

LEVANTAMENTO DE SARCOFAGÍDEOS (DIPTERA) DO  
BRASIL INCLUINDO A CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE  
*PECKIA (PATTONELLA) INTERMUTANS* (WALKER)

**JANDUI ALMEIDA AMORIM**

Dissertação apresentada ao Instituto de  
Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP,  
para obtenção do título de Mestre no  
Programa de Pós-Graduação em Biologia  
Geral e Aplicada e Área de concentração em  
*Biologia de parasitas e microorganismos.*

*Patrícia Jacqueline Thyssen* (orientadora)

**BOTUCATU – SP.**

**2009**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

LEVANTAMENTO DE SARCOFAGÍDEOS (DIPTERA) DO  
BRASIL INCLUINDO A CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE  
*PECKIA (PATTONELLA) INTERMUTANS* (WALKER)

JANDUI ALMEIDA AMORIM

PATRICIA JACQUELINE THYSSEN

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências,  
Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título  
de Mestre no Programa de Pós-Graduação em  
Biologia Geral e Aplicada e Área de concentração em  
*Biologia de parasitas e microorganismos.*

*Patrícia Jacqueline Thyssen* (orientadora)

BOTUCATU – SP.

2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO  
DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP

**BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus**

Amorim, Jandui Almeida.

Levantamento