corpuscles and the high metabolic activity observed in the cells of these flies is possibly related to their ability to occupy the most diverse environments, as observed for *Triatoma rubrofasciata*, a cosmopolitan specie of triatomine [2].

In Brazil, it was verified that, at least, 18 species of the genus *Fannia* are associated with human activities [8] and several others presented problems of taxonomic classification and were redescribed [34]. *F. tigripeda*, for example, described by Xue, Wang e Li (2001), presented several similar morphological characters (especially related to male terminalia) to *F. stigi* (described by Rognes em 1982) when had his holotype reexamined (Wang, Li e Zhang, 2011), which led the authors to suggest the synonymization of *F. tigripeda* with *F. stigi*. On the other hand, *F. nudifemorata*, despite being morphologically similar to *F. ardua* and *F. umbrosa*, was classified as a new specie [33].

As the *Fannia* taxonomy is limited to morphological data [1], being phylogenetic studies absent in this important group of flies, the characterization of the chromosomes is relevant to direct the taxonomic and evolutionary knowledge of Fanniidae. *F. sabrosky* presented a very peculiar karyotype ($2n = 14$) when compared to others forensic importance flies (Table 1). Although new studies in the genus *Fannia* and, mainly, in the blowflies that colonize the fourth and fifth stages of cadaveric decomposition must be performed, the karyosystematics showed to be extremely important for the characterization of this species, since the number of chromosomes observed allowed to differentiate it from all other species used in forensic entomology, thus ensuring the correct classification and use of such invertebrates as a tool to estimate the range postmortem.

Conclusion

Accordingly, through the karyotype of *P. (S.) ingens* and *F. sabrosky*, it was possible to distinguish the species from the other sarcophagids, calliphorids and muscids present in the cadaverous fauna, highlighting the importance of this tool for forensic entomology. Furthermore, we highlight that several other cytogenetic tools can also be used to differentiate flies of forensic importance.

References

1. Albuquerque DO, Pamplona D, Carvalho CJB. Contribuição ao conhecimento dos *Fannia* R. D., 1830 da Região Neotropical (Diptera, Fanniidae). Arquivo do Museu Nacional, Rio de Janeiro. 1981;56: 9–34.
2. Alevi KCC, Nascimento JGO, Moreira FFF, Jurberg J, Azeredo-Oliveira MTV. Analysis of Metabolic Activity in Cystic Cells of *Triatoma rubrofasciata* (Hemiptera: Triatominae) and Its Capacity to Occupy Different Environments. African Entomology. 2016;24(1):261-264.
3. Azeredo-Espin AML, Lessinger, AC. Genetic approaches for studying myiasis-causing flies: molecular markers and mitochondrial genomics. Genetica. 2006;126: 111-131.
4. Baltazar FN, Cavallari ML, Carvalho E, Tolezano JE, Muñoz DR. Entomologia forense e saúde pública: relevância e aplicabilidade. Bepa. 2011;8(87): 14-25.
5. Boyes JW, Corey MJ, Paterson HE. Somatic chromosomes of higher Diptera: IX. karyotypes of some Muscid species. Canadian Journal of Zoology. 1964;42(6):1025-1036.
6. Buenaventura E, Pape T. Phylogeny of the *Peckia*-genus group: evolution of male genitalia in the major necrophagous guild of Neotropical flesh flies (Diptera: Sarcophagidae). Org Divers Evol. 2015.
7. Campobasso CP, Di Vella G, Introna F. Factors affecting decomposition and Diptera colonization. Forensic Science International. 2001;120: 18-27.

8. Carvalho CJB, Moura MO, Ribeiro PB. Chave para adultos de dípteros (Muscidae, Fanniidae, Anthomyiidae) associados ao ambiente humano no Brasil. *Revista Brasileira de Entomologia*. 2002;46(2): 107-114.
9. Catts EP, Goff ML. Forensic entomology in criminal investigations. *Annual Review of Entomology*. 1992;37:253-272.
10. Chirino MG, Rossi LF, Bressa MJ, Luaces JP, Merani MS. Comparative study of mitotic chromosomes in two blowflies, *Lucilia sericata* and *L. cluvia* (Diptera, Calliphoridae), by C- and G-like banding patterns and rRNA loci, and implications for karyotype evolution. *Comparative Cytogenetics*. 2015;9(1): 103-118.
11. De Vaio ES, Grucci B, Castagnino AM, Franca ME, Martinez ME. Meiotic differences between three triatomine species (Hemiptera:Reduviidae). *Genetica*. 1985;67:185-191.
12. Giroux M, Pape T, Wheeler TA. Towards a phylogeny of the flesh flies (Diptera: Sarcophagidae): morphology and phylogenetic implications of the acrophallus in the subfamily Sarcophaginae. *Zoological Journal of the Linnean Society*. 2010;158: 740–778.
13. Howell WM, Black DA. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 1980;36(8):1014-1015.
14. Landeen EL, Presgraves DC. Evolution: From Autosomes to Sex Chromosomes – and Back. *Current Biology*. 2013;23(18): 848-850.
15. Marinho, MAT, Junqueira ACM, Paulo DF, Esposito MC, Villet MH, Azeredo-Espin AML. Molecular phylogenetics of Oestroidea (Diptera: Calyptratae) with emphasis on Calliphoridae: Insights into the inter-familial relationships and additional evidence for paraphyly among blowflies. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2012;65: 840–854.
16. Mello MLS. Cytochemistry of DNA, RNA and nuclear proteins. *Brazilian Journal of Genetics*. 1997;20(2):257-264.
17. Morera YA, Bernal DC, Vargas M, Segura NA, García FB. Caracterización citogenética de *Lucilia sericata* (Meigen, 1826) (Diptera: calliphoridae), Cepa Bogotá, Colombia. *Revista Ciencias de la Salud*. 2011;9(2): 111-124.

18. Ohno S. Sex Chromosomes and Sex-linked Genes. Springer Berlin Heidelberg. 1967.
19. Oliveira-Costa J. Entomologia forense: quando os insetos são vestígios. Campinas. Ed. Millenium. 3^a ed. 2011. 520p.
20. Pape T. Catalogue of the Sarcophagidae of the world (Insecta: Diptera). Memoirs on Entomology, International. 1996;8: 5-557.
21. Parise-Maltempo PP, Avancini RMP. Cytogenetics of the neotropical flesh fly *Pattonella intermutans* (Diptera, Sarcophagidae). Genetics and Molecular Biology. 2000;23(3): 563-567.
22. Parise-Maltempo PP, Avancini RMP. C-banding and FISH in chromosomes of the blowflies *Chrysomya megacephala* and *Chrysomya putoria* (Diptera, Calliphoridae). Mem Inst Oswaldo Cruz. 2001;96(3): 371-377.
23. Parise-Maltempo PP, Avancini RMP. Comparative cytogenetic study in Muscidae flies. Braz. J. Biol. 2007;67(4, Suppl.): 945-950.
24. Piwczynski M, Szpila K, Grzywacz A, Pape T. A large-scale molecular phylogeny of flesh flies (Diptera: Sarcophagidae). Systematic Entomology. 2014;39:783–799.
25. Pujol-Luz JR, Arantes LC, Constantino R. Cem anos da entomologia forense no Brasil (1908-2008). Revista Brasileira de Entomologia. 2008;52(4): 485-492.
26. Roback SS. The evolution and taxonomy of the Sarcophaginae (Diptera, Sarcophagidae). Illinois Biological. 1954;23: 1-181.
27. Rognes, K. *Fannia stigi* n. sp. from Scandinavia (Diptera: Fanniidae). Entomologica Scandinavica. 1982;13:325–330.
28. Schweizer, D. Reverse fluorescent chromosome banding with Chromomycin and DAPI. Chromosoma. 1976;58:307-324.
29. Srivastava R, Dabas A, Srivastava R, Gaur P. Qualitative analysis of chromosome from neural ganglia of flesh-flies Sarcophaga. Biochem. Cell. Arch. 2012;12(1): 149-152.
30. Traut W. The evolution of sex chromosomes in insects: Differentiation of sex chromosomes in flies and moths. Eur. J. Entomol. 1999;96: 227-235.
31. Vairo KP, Queiroz MMC, Mendonça PM, Barbosa RR, Carvalho CJB. Description of immature stages of the flesh fly *Peckia* (Sarcodexia) *lambens* (Wiedemann) (Diptera: Sarcophagidae) provides better resolution for taxonomy and forensics. Tropical Zoology. 2015;28: 1-12.

32. Vidal BC. Métodos em Biologia Celular. In: Biologia Celular (Vidal, B. C. e Mello, M. L. S., eds.). Edições Atheneu, Rio de Janeiro. 1987; 5-34.
33. Wang MF, Li K, Zhang D. Taxonomic review of the postica-group of *Fannia* Robineau-Desvoidy (Diptera, Fanniidae) from China, with the description of one new species. *ZooKeys*, 2011;112: 1-19.
34. Wendt LS, Carvalho, CJB. Taxonomia de Fanniidae (Diptera) do sul do Brasil –II: Novas espécies e chave de identificação de *Fannia* Robineau-Desvoidy. *Revista Brasileira de Entomologia*. 2009;53(2): 171-206.
35. Xue WQ, Wang MF, Li FH. The descriptions of two new species of the genus *Fannia* R.-D. from China. *Acta Zootaxonomica Sinica*. 2001;26(2):225–228.

ANNEX



Figure 1. A: Karyotype of *Peckia (Squamatodes) ingens* ($2n = 10$), evidencing four pairs of autosomes and the pair of sex chromosomes XY (arrows). Bar: 10 μm .

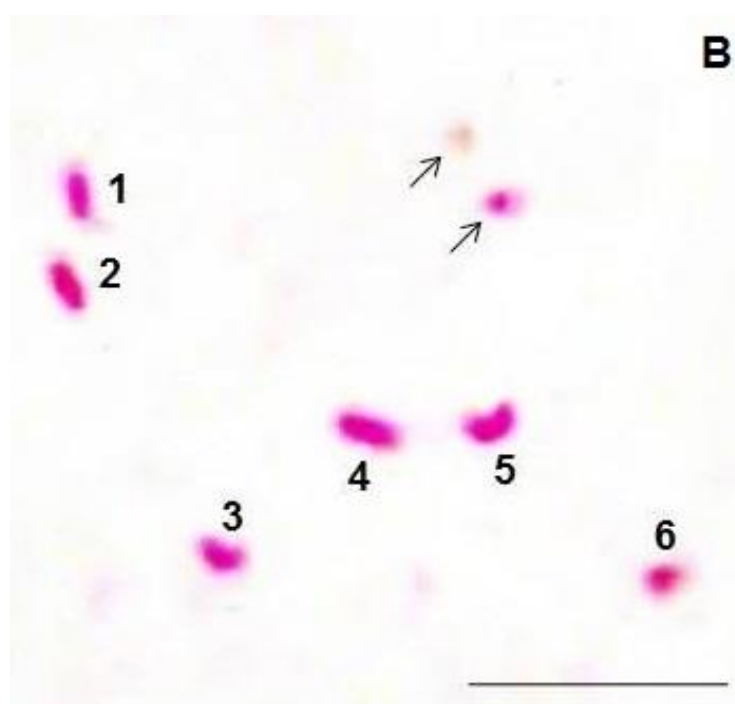
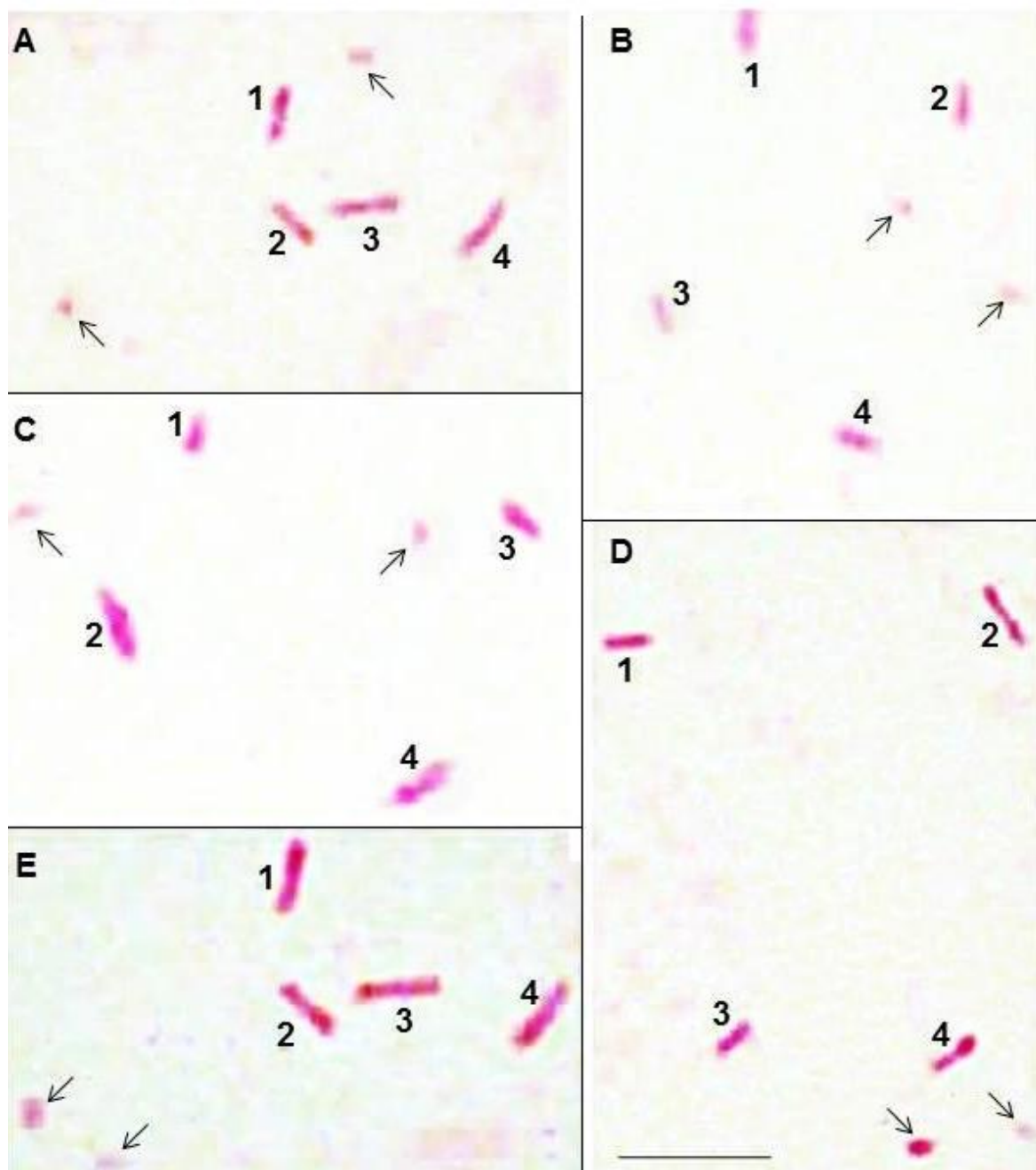
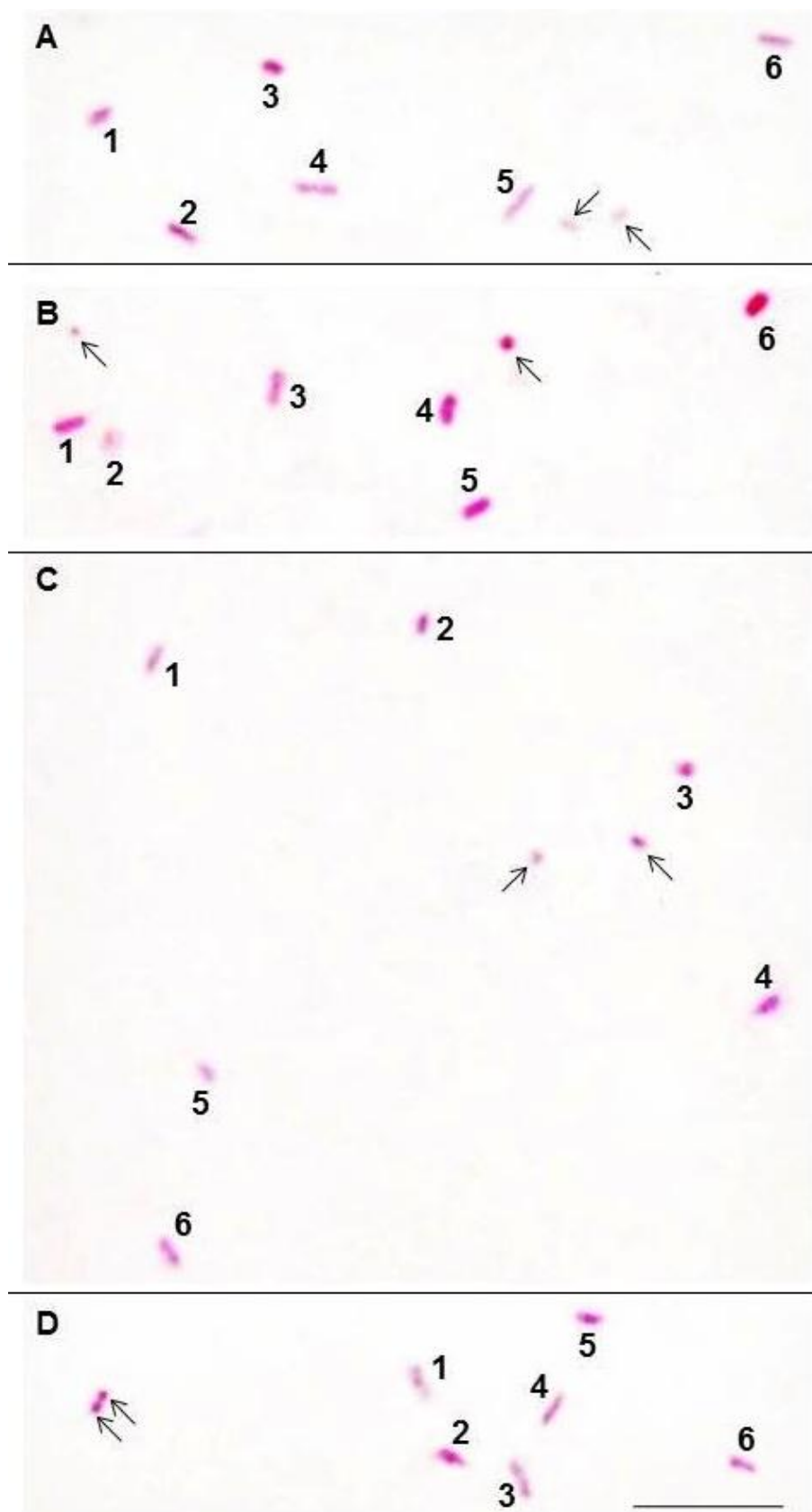


Figure 1. B: Karyotype of *Fannia sabrosky* ($2n = 14$), evidencing six pairs of autosomes and the pair of sex chromosomes XY (arrows). Bar: 10 μm .



Annex 1A, B, C, D, E.: Karyotype of *Peckia (Squamates) ingens* ($2n = 10$), evidencing four pairs of autosomes and the pair of sex chromosomes XY (arrows). Bar: 10 μ m.



Annex 2A, B, C, D: Karyotype of *Fannia sabrosky* ($2n = 14$), evidencing six pairs of autosomes and the pair of sex chromosomes XY (arrows). Bar: 10 μm .

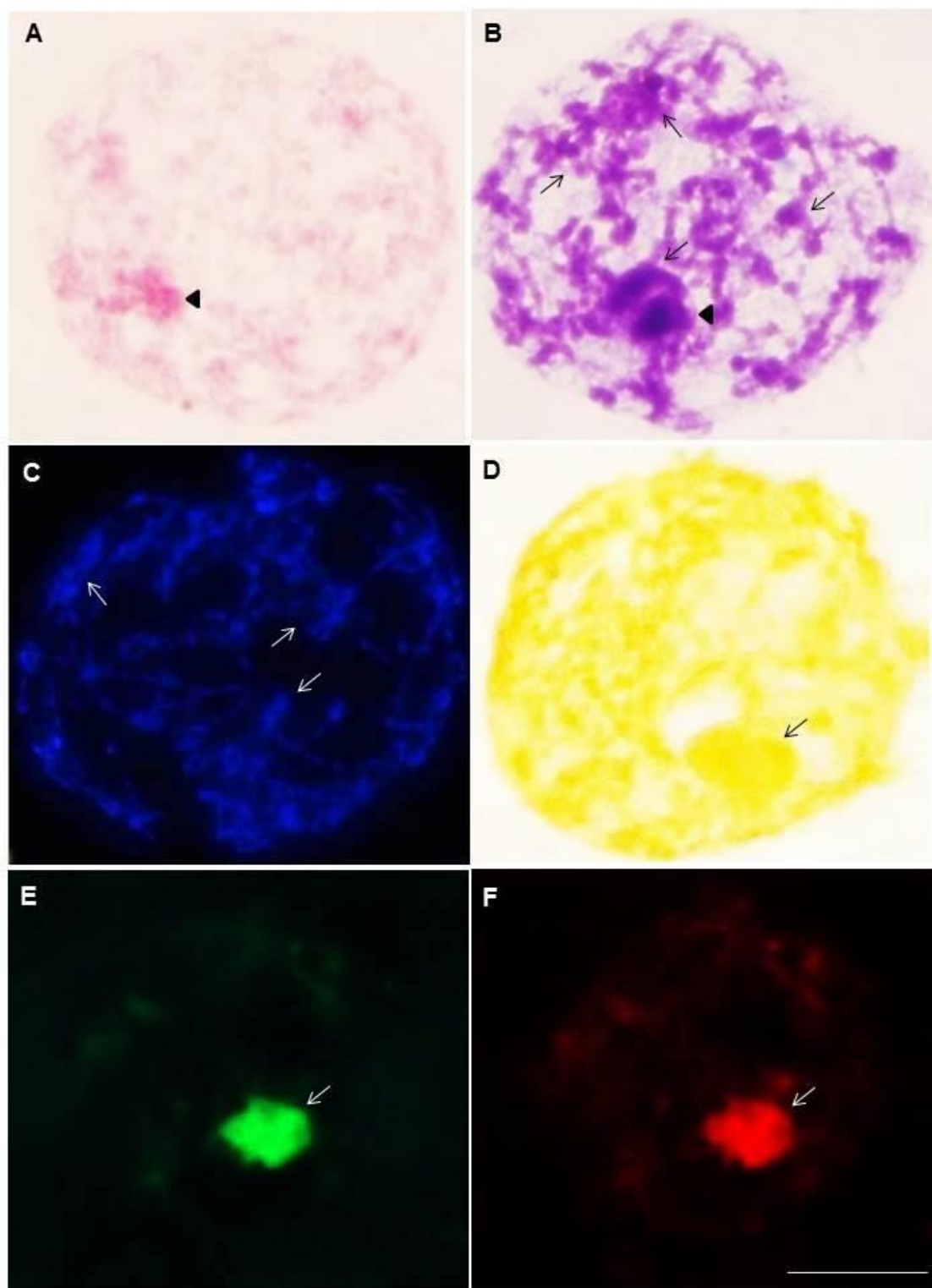


Figure 2. Cytogenetic characteristics of *P. (S.) ingens*. Note the heteropicnotic chromocenter (A, arrowhead) and heterochromatic (B, arrowhead) formed by sex chromosomes. Note also the heterochromatin blocks dispersed in the nucleus (B, arrows) that were rich in AT (C, arrows), as well as a large nucleolus (D, arrow) which showed high transcriptional activity (E, F, arrows). Bar: 10 μ m.

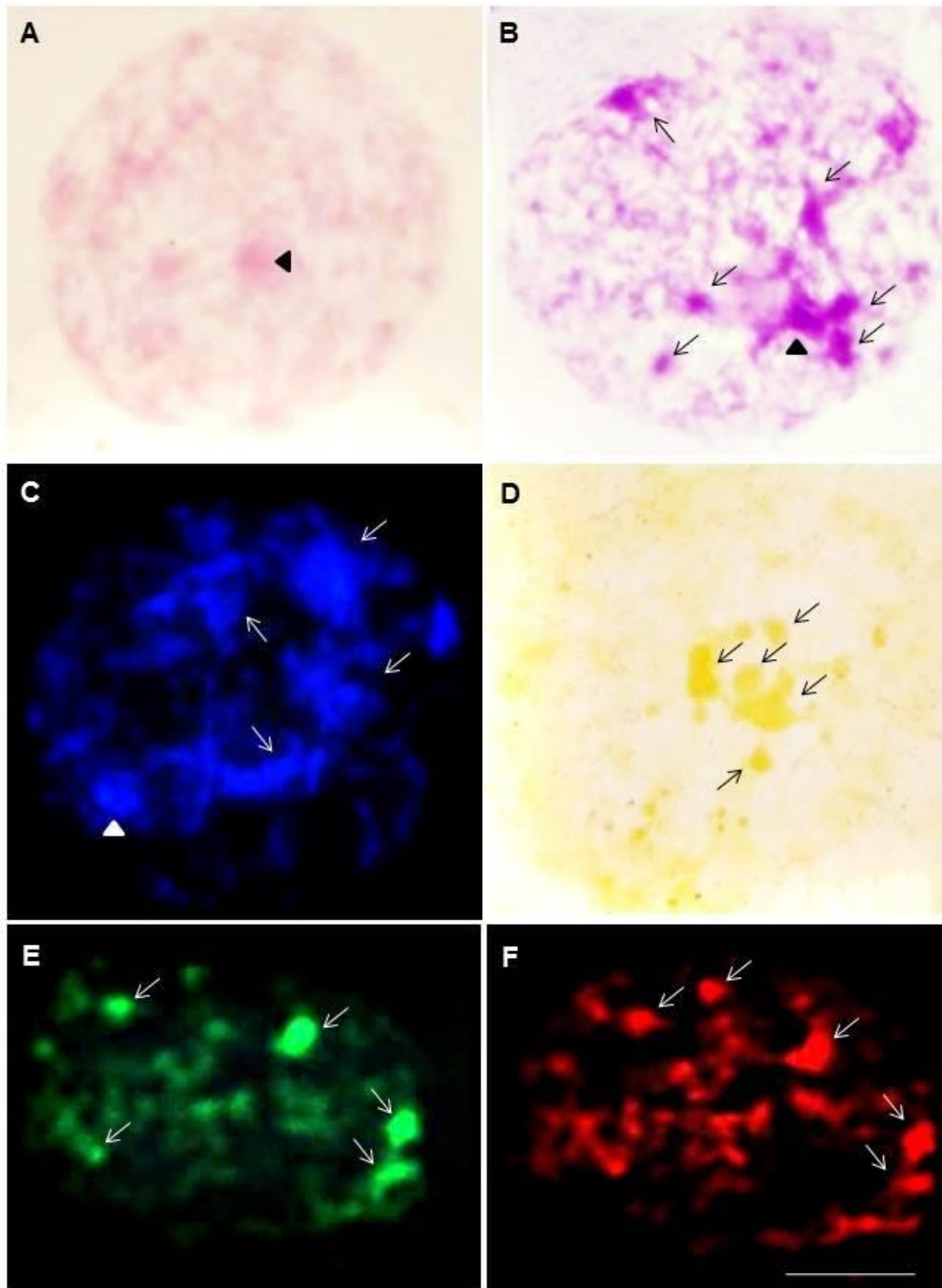


Figure 3. Cytogenetic characteristics of *F. sabrosky*. Note the presence of a heteropicnotic chromocenter (A, arrowhead), that also showed to be heterochromatic (B, arrowhead) and rich in AT (C, arrowhead) formed by the sex chromosomes. Also observe several heterochromatin regions dispersed in the nucleus (B, arrows) that are rich in AT (C, arrows), as well as several nucleolar corpuscles (D, arrows) that showed high transcriptional activity (E, F, arrows). Bar: 10 μ m.

Table 1. Karyotypes of different species of the families Sarcophagidae, Calliphoridae, Muscidae and Fanniidae found in corpses.

Species	Karyotype	References
Sarcophagidae Family		
<i>Acridiophaga aculeata</i>	2n = 12	Boyes, 1953
<i>Boettcheria cimbicis</i>	2n = 12	Boyes, 1963
<i>Helicobia rapax</i>	2n = 12	Boyes, 1963
<i>Helicobia sp.</i>	2n = 12	Boyes, 1963
<i>Hystricocnema plinthopyga</i>	2n = 12	Boyes, 1963
<i>Kellymyia kellyi</i>	2n = 12	Boyes, 1953
<i>Neobellieria bullata</i>	2n = 12	Boyes, 1963
<i>Peckia (Euboettcheria) sp.</i>	2n = 12	Boyes, 1963
<i>Peckia (Pattonella) intermutans</i>	2n = 12	Parise-Maltempi, Avancini, 2000
<i>Peckia (Squamatodes) ingens</i>	2n = 10	This paper
<i>Paraphrissopoda chrysostoma</i>	2n = 12	Boyes, 1963
<i>Parasarcophaga albiceps</i>	2n = 12	Kaul et.al., 1978
<i>Parasarcophaga argyrostoma</i>	2n = 12	Kaul et.al., 1978
<i>Parasarcophaga knabi</i>	2n = 12	Kaul et.al., 1978
<i>Parasarcophaga misera</i>	2n = 12	Kaul et.al., 1978
<i>Parasarcophaga ruficornis</i>	2n = 12	Kaul et.al., 1978
<i>Parasarcophaga similis</i>	2n = 12	Rongdian et. al., 1989
<i>Protodexia australis</i>	2n = 12	Boyes, 1953
<i>Protodexia hunteri</i>	2n = 12	Boyes, 1953
<i>Pseudosarcophaga affinis</i>	2n = 19 or 20	Boyes, 1953
<i>Sarcophaga aldrichi</i>	2n = 12	Boyes, 1953
<i>Sarcophaga argyrostoma</i>	2n = 12	Boyes, 1963
<i>Sarcophaga cooleyi</i>	2n = 12	Boyes, 1953
<i>Sarcophaga crassipalpis</i>	2n = 12	Boyes, 1963
<i>Sarcophaga exuberans</i>	2n = 12	Boyes, 1963
<i>Sarcophaga occipitalis</i>	2n = 12	Boyes, 1963
<i>Sarcophaga reversa</i>	2n = 12	Boyes, 1953
<i>Sarcophaga securifera</i>	2n = 12	Boyes, 1963
<i>Wohlfahrtia meigeni</i>	2n = 12	Boyes, 1963
<i>Wohlfahrtia opaca</i>	2n = 12	Boyes, 1963
Calliphoridae Family		
<i>Chrysomya albiceps</i>	2n = 12	Ullerich, 1958
<i>Chrysomya marginalis</i>	2n = 12	Ullerich, Schottke, 2006
<i>Chrysomya megacephala</i>	2n = 12	Ullerich, Schottke, 2006
<i>Chrysomya phaonis</i>	2n = 12	Ullerich, Schottke, 2006
<i>Chrysomya pinguis</i>	2n = 12	Ullerich, Schottke, 2006
<i>Chrysomya putoria</i>	2n = 12	Parise-Maltempi, Avancini, 2001
<i>Chrysomya rufifacies</i>	2n = 12	Ullerich, 1975
<i>Chrysomya saffrana</i>	2n = 12	Ullerich, Schottke, 2006
<i>Lucilia cluvia</i>	2n = 12	Chirino et.al., 2015
<i>Lucilia cuprina</i>	2n = 12	XingHua, Lin, 1991
<i>Lucilia porphyrina</i>	2n = 12	Agrawal et.al., 2011
<i>Lucilia sericata</i>	2n = 12	Ullerich, Schottke, 2006
<i>Protophormia terraenovae</i>	2n = 12	Ullerich, Schottke, 2006
<i>Triceratopyga calliphoroides</i>	2n = 12	Agrawal et.al., 2011
<i>Xenocalliphora hortona</i>	2n = 12	Agrawal et.al., 2011
Muscidae Family		
<i>Musca domestica</i>	2n = 12	Milani et. at.,1967
<i>Ophyra chalcogaster</i>	2n = 12	Parise-Maltempi, Avancini, 2007
<i>Synthesiomysia nudiseta</i>	2n = 12	Parise-Maltempi, Avancini, 2007
Fanniidae Family		
<i>Fannia sabrosky</i>	2n = 14	This paper

4.2 New biological data about flies with forensic importance: spermatogenesis of *Peckia (Squamatodes) ingens*, *Fannia sabrosky*, *Chrysomya albiceps*, *C. putoria* and *C. megacephala*

Abstract

Sarcophagidae, Calliphoridae and Muscidae family are present on the first stages of cadaveric decomposition and Sphaeroceridae, Piophilidae, Fanniidae and Phoridae family are present in the fourth and fifth decomposition stages, being characterized as insects of great importance for the forensic sciences, since they all allow to estimate the interval after death. Taxonomic data, in conjunction with ecological and biological aspects of Diptera of forensic importance, are considered fundamental for the application of forensic entomology as a tool in legal medicine. However, the knowledge about the biology of these species is scarce. Based on this, in order to contribute to the knowledge of reproductive biology, the present work describes the spermatogenesis of larvae from the third instar of *P. (S.) ingens*, *F. sabrosky*, *C. albiceps*, *C. putoria* and *C. megacephala*. Our results allowed the characterization for the first time of the spermatogenesis phases. The behavior of sex chromosomes during meiosis allows differentiating *P. (S.) ingens* and *F. sabrosky* of the species of genus *Chrysomya*, because *Chrysomya* spp. presented sex chromosomes forming one pseudobivalent and *P. (S.) ingens* and *F. sabrosky* presented individualized sex chromosomes. These results are important for the forensic entomology, because these species are present in the initial phases of decomposition and, taking into account the difficulty in differentiating the Diptera larvae used in forensic investigations, these data can be employed as tools for the characterization of species.

Key-words: Cytogenetics; Meiosis; Citotaxonomy; Blowflies.

Introduction

Insects of the order Diptera are of great importance for public health and hygiene, since many species are biological vectors of pathogens that cause neglected diseases (Rozendaal 1997), act as mechanical vectors of diseases caused by bacteria (Fotedar 2001), virus (Tan et al. 1997), protozoa (Graczyk *et al.* 2003), and helminths (Monzón *et al.* 1991) and cause myiasis in humans and domestic animals (Guimarães & Papavero 1999). In addition to the medical-sanitary importance, several species of Diptera have been used as evidence in forensic investigations (Campobasso *et al.* 2001).

Sarcophagidae, Calliphoridae and Muscidae family are present on the first stages of cadaveric decomposition and the flies of the family Sphaeroceridae, Piophilidae, Fanniidae and Phoridae are, usually, present in the fourth and fifth decomposition stages (Campobasso *et al.* 2001), being characterized as insects of great importance for the forensic sciences, since they all allow to estimate the interval after death (Catts & Goff, 1992).

Peckia (Squamatodes) ingens (Walker, 1849) (Diptera, Sarcophagidae) is a little-studied species, but with great relevance for the family Sarcophagidae, as a result of being distributed in several neotropical countries (Argentina, Brazil, Colombia, Costa Rica, Equator, Guyana, Mexico, Nicaragua, Panama, Paraguay, Peru, Puerto Rico and Venezuela) and it is present during the decomposition of corpses of animals, mainly human beings (Barros *et al.* 2008). The main information present in the literature about this Sarcophagidae is restricted to taxonomic studies (Buenaventura & Pape, 2013; Buenaventura & Pape, 2015; Vairo *et al.* 2015.) and cadaverous entomofauna (Campobasso *et al.* 2001; Amendt *et al.* 2007; Barros *et al.* 2008; Baltazar *et al.* 2011).

Found in Guyana and Brazil, more specifically in Rio de Janeiro, São Paulo and Paraná, *F. sabrosky* Seago, 1954 (Diptera, Fanniidae) is one of the species that has less information inside the family Fanniidae (Wendt & Carvalho, 2009). The taxonomic knowledge of *Fannia* is limited to morphological analyzes (eight groups and three subgroups are recognized in this area so far) (Albuquerque *et al.* 1981) and phylogenetic studies are absent.

Blowflies of the genus *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) transmit human diseases (Monzón *et al.* 1991; Lindsay *et al.* 2012) and are usually the first to colonize and

most abundant fly fauna in carcasses (Carvalho *et al.* 2004). Among the species of the genus *Chrysomya*, *C. albiceps* (Wiedemann, 1819), *C. putoria* (Wiedemann, 1818) and *C. megacephala* (Fabricius, 1794) are considered to be of potential forensic significance for urban regions (Carvalho *et al.* 2004).

Pujol-Luz *et al.* (2008) emphasize that taxonomic data, in conjunction with ecological and biological aspects of Diptera of forensic importance, are considered fundamental for the application of forensic entomology as a tool in legal medicine. However, the knowledge about the biology of these species is scarce. Based on this, in order to contribute to the knowledge of reproductive biology, the present work describes the spermatogenesis of *P. (S.) ingens*, *F. sabrosky*, *C. albiceps*, *C. putoria* and *C. megacephala*.

Materials and methods

Ten male larvae from the third instar of *P. (S.) ingens*, *F. sabrosky*, *C. albiceps*, *C. putoria* and *C. megacephala* were analyzed, from the Laboratory of Integrative Entomology, installed at the Institute of Biology of UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brazil. The insects were dissected, their testicles removed, and the seminiferous tubules were lacerated, crushed and put on a blade in liquid nitrogen and colored with lacto-acetic orcein (De Vaio *et al.* 1985) for the spermatogenesis analysis on a microscope with *Jenaval* (Zeiss) light, attached to the digital camera and to the image analyzer system (Axio Vision LE 4.8, Zeiss).

Results and discussion

All flies analyzed showed the same meiotic behavior during spermatogenesis: The initial prophases (leptotene) presented a chromatin totally decondensed from the nucleus (figure 1A, 2A, B) and a heteropicnotic chromocenter formed by sex chromosome association (figure 1A, 2A, B, arrow). During the diplotene phase (figure 1B), the chromatin was condensed and the sex chromosomes were separated (figure 1B, arrows), being possible to visualize chiasmata (figure 1B, arrowhead). After reaching the maximum degree of compaction, the chromosomes reveal to be very small during the meiotic metaphase - polar vision (figure 1C, 2C) and lateral vision (figure 1D). Afterwards, the chromosomes divided during the anaphase (figure 1E, 2D) and, after the telophase (figure 2E) haploids cells were produced (figure 1F-H). During the spermiogenesis, it was possible

to visualize the differentiation of round spermatids (figure 1F) and elongated spermatids (figure 1G) that will result in spermatozoa (figure 1H).

Most spermatogenesis studies about Diptera are ultrastructural analysis (Name *et al.* 2010; Rego *et al.* 2016). For the dipterans with forensic importance, the ultrastructures of the testicles (Name *et al.* 2010; Sukontason *et al.* 2011), the accessory glands (Sukontason *et al.* 2009; Name *et al.* 2010) and spermatozoa (Curtis *et al.* 1989; Dallai & Afzelius, 1990; Dallai *et al.* 1993; Name *et al.* 2010) were described. Our results allowed the characterization for the first time of the spermatogenesis phases of *P. (S.) ingens*, *F. sabrosky*, *C. albiceps*, *C. putoria* and *C. megacephala*. The behavior of sex chromosomes during meiosis allows differentiating *P. (S.) ingens* and *F. sabrosky* of the species of genus *Chrysomya*, because *Chrysomya* spp. presented sex chromosomes forming one pseudobivalent (figure 2C) and *P. (S.) ingens* and *F. sabrosky* presented individualized sex chromosomes (figure 1C).

The described results are important for the forensic entomology, because *P. (S.) ingens* and *Chrysomya* spp. are present in the initial phases of decomposition (Campobasso *et al.* 2001) and taking into account the difficulty in differentiating the Diptera larvae used in forensic investigations (Srivastava *et al.* 2012; Chirino *et al.* 2015; Vairo *et al.* 2015), these data can be employed as tools for the characterization of species.

References

- ALBUQUERQUE, D.O., PAMPLONA, D. & CARVALHO, C.J.B. 1981. Contribuição ao conhecimento dos *Fannia* R. D., 1830 da Região Neotropical (Diptera, Fanniidae). *Arquivo do Museu Nacional*, Rio de Janeiro **56**: 9–34.
- AMENDT, J., CAMPOBASSO, C., GAUDRY, E., REITER, C., LEBLANE, H., & HALL, M. 2007. Best practice in forensic entomology - standards and guidelines. *International Journal of Legal Medicine* **121**: 90–104.
- BALTAZAR, F.N., CAVALLARI, M.L., CARVALHO, E., TOLEZANO, J.E. & MUÑOZ, D.R. 2011. Entomologia forense e saúde pública: relevância e aplicabilidade. *Bepa* **8**(87): 14-25.
- BARROS, R.M., MELLO-PATIU, C.A. & PUJOL-LUZ, J.R. 2008. Sarcophagidae (Insecta, Diptera) associados à decomposição de carcaças de *Sus scrofa* Linnaeus

- (Suidae) em área de Cerrado do Distrito Federal, Brasil. *Revista Brasileira de Entomologia* **52**(4):606-609.
- BUENAVENTURA, E. & PAPE, T. 2013. Revision of the New World genus *Peckia* Robineau-Desvoidy (Diptera: Sarcophagidae). *Zootaxa*. **3622** (1): 001–087.
- BUENAVENTURA, E. & PAPE, T. 2015. Phylogeny of the *Peckia*-genus group: evolution of male genitalia in the major necrophagous guild of Neotropical flesh flies (Diptera: Sarcophagidae). *Org Divers Evol*.
- CAMPOBASSO, C.P., DI VELLA, G. & INTRONA, F. 2001. Factors affecting decomposition and Diptera colonization. *Forensic Science International* **120**: 18-27.
- CARVALHO, L.M.L., THYSSEN, P.J., GOFF, M.L. & LINHARES, A.X. 2004. Observations on the succession patterns of necrophagous insects on a pig carcass in an urban area of Southeastern Brazil. *Internet Journal of Forensic Medicine and Toxicology* **5**: 33-39.
- CATTS, E.P. & GOFF, M.L. 1992. Forensic entomology in criminal investigations. *Annual Review of Entomology* **37**: 253-272.
- CHIRINO, M.G., ROSSI, L.F., BRESSA, M.J., LUACES, J.P. & MERANI, M.S. 2015. Comparative study of mitotic chromosomes in two blowflies, *Lucilia sericata* and *L. cluvia* (Diptera, Calliphoridae), by C- and G-like banding patterns and rRNA loci, and implications for karyotype evolution. *Comparative Cytogenetics* **9**(1): 103-118.
- CURTIS, S.K., BENNER, D.B. & MUSIL, G. 1989. Ultrastructure of the Spermatozoon of *Megaselia scalaris* Loew (Diptera: Brachycera: Cyclorrhapha: Phoridae: Phoridae). *Journal of Morphology* **200**: 47-61.
- DALLAI, R. & AFZELIUS, B.A. 1990. Microtubular Diversity in Insect Spermatozoa: Results Obtained with a New Fixative. *Journal of Structural Biology*. **103**:164-179.
- DALLAI, R., BELLON, P.L., LANZAVECCHIA, S., AFZELIUS, B.A. 1993. The dipteran sperm tail: ultrastructural characteristics and phylogenetic considerations. *Zoologica Scripta*. **22**(2):193-202.
- DE VAIO, E.S., GRUCCI, B., CASTAGNINO, A.M., FRANCA, M.E. & MARTINEZ, M.E. 1985. Meiotic differences between three triatomine species (Hemiptera:Reduviidae). *Genetica* **67**:185-191.

- FOTEDAR, R. 2001. Vector potential of houseflies (*Musca domestica*) in the transmission of *Vibrio cholerae* in India. *Acta Tropica* **78**: 31-34.
- GRACZYK, T.K., GRIMES, B.H., KNIGHT, R., DA SILVA, A.J., PIENIAZEK, N.J. & VEAL, D.A. 2003. Detection of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* carried by synanthropic flies by combined fluorescent in situ hybridization and a monoclonal antibody. *The American Journal of Tropical Medicine & Hygiene* **68**: 228-232.
- GUIMARÃES, J.H. & PAPAVERO, N. 1999. *Myiasis in man and animals in the neotropical region: bibliographic database*. Editora Plêiade/FAPESP Press, São Paulo, Brazil.
- LINDSAY, S.W., LINDSAY, T.C., DUPREZ, J., HALL, M.J.R., KWAMBANA, B.A., JAWARA, M., NURUDEEN, I.U., SALLAH, N., WYATT, N., DALESSANDRO, U., PINDER, M. & ANTONIO, M. 2012. *Chrysomya putoria*, a putative vector of diarrheal diseases. *PLoS Neglected Tropical Disease* **6**: e1895.
- MONZÓN, R.B., SÁNCHEZ, A.R., TADIAMAN, B.M., NAJOS, O.A., VALENCIA, E.G., RUEDA, R.R. & VENTURA, J.V. 1991. A comparison of the role of *Musca domestica* (Linnaeus) and *Chrysomya megacephala* (Fabricius) as mechanical vectors of helminthic parasites in a typical slum area of metropolitan manila. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* **22**: 222-228.
- NAME, K.P.O., PUJOL-LUZ, J.R. & BÁO, S.N. 2010. Structure and ultrastructure of spermatozoa of *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae). *Micron* **41**: 853-860.
- PUJOL-LUZ, J.R., ARANTES, L.C. & CONSTANTINO, R. 2008. Cem anos da entomologia forense no Brasil (1908-2008). *Revista Brasileira de Entomologia* **52**(4): 485-492.
- REGO, L.N.A.A., ALEVI, K.C.C., AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V. & MADI-RAVAZZI, L. 2016. Ultrastructural features of spermatozoa and their phylogenetic application in *Zaprionus* (Diptera, Drosophilidae). *Fly* **10**(1): 47-52.
- ROZENDAAL, J.A. 1997. *Vector control methods for use by individuals and communities*. World Health Organization, Geneva.
- SRIVASTAVA, R., DABAS, A., SRIVASTAVA, R. & GAUR, P. 2012. Qualitative analysis of chromosome from neural ganglia of flesh-flies Sarcophaga. *Biochem. Cell. Arch* **12**(1): 149-152.

- SUKONTASON, K.L., CHAIWONG, T., CHAISRI, U., VOGTSBERGER, R.C. & SUKONTASON, K. 2009. Ultrastructure of male accessory glands of *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae). *J Vector Ecol* **34**: 294–303.
- SUKONTASON, K.L., CHAIWONG, T., CHAISRI, U., KURAHASHI, H., SANFORD, M. & SUKONTASON, K. 2011. Reproductive Organ of Blow Fly, *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae): Ultrastructural of Testis. *J Parasitol Res* **2011**: 690863.
- TAN, S.W., YAP, K.L. & LEE, H.L. 1997. Mechanical transport of rotavirus by the legs and wings of *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *Journal of Medical Entomology* **34**: 527-531.
- VAIRO, K.P., QUEIROZ, M.M.C., MENDONÇA, P.M., BARBOSA, R.R. & CARVALHO, C.J.B. 2015. Description of immature stages of the flesh fly *Peckia* (Sarcodexia) *lambens* (Wiedemann) (Diptera: Sarcophagidae) provides better resolution for taxonomy and forensics. *Tropical Zoology* **28**: 1-12.
- WENDT, L.S. & CARVALHO, C.J.B. 2009. Taxonomia de Fanniidae (Diptera) do sul do Brasil –II: Novas espécies e chave de identificação de *Fannia* Robineau-Desvoidy. *Revista Brasileira de Entomologia* **53**(2): 171-206.

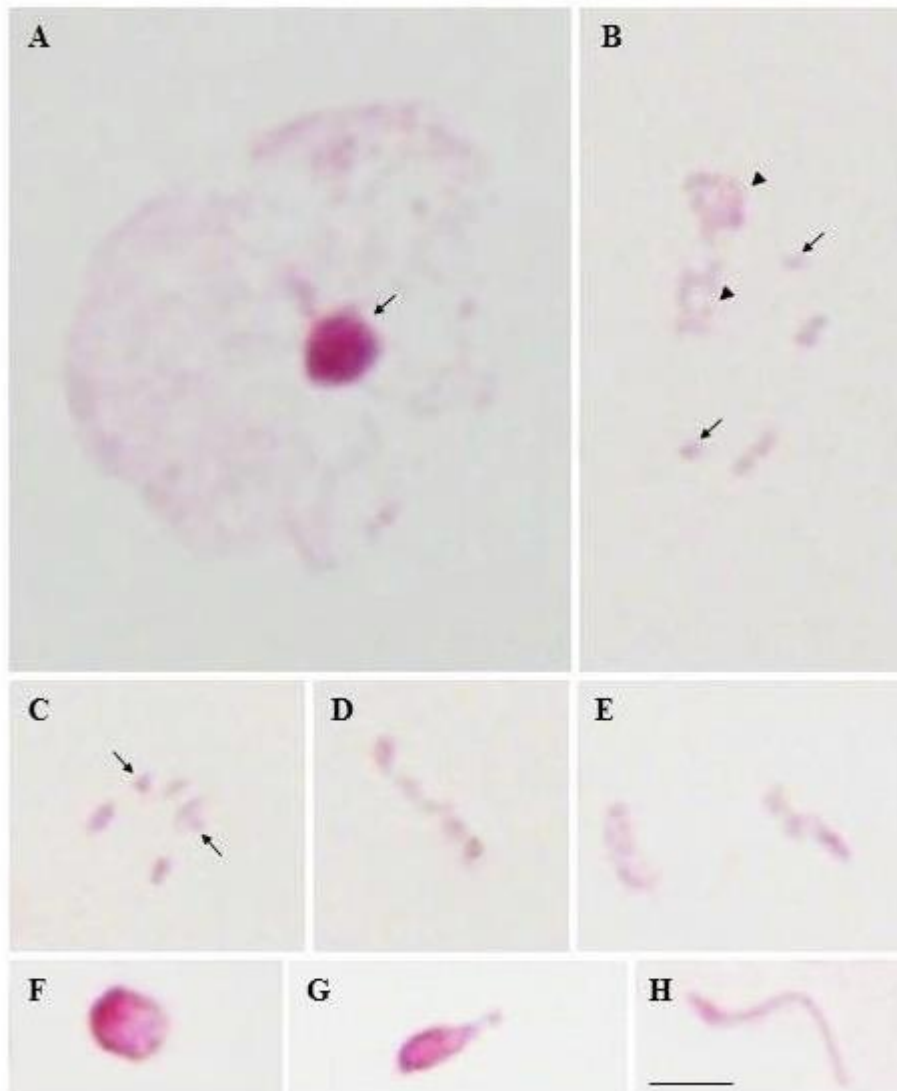


Figure 1: Spermatogenesis de *P. (S.) ingens*. A. Leptotene. Arrow: heteropicnotic chromocenter formed by sex chromosome association. B. Diplotene. Arrowhead: chiasmata. Arrows: sex chromosomes totally individualized. C, D. Meiotic metaphase in polar vision and lateral, respectively. Note the karyotype $2n = 10$ ($8A + XY$), being the sex chromosomes (arrows) smaller than the autosomes. E. Anaphase. F. Round spermatids. G. Elongated spermatids. H. Spermatozoa. Bar: $10 \mu\text{m}$.

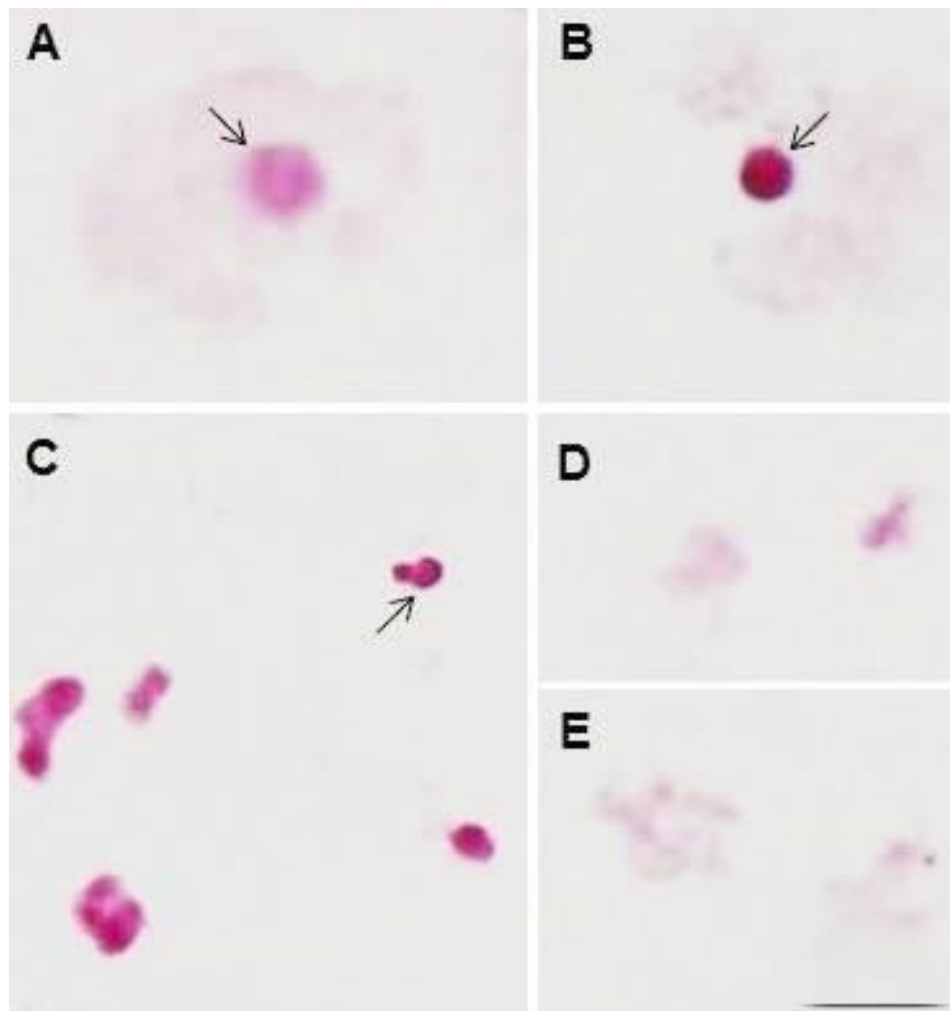


Figure 2. Spermatogenesis of *Chrysomya albiceps*. A, B. Prophase. Note the chromatin compaction and a chromocenter formed by the sex chromosomes (arrow), C. Metaphase. Note the karyotype $2n = 12$ (10A + XY), being five pairs of autosomes and the X and Y sex chromosomes (arrow), D. Anaphase, E. Telophase. Bar: 10 μ m.

Discussão

5 Discussão

A estreita relação entre insetos e cadáveres e o uso destes animais em investigações médico-criminais é a finalidade da entomologia forense. Normalmente, são as larvas de determinadas espécies de Diptera, tais como as da família Calliphoridae e Sarcophagidae, que localizam o cadáver mais rapidamente, sendo também as mais abundantes na fauna cadavérica. Esses insetos desenvolvem seus estágios imaturos juntos à carcaça, utilizando-a como fonte proteica, sítio de cópula e estímulo a oviposição (AMENDT; KRETTEK; ZEHNER, 2004; MISE; ALMEIDA; MOURA, 2007). Enquanto que outras espécies colonizam o cadáver em seu estado mais pútrido, como é o caso das varejeiras da família Fanniidae (CAMPOBASSO et al., 2001).

Sendo assim, as estratégias de desenvolvimento dos insetos também influenciam no processo de decomposição do organismo. Os sarcófagídeos, por exemplo, por serem ovovivíparos, eliminam as larvas de primeiro *instar* prontas para iniciar sua alimentação a partir da carcaça, diferente dos califorídeos, que necessitam de um tempo adicional para a eclosão dos ovos, por serem ovíparos, além de ovipositarem em locais específicos da carcaça. Essa tática de liberar a larva ao invés do ovo no cadáver, pode conferir uma vantagem aos sarcófagídeos, sendo pioneiros na colonização (BARROS; MELLO-PATIU; PUJOL-LUZ, 2008).

Quando são utilizadas técnicas médicas, tais como a medição da temperatura corporal ou a análise de *livor mortis* (palidez cadavérica, que surge de 20 a 45 minutos após a morte) e *rigor mortis* (rigidez cadavérica, que se inicia em média de 4-8 horas após a morte, terminando após 24-36h), a estimativa do intervalo de morte ocorre com precisão apenas nos primeiros dois ou três dias após a morte do indivíduo. Porém, quando se calcula o tempo ocupado por cada estágio de desenvolvimento do inseto no cadáver, em conjunto com a análise das espécies necrófagas presentes, podem ser estimados os intervalos pós-morte desde o primeiro dia até várias semanas depois (AMENDT; KRETTEK; ZEHNER, 2004).

Dessa forma, o conhecimento sobre a biologia, ecologia e distribuição dos insetos de importância forense é extremamente relevante para a solução de diversos crimes, fornecendo informações sobre o local, tempo, causa e autoria do crime cometido (BALTAZAR et al., 2011). Além de auxiliar, como já relatado acima, na estimativa do

intervalo de morte do indivíduo. Além disso, toda pesquisa que acrescente informações escassas na literatura é de suma importância para contribuir com o conhecimento científico e social.

Um dos modelos de decomposição animal mais utilizado nos estudos forenses é o porco doméstico. O seu hábito onívoro, sua pele e flora intestinal semelhante à dos humanos permitem um estudo mais próximo do processo de decomposição humana, principalmente em corpos que possuem o mesmo peso do porco (MISE; ALMEIDA; MOURA, 2007). Segundo Goff (2009), o processo de decomposição apesar de contínuo, pode ser classificado em cinco estágios, sendo eles, o fresco, gasoso, coliquativo (ativo), pós-coliquativo e seco (esqueletização). No estágio gasoso, aparecem bolhas epidérmicas ou inchaço abdominal decorrente do acúmulo de gases nas cavidades corpóreas internas. Já no período coliquativo, há dissolução pútrida e as partes moles do cadáver reduzem de volume progressivamente, conforme se desintegram os tecidos, até chegar no período de esqueletização, em que a ossada é evidenciada, como pode ser observado na figura 7.



Figura 7. Estágios de decomposição observados em carcaças de suínos (*Sus scrofa* L.), expostas no município de Cabreúva, SP, Brasil. A. fresco; B. gasoso; C. coliquativo; D. seco. (Purgato, 2016).

A entomologia forense pode auxiliar também em investigações relacionadas às pessoas ou animais vivos, uma vez que algumas espécies de moscas podem se desenvolver não somente em cadáveres, como em corpos vivos, causando miíase primária. Em tais casos, a análise das larvas pode revelar o período de negligência dessas vítimas. Assim, o adequado exame das provas na cena de crime e a sua preservação são imprescindíveis para que se tenha o melhor resultado possível, e conseqüentemente, a solução do caso (AMENDT; KRETTEK; ZEHNER, 2004; AMENDT et al., 2011).

A descrição morfológica de diversas varejeiras de importância forense é uma das ferramentas de identificação desses insetos. Muitas espécies são identificadas por meio da terminália masculina, uma das principais diferenças entre elas. Entretanto, devido à estreita relação filogenética de certas espécies, os caracteres morfológicos podem ser insuficientes para diferenciá-las, como é o caso de *C. rufifacies* e *C. albiceps*, por exemplo, espécies que compartilham estados de caracteres muito semelhantes, podendo levar a identificação incorreta/incerta e, conseqüentemente, acarretar em erro de registro de espécies presentes no território brasileiro (GRELLA et al., 2015).

A cariosistemática dos dípteros de relevância forense foi pouco usual até o momento, já que a maior parte das espécies estudadas apresenta 12 cromossomos (Tabela 1). Sendo assim, outras ferramentas citogenéticas já foram utilizadas, como o tamanho dos cromossomos sexuais e o padrão de heterocromatina constitutiva, que possibilitaram diferenciar espécies do gênero *Lucilia* (MORERA et al., 2011; CHIRINO et al., 2015) e a técnica de hibridização in situ (FISH), utilizada para diferenciar espécies do gênero *Chrysomya* (*C. megacephala* e *C. putoria*) (PARISE-MALTEMPI; AVANCINI, 2001) e *Lucilia* (*L. cluvia* e *L. sericata*) (CHIRINO et al., 2015), porém as marcações foram idênticas e restritas aos cromossomos sexuais.

Nossos resultados demonstraram que a cariosistemática e a citotaxonomia podem auxiliar na correta diferenciação das espécies, já que *P. (S.) ingens* e *F. sabrosky* apresentaram um cariótipo incomum, sendo, respectivamente, $2n = 10 (8A + XY)$ e $2n = 14 (12A + XY)$, além das diversas características citogenéticas que possibilitaram diferenciar uma espécie da outra. Comparações cromossômicas das espécies do gênero *Peckia* com outras moscas da família Sarcophagidae mostraram haver considerável variação entre seus cromossomos sexuais, sendo bem menores quando comparados aos

autossomos, diferente da morfologia dos autossomos que segue mais uniforme em toda a família (PARISE-MALTEMPI; AVANCINI, 2000; SRIVASTAVA et al, 2012).

Eventos evolutivos de perda ou fusão cromossômica já foram relatados para algumas espécies de importância agropecuária da família Muscidae, cujo cariótipo também se apresentou como sendo $2n = 10$ (BOYES; COREY; PATERSON, 1964; OHNO, 1967; TRAUT, 1999; PARISE-MALTEMPI; AVANCINI, 2007; LANDEEN, 2013). Levando em consideração que o cariótipo tipo da família Sarcophagidae seja $2n = 12$, por estar presente na maioria das espécies, incluindo *P. (Euboettcheria)* sp. e *P. (Pattonella) intermutans*, possivelmente, esses mesmos eventos estão relacionados à evolução cariotípica de *P. (S.) ingens*, quando comparada as outras espécies do gênero.

Em relação a espermatogênese, a maioria dos estudos em Diptera estão restritos a análises ultraestruturais (NAME; PUJOL-LUZ; BÁO, 2010; REGO et al., 2016), sendo que em varejeiras de importância forense, já foram descritas ultraestruturas dos testículos (NAME; PUJOL-LUZ; BÁO, 2010; SUKONTASON et al., 2011), das glândulas acessórias (SUKONTASON et al., 2009; NAME; PUJOL-LUZ; BÁO, 2010) e dos espermatozoides (CURTIS; BENNER; MUSIL, 1989; DALLAI; AFZELIUS, 1990; DALLAI et al. 1993; NAME; PUJOL-LUZ; BÁO, 2010).

Nossos resultados permitiram a caracterização das fases de espermatogênese de *P. (S.) ingens*, *F. sabrosky*, *C. albiceps*, *C. putoria* e *C. megacephala* pela primeira vez, mostrando que, apesar de também ter sido observado um grande cromocentro heteropicnótico formado pelos cromossomos sexuais durante as prófases de *C. albiceps*, *C. putoria* e *C. megacephala*, os cromossomos sexuais mantiveram-se unidos durante a metáfase, formando um pseudobivalente, diferente de *P. (S.) ingens* e *F. sabrosky*, que apresentaram cromossomos sexuais individualizados.

Uma vez que exista dificuldade para distinção das espécies do ponto de vista morfológico, principalmente em relação às larvas (SZPILA, 2010; SRIVASTAVA et al., 2012; CHIRINO et al., 2015; VAIRO et al., 2015), os resultados desse trabalho são de suma relevância para a entomologia forense e podem ser utilizados como ferramentas para a caracterização das espécies, uma vez que o conhecimento sobre os insetos envolvidos no processo de decomposição é o primeiro passo para um uso efetivo da entomologia como ferramenta para resolução de crimes.

Conclusão

6 Conclusão

Nossos resultados mostram que as análises citogenéticas são importantes ferramentas taxonômicas para diferenciar *P. (S.) ingens* e *F. sabrosky* de todas as outras espécies de sarcófagídeos, califorídeos e muscídeos presentes na fauna cadavérica, uma vez que ambas as espécies apresentaram um cariótipo incomum quando comparado as outras varejeiras. Além disso, destacamos a relevância de outras análises citogenéticas, como a do cromocentro, da heterocromatina, do nucléolo e da atividade transcricional, que podem ser utilizadas para diferenciar essas moscas de importância forense.

A caracterização das fases de espermatogênese permitiu diferenciar as espécies do gênero *Chrysomya* das espécies *P. (S.) ingens* e *F. sabrosky*, resultados relevantes para a entomologia forense, já que pode ocorrer sobreposição das espécies nas fases iniciais de decomposição, dificultando a distinção, principalmente, das larvas dessas varejeiras utilizadas em investigações forenses. Sendo assim, esses dados podem ser usados como ferramentas para caracterização das espécies.

Referências

7 Referências Bibliográficas

AGRAWAL, U.R.; BAJPAI, N.; KURAHASHI, H.; TEWARI, R.R. Metaphase karyotypes of four species of Calliphoridae (Diptera). **Chromosome Science**. v. 13, p.49-52, 2010.

ALBUQUERQUE, D.O. Sobre duas novas espécies de *Fannia* R.- D. do Brasil (Diptera, Muscidae). **Anais da academia de Ciências**. v. 26, p. 317–322, 1954a.

ALBUQUERQUE, D.O. Descrição de nova espécie do gênero *Fannia* e redescricao *F. flavicineta* (Stein, 1904) (Diptera, Muscidae). **Revista Brasileira de Entomologia**. v. 2, p. 71–80, 1954b.

ALBUQUERQUE, D.O. Descrição de três espécies novas de *Fannia* R.-D. brasileiras, com palpos e antenas amarelos (Diptera: Muscidae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v. 26, p. 385–394, 1954c.

ALBUQUERQUE, D.O. Uma espécie nova de *Fannia* R.-D. (Diptera, Muscidae). **Revista Brasileira de Biologia**. v. 16, p. 33–35, 1956.

ALBUQUERQUE, D.O. Sobre espécies de *Fannia* R.-D., 1830 novas ou pouco conhecidas (Diptera, Muscidae). **Boletim do Museu Nacional Rio de Janeiro (Zoologia)**. v. 172, p. 1–31, 1957.

ALBUQUERQUE, D.O. Sobre uma nova espécie de *Fannia* R.-D., 1830 (Diptera, Muscidae). **Revista Brasileira de Entomologia**. v. 8, p. 21–24, 1958.

ALBUQUERQUE, D.O. Descrição de uma espécie nova de *Fannia* Robineau-Desvoidy, 1830 (Diptera, Fanniidae), com o esternito V dourado. **Dusenya**. v. 12, p. 21–23, 1980.

ALBUQUERQUE, D.O.; PAMPLONA, D.; CARVALHO, C. J. B. Contribuição ao conhecimento dos *Fannia* R. D., 1830 da Região Neotropical (Diptera, Fanniidae). **Arquivo do Museu Nacional**. Rio de Janeiro. v. 56, p. 9–34, 1981.

ALEVI, K.C.C.; NASCIMENTO, J.G.O.; MOREIRA, F.F.F.; JURBERG, J.; AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V. Analysis of Metabolic Activity in Cystic Cells of *Triatoma rubrofasciata* (Hemiptera: Triatominae) and Its Capacity to Occupy Different Environments. **African Entomology**. v.24, n.1, p.261-264, 2016.

AMENDT, J.; CAMPOBASSO, C.; GAUDRY, E.; REITER, C.; LEBLANE, H.; HALL, M. Best practice in forensic entomology - standards and guidelines. **International Journal of Legal Medicine**. v. 121, p. 90–104, 2007.

AMENDT, J.; KRETTEK, R.; ZEHNER, R. Forensic entomology. **Naturwissenschaften**. v. 91, p. 51-65, 2004.

- AMENDT, J.; RICHARDS, C.S.; CAMPOBASSO, C.P.; ZEHNER, R.; HALL, M.J.R. Forensic entomology: applications and limitations. **Forensic Sci Med Pathol.** v. 7, p. 379-392, 2011.
- ARAÚJO, P.F.; COURI, M.S. Duas novas espécies de *Fannia* Robineau-Desvoidy (Diptera, Fanniidae) do Rio de Janeiro. Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia.** v. 13, p.335–341, 1996.
- AZEREDO-ESPIN, A.M.L.; LESSINGER, A.C. Genetic approaches for studying myiasis-causing flies: molecular markers and mitochondrial genomics. **Genetica.** v. 126, p. 111-131, 2006.
- BALTAZAR, F.N.; CAVALLARI, M.L.; CARVALHO, E.; TOLEZANO, J.E.; MUÑOZ, D.R. Entomologia forense e saúde pública: relevância e aplicabilidade, **Bepa.** v. 8, n.87, p. 14-25, 2011.
- BARROS, R.M.; MELLO-PATIU, C.A.; PUJOL-LUZ, J.R. Sarcophagidae (Insecta, Diptera) associados à decomposição de carcaças de *Sus scrofa* Linnaeus (Suidae) em área de Cerrado do Distrito Federal, Brasil. **Revista Brasileira de Entomologia.** v. 52, n. 4, p. 606-609, 2008.
- BENECKE, M. A brief history of forensic entomology. **Forensic Science Internacional.** v.120, p. 2-14, 2001.
- BOYES, J.W.; COREY, M.J.; PATERSON, H.E. Somatic chromosomes of higher Diptera: IX. karyotypes of some Muscid species. **Canadian Journal of Zoology.** v.42, n.6, p.1025-1036, 1964.
- BOYES, J.W.; SHEWELL, G.E. Cytotaxonomy of Calliphoridae (Diptera). **Genetica.** v.45, p. 435-488, 1975.
- BRAACK, L.E.O. Spread in South Africa of the oriental latrine fly *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae), an introduced species closely resembling *Chrysomya bezziana* Villeneuve. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research.** v.58, p. 311-312, 1991.
- BUENAVENTURA, E.; PAPE, T. Phylogeny of the Peckia-genus group: evolution of male genitalia in the major necrophagous guild of Neotropical flesh flies (Diptera: Sarcophagidae). **Org Divers Evol.** 2015.
- CAMPOBASSO, C.P.; DI VELLA, G.; INTRONA, F. Factors affecting decomposition and Diptera colonization. **Forensic Science Internacional.** v. 120, p. 18-27, 2001.
- CARVALHO, C.J.B. Descrição de *Fannia euchaetophora* sp.n. (Diptera, Fanniidae) da Ilha de Maracá, Roraima. **Revista Brasileira de Entomologia.** v. 35, p. 35–38, 1991.
- CARVALHO, C.J.B.; COURI, M.S. Descrição de *Fannia rafaelli* sp.n. do Amazonas, Brasil (Diptera, Fanniidae). **Revista Brasileira de Entomologia.** v. 37, p. 559–562, 1993.

CARVALHO, C.J.B.; MOURA, M.O.; RIBEIRO, P.B. Chave para adultos de dípteros (Muscidae, Fanniidae, Anthomyiidae) associados ao ambiente humano no Brasil. **Revista Brasileira de Entomologia**. v. 46, n. 2, p. 107-114, 2002.

CARVALHO, L.M.L.; THYSSEN, P.J.; GOFF, M.L.; LINHARES, A.X. Observations on the succession patterns of necrophagous insects on a pig carcass in an urban area of Southeastern Brazil. **Internet Journal of Forensic Medicine and Toxicology**. v. 5, p. 33-39, 2004.

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**. v. 95, n.1, p. 135-138, 2000.

CASSEB-HASSAN, P. M.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. Estrutura Nucleolar e Impregnação por Íons Prata. **HB Científica**. v. 6, n. 3, p. 172-178, 1999.

CATTS, E.P.; GOFF, M.L. Forensic entomology in criminal investigations. **Annual Review of Entomology**. v. 37, p. 253-272, 1992.

CHILLCOTT, J.G. A revision of the Nearctic species of Fanniinae (Diptera: Muscidae). **Canadian Entomologist Supplement**. v. 14, p. 1-295, 1961.

CHIRINO, M.G.; ROSSI, L.F.; BRESSA, M.J.; LUACES, J.P.; MERANI, M.S. Dipteran chromosomes: a simple method for obtaining high quality chromosomal preparations. **Current Science**. v. 107, n. 11, p. 1792-1794, 2014.

CHIRINO, M.G.; ROSSI, L.F.; BRESSA, M.J.; LUACES, J.P.; MERANI, M.S. Comparative study of mitotic chromosomes in two blowflies, *Lucilia sericata* and *L. cluvia* (Diptera, Calliphoridae), by C- and G-like banding patterns and rRNA loci, and implications for karyotype evolution. **Comparative Cytogenetics**. v. 9, n. 1, p. 103-118, 2015.

COURI, M.S. Two new species of *Fannia* Robineau-Desvoidy (Diptera, Fanniidae). **Brazilian Journal of Biology**. v. 64, p. 767-770, 2004.

COURI, M.S.; ARAÚJO, P.F. Uma nova espécie de *Fannia* Robineau-Desvoidy, 1830 do Brasil (Diptera, Fanniidae). **Revista Brasileira de Zoologia**. v. 6, p. 617-620, 1989.

COURI, M.S.; PAMPLONA, D. Uma nova espécie de *Fannia* Robineau-Desvoidy, 1830 (Diptera, Fanniidae) de Manaus (Amazonas, Brasil). **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi**. v. 6, p. 115-120, 1990.

COURI, M.S.; WINAGRASKI, E. New *Fannia* Robineau-Desvoidy from Amazonas, Brazil and new geographical record (Diptera, Fanniidae). **Revista Brasileira de Zoologia**. v. 22, p. 645-647, 2005.

CURTIS, S.K.; BENNER, D.B.; MUSIL, G. Ultrastructure of the Spermatozoon of *Megaselia scalaris* Loew (Diptera: Brachycera: Cyclorrhapha: Phoridae: Phoridae). **Journal of Morphology**. v. 200, p.47-61, 1989.

DALLAI, R.; AFZELIUS, B.A. Microtubular Diversity in Insect Spermatozoa: Results Obtained with a New Fixative. **Journal of Structural Biology**. v.103, p.164-179, 1990.

DALLAI, R.; BELLON, P.L.; LANZAVECCHIA, S.; AFZELIUS, B.A. The dipteran sperm tail: ultrastructural characteristics and phylogenetic considerations. **Zoologica Scripta**. v.22, n.2, p.193-202, 1993.

DE VAIO, E.S.; GRUCCI, B.; CASTAGNINO, A.M.; FRANCA, M.E.; MARTINEZ, M.E. Meiotic differences between three triatomine species (Hemiptera:Reduviidae). **Genetica**. v.67, p. 185-191, 1985.

FLESH FLIES (DIPTERA: SARCOPHAGIDAE). *Peckia (Squamatodes) ingens*. Disponível em: <<http://sarcophagidae.myspecies.info/taxonomy/term/168>>. Acesso em: 19 fev. 2018.

FOTEDAR, R. Vector potential of houseflies (*Musca domestica*) in the transmission of *Vibrio cholerae* in India. **Acta Tropica**. v.78, p.31-34, 2001.

GIROUX, M.; PAPE, T.; WHEELER, T.A. Towards a phylogeny of the flesh flies (Diptera: Sarcophagidae): morphology and phylogenetic implications of the acrophallus in the subfamily Sarcophaginae. **Zoological Journal of the Linnean Society**. v. 158, p. 740–778, 2010.

GOFF, M.L. Early post mortem changes and stages of decomposition in exposed cadavers. **Exp. Appl. Acarol**. v. 49, n.1-2, p. 21-36, 2009.

GRACZYK, T.K.; GRIMES, B.H.; KNIGHT, R.; DA SILVA, A.J.; PIENIAZEK, N.J.; VEAL, D.A. Detection of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* carried by synanthropic flies by combined fluorescent in situ hybridization and a monoclonal antibody. **The America Journal of Tropical Medicine & Hygiene**. v. 68, p.228-232, 2003.

GRELLA, M.D.; SAVINO, A.G.; PAULO, D.F.; MENDES, F.M.; AZEREDO-ESPIN, A.M.L.; QUEIROZ, M.M.C.; THYSSEN, P.J.; LINHARES, A.X. Phenotypic polymorphism of *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) may lead to species misidentification. **Acta Tropica**. v. 141, p. 60-72, 2015.

GUIMARÃES, J.H.; PAPAVERO, N. **Myiasis in man and animals in the neotropical region: bibliographic database**. Editora Plêiade/FAPESP Press, São Paulo, Brazil, 1999.

GUIMARÃES, J.H.; PRADO, A.P.; LINHARES, A.X. Three newly introduced blowfly species in Southern Brazil (Diptera: Calliphoridae). **Revista Brasileira de Entomologia**. v. 22, p. 53-60, 1978.

HOWELL, W.M.; BLACK, D.A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia**. v. 36, p. 1014-1015, 1980.

- LANDEEN, E.L.; PRESGRAVES, D.C. Evolution: From Autosomes to Sex Chromosomes – and Back. **Current Biology**. v.23, n.18, p. 848-850, 2013.
- LINDSAY, S.W.; LINDSAY, T.C.; DUPREZ, J.; HALL, M.J.R.; KWAMBANA, B.A.; JAWARA, M.; NURUDEEN, I.U.; SALLAH, N.; WYATT, N.; DALESSANDRO, U.; PINDER, M.; ANTONIO, M. *Chrysomya putoria*, a putative vector of diarrheal diseases. **PLoS Neglected Tropical Disease**. v.6, p. e1895, 2012.
- LINHARES, A. X.; THYSSEN, P.J. **Miíases de Importância Médica - Moscas e Entomologia Forense**. In: Geraldo Attilio De Carli. (Org.). Parasitologia Clínica - Seleção de Métodos e Técnicas de Laboratório para o Diagnóstico das Parasitoses Humanas. 2ed. Rio de Janeiro: Editora Atheneu, p. 709-730, 2007.
- MARINHO, M.A.T.; JUNQUEIRA, A.C.M.; PAULO, D.F.; ESPOSITO, M.C.; VILLET, M.H.; AZEREDO-ESPIN, A.M.L. Molecular phylogenetics of Oestroidea (Diptera: Calyptratae) with emphasis on Calliphoridae: Insights into the inter-familial relationships and additional evidence for paraphyly among blowflies. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. v.65, p. 840–854, 2012.
- MELLO, M.L.S.; VIDAL, B.C. **Práticas de Biologia Celular**. FUNCAMP Editora Edgard Blücher LTDA, Campinas, São Paulo, Brasil, 1980.
- MELLO, M.L.S. Cytochemistry of DNA, RNA and nuclear proteins. **Brazilian Journal of Genetics**. v.20, n.2, p.257-264, 1997.
- MISE, K.M.; ALMEIDA, L.M.; MOURA, M.O. Levantamento da fauna de Coleoptera que habita a carcaça de *Sus scrofa* L., em Curitiba, Paraná. **Revista Brasileira de Entomologia**. v.51, n.3, p. 358-368, 2007.
- MONTEIRO-FILHO, E.A.; PENEREIRO, J. Estudo da decomposição e sucessão sobre uma carcaça animal numa área do estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Biologia**. v.47, p. 289-295, 1987.
- MONZÓN, R.B.; SÁNCHEZ, A.R.; TADIAMAN, B.M.; NAJOS, O.A.; VALENCIA, E.G.; RUEDA, R.R.; VENTURA, J.V. A comparison of the role of *Musca domestica* (Linnaeus) and *Chrysomya megacephala* (Fabricius) as mechanical vectors of helminthic parasites in a typical slum area of metropolitan manila. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**. v.22, p. 222-228, 1991.
- MORERA, Y.A.; BERNAL, D.C.; VARGAS, M.; SEGURA, N.A.; GARCÍA, F.B. Caracterización citogenética de *Lucilia sericata* (Meigen, 1826) (Diptera: calliphoridae), Cepa Bogotá, Colombia. **Revista Ciencias de la Salud**. v. 9, n. 2, p. 111-124, 2011.
- MOURA, M.O.; DE CARVALHO, C.J.B.; MONTEIRO FILHO, E.L.A. A Preliminary Analysis Of Insects Of Medico-Legal Importance In Curitiba, State Of Paraná. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 92, n. 2, p. 269-274, 1997.

- NAME, K.P.O.; PUJOL-LUZ, J.R.; BÁO, S.N. Structure and ultrastructure of spermatozoa of *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae). **Micron**. v.41, p.853–860, 2010.
- NUORTEVA, P. Age determination of blood stain in a decaying shirt by entomological means. **Forensic Science**. v. 3, p. 89-94, 1974.
- OCHS, R. L.; BUSCH, H. Further evidence that phosphoprotein C23 (110Kd/p15,I) is the nucleolar silver staining protein. **Experimental Cell Research**. v. 152, p. 260-265, 1984.
- OHNO S. **Sex Chromosomes and Sex-linked Genes**. Springer Berlin Heidelberg. 1967.
- OLIVEIRA-COSTA, J. **Entomologia forense: quando os insetos são vestígios**. Campinas. Ed. Millenium. 3^a ed, 2011.
- PAPE, T. Catalogue of the Sarcophagidae of the world (Insecta: Diptera). **Memoirs on Entomology, International**. v.8, p. 5-557, 1996.
- PARISE-MALTEMPI, P.P.; AVANCINI, R.M.P. Cytogenetics of the neotropical flesh fly *Pattonella intermutans* (Diptera, Sarcophagidae). **Genetics and Molecular Biology**. v. 23, n.3, p. 563-567, 2000.
- PARISE-MALTEMPI, P.P.; AVANCINI, R.M.P. C-banding and FISH in chromosomes of the blowflies *Chrysomya megacephala* and *Chrysomya putoria* (Diptera, Calliphoridae). **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v.96, n.3, p. 371-377, 2001.
- PARISE-MALTEMPI, P.P.; AVANCINI, R.M.P. Comparative cytogenetic study in Muscidae flies. **Braz. J. Biol.** v.67, n.4, p. 945-950, 2007.
- PIWCZYNSKI, M.; SZPILA, K.; GRZYWACZ, A.; PAPE, T. A large-scale molecular phylogeny of flesh flies (Diptera: Sarcophagidae). **Systematic Entomology**. v.39, p.783–799, 2014.
- PONT, A.C.; WERNER, D. The Types of Fanniidae and Muscidae (Diptera) in the Museum fur Naturkunde, Humboldt-Universitat zu Berlin, Germany. **Zool. Reihe**. v. 82, n. 1, p. 3-139, 2006.
- 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.
- PURGATO, N.C.S. **Decomposição e sucessão ecológica de insetos associados a carcaças de suínos (*Sus scrofa* L.) em uma zona de transição no Sudeste do Brasil, com ênfase nas ordens Diptera e Coleoptera**. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2016.
- REGO, L.N.A.A.; ALEVI, K.C.C.; AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V.; MADI-RAVAZZI, L. Ultrastructural features of spermatozoa and their phylogenetic application in *Zaprionus* (Diptera, Drosophilidae). **Fly**. v.10, n.1, p. 47-52, 2016.

- ROBACK, S.S. The evolution and taxonomy of the Sarcophaginae (Diptera, Sarcophagidae). **Illinois Biological**. v.23, p. 1-181, 1954.
- ROGNES, K. *Fannia stigi* n. sp. from Scandinavia (Diptera: Fanniidae). **Entomologica Scandinavica**. v. 13, p. 325–330, 1982.
- ROZENDAAL, J.A. **Vector control methods for use by individuals and communities**. World Health Organization, Geneve, 1997.
- RUIZ, I.E.B. **Revisión del género *Peckia* Robineau-Desvoidy, 1830 (Diptera: Sarcophagidae) y análisis filogenético de sus subgéneros**. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 2009.
- SCHWEIZER, D. Reverse fluorescent chromosome banding with Chromomycin and DAPI. **Chromosoma**. v.58, p.307-324, 1976.
- SCOTLAND, R.W.; OLMSTEAD, R.G.; BENNETT, J.R. Phylogeny reconstruction: the role of morphology. **Systematic Biology**. v. 52, p. 539–548, 2003.
- SMITH, KGV. **A manual of forensic entomology**. Ithaca: Cornell University Press, 205p, 1986.
- SRIVASTAVA, R.; DABAS, A.; SRIVASTAVA, R.; GAUR, P. Qualitative analysis of chromosome from neural ganglia of flesh-flies *Sarcophaga*. **Biochem. Cell. Arch.** v. 12, n.1, p. 149-152, 2012.
- SUKONTASON, K.L.; CHAIWONG, T.; CHAISRI, U.; VOGTSBERGER, R.C.; SUKONTASON, K. Ultrastructure of male accessory glands of *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae). **J Vector Ecol.** v.34, p. 294–303, 2009.
- SUKONTASON, K.L.; CHAIWONG, T.; CHAISRI, U.; KURAHASHI, H.; SANFORD, M.; SUKONTASON, K. Reproductive Organ of Blow Fly, *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae): Ultrastructural of Testis. **J Parasitol Res.** v.2011: 690863, 2011.
- SUMNER, A.T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental Cell Research**. v. 75, p. 305-306, 1972.
- SZPILA, K. **Key for the Identification of Third Instars of European Blowflies (Diptera: Calliphoridae) of Forensic Importance**. In: Current concepts in forensic entomology, Edition: I, Publisher: Springer, Editors: Amendt J., Campobasso C.P., Goff M.L., Grassberger M., pp.43-56.
- TABOR, K.L.; BREWSTER, C.C.; FELL R.D. Analysis of the successional patterns on carrion in southwest Virginia. **Journal of Medical Entomology**. v. 41, n.4, p. 785-795, 2004.

- TAN, S.W.; YAP, K.L.; LEE, H.L. Mechanical transport of rotavirus by the legs and wings of *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). **Journal of Medical Entomology**. v.34, p. 527-531, 1997.
- THYSSEN, P.J.; DE SOUZA, C.M.; SHIMAMOTO, P.M.; SALEWSKI, T.B.; MORETTI, T.C. Rates of development of immatures of three species of *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) reared in different types of animal tissues: implications for estimating the postmortem interval. **Parasitology Research**. v. 113, p. 3373-3380, 2014.
- TRAUT, W. The evolution of sex chromosomes in insects: Differentiation of sex chromosomes in flies and moths. **Eur. J. Entomol.** v.96, p. 227-235, 1999.
- ÜLLERICH, F.H. Chromosomen verhältnisse, konstitutives heterochromatin und geschlechtsbestimmung bei einigen Arten der Gattung *Chrysomya* (Calliphoridae, Diptera). **Chromosoma**. v. 58, p. 113-136, 1976.
- VAIRO, K.P.; QUEIROZ, M.M.C.; MENDONÇA, P.M.; BARBOSA, R.R.; CARVALHO, C.J.B. Description of immature stages of the flesh fly *Peckia* (*Sarcodexia*) *lambens* (Wiedemann) (Diptera: Sarcophagidae) provides better resolution for taxonomy and forensics. **Tropical Zoology**. v. 28, p. 1-12, 2015.
- VASCONCELOS, S.D.; CRUZ, T.M.; SALGADO, R.L.; THYSSEN, P.J. Dipterans associated with a decomposing animal carcass in a rainforest fragment in Brazil: Notes on the early arrival and colonization by necrophagous species. **Journal of Insect Science**. v.13, p. 1-11, 2013.
- VERVES, Y.G. A preliminary list of species of Calliphoridae and Sarcophagidae (Diptera) of the Republic of Seychelles. **Phelsuma**. v. 11, p. 1-16, 2003.
- VIDAL, B.C. **Métodos em Biologia Celular**. In: Biologia Celular (Vidal, B. C. e Mello, M. L. S., eds.). Edições Atheneu, Rio de Janeiro. p. 5-34, 1987.
- WANG, M.F.; LI, K.; ZHANG, D. Taxonomic review of the *postica*-group of *Fannia* Robineau-Desvoidy (Diptera, Fanniidae) from China, with the description of one new species. **ZooKeys**. v. 112, p. 1-19, 2011.
- WENDT, L.S.; CARVALHO, C.J.B. Taxonomia de Fanniidae (Diptera) do sul do Brasil – II: Novas espécies e chave de identificação de *Fannia* Robineau-Desvoidy. **Revista Brasileira de Entomologia**. v. 53, n.2, p. 171-206, 2009.
- XUE, W.Q.; WANG, M.F.; LI, F.H. The descriptions of two new species of the genus *Fannia* R.-D. from China. **Acta Zootaxonomica Sinica**. v. 26, n. 2, p. 225–228, 2001.
- ZUMPT, F. **Myiasis in Man and Animals in the Old World: A Textbook for Physicians, Veterinarians, and Zoologists**. Butterworths, London, 267p, 1965.

8 Protocolo das técnicas citogenéticas convencionais e moleculares

8.1 Azul de Toluidina (MELLO e VIDAL, 1980)

Após a fixação, o material foi submetido ao seguinte protocolo:

- Reidratar;
- Corar com azul de toluidina pH 4,0 por 15 minutos;
- Larvar em água corrente para tirar o excesso de corante;
- Secar ao ar e fixar lamínula, para posterior análise.

8.2 DAPI (SCHWEIZER, 1976)

A coloração se inicia com a adição de uma gota de DAPI (2 µg/mL) em cima das células. Cubra com uma lamínula e guarde em uma caixa escura por 30 minutos. Retire a lamínula e o excesso de corante com um jato de água destilada e seque rapidamente a lâmina. Para a montagem da lâmina, coloque uma gota de meio de montagem glicerol/McIlvaine (contendo MgCl₂), cubra com uma lamínula e comprima ligeiramente entre duas folhas de papel de filtro para tirar o excesso de meio. Guarde em uma caixa escura por pelo menos três dias antes de analisar ao microscópio. Para observar a coloração DAPI use filtro de 340 a 380 nm no microscópio de fluorescência.

DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) 2 µg/mL - 10 mL de solução estoque:

- a) Solução estoque (100x): - Dissolva 2 mg de DAPI em 10 mL de água destilada. Divida em alíquotas e conserve no *freezer*.
- b) Solução de uso (2µg/ml): - Dilua 100 µL da solução estoque em 10 mL de tampão McIlvaine pH 7,0. Divida em alíquotas e guarde no *freezer*.

Dependendo do material, concentrações mais diluídas (1 ou 0,5 µg/ mL) podem dar melhor resultado.

Tanto a solução estoque quanto a de uso devem ser mantidas no *freezer*. A solução estoque deve ser dividida em pequenas alíquotas, em tubos de Eppendorf de 1 a 2 µL cada, mantidas no *freezer* e utilizadas até o final, uma a uma.

8.3 Fluorocromo Acridine Orange (VIDAL, 1987)

O procedimento de coloração do material compreende mergulhar a lâmina, com o material fixado, em solução de alaranjado de acridina (0,5 µg/mL) diluído em tampão fosfato (0,1 M; pH 7,2) durante 15-20 minutos.

Após esse período, a lâmina é montada com glicerol e, logo após, deve ser realizada a análise do material para que não ocorra perda da fluorescência.

A solução de alaranjado de acridina é obtida pela mistura de 0,5g de *Acridine Orange* com 100 mL de água destilada ou tampão fosfato.

8.4 Impregnação por íons prata (HOWELL; BLACK, 1980)

Após o preparo usual das lâminas, segue-se o seguinte procedimento:

- Pingar uma gota de solução reveladora (solução de gelatina a 2%, acrescida de 0,5 mL de ácido fórmico) sobre o material limpo e seco;
- Adicionar duas gotas de solução de nitrato de prata a 50% à solução reveladora e misturá-las delicadamente;
- Cobrir com uma lamínula;
- Colocar as lâminas em uma placa de Petri contendo papel filtro umedecido com água deionizada (câmara úmida) e incubar em estufa pré-aquecida a 70°C, até que a mistura das soluções se torne uma coloração marrom-dourada (cerca de 7 minutos);
- Lavar a lâmina em água destilada corrente, até que a lamínula se desprenda;
- Secar ao ar e montar em verniz cristal no dia seguinte, para posterior análise.

A solução reveladora é obtida dissolvendo-se 1g de gelatina em 50 mL de água deionizada, e acrescentando-se 0,5 mL de ácido fórmico.

A solução de nitrato de prata a 50% é obtida pela dissolução de 1g de AgNO₃ em 2 mL de água deionizada.

8.5 Orceína Lacto-Acética (DE VAIO et al., 1985, com modificações de acordo com ALEVI et al., 2012)

Com o material fixado, seguir os seguintes passos:

- Secar a lâmina;
- Pingar uma gota de orceína lacto-acética;
- Cobrir com uma lamínula e esperar 5 minutos;
- Lavar a lâmina em água destilada corrente, até que a lamínula se desprenda;
- Secar ao ar e montar em verniz cristal no dia seguinte, para posterior análise.

A solução de orceína lacto-acética é obtida a partir da dissolução de 2g de orceína em 85mL de solução de ácido láctico/ácido acético 1:1 pré-aquecida (cerca de 80°C). Acrescenta-se 15mL de água destilada após 24 horas e filtra-se após 24h. Guardar a solução em um frasco escuro.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

TERMO DE REPRODUÇÃO XEROGRÁFICA

Autorizo a reprodução xerográfica do presente Trabalho de Conclusão, na íntegra ou em partes, para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, ____/____/____

Assinatura da autora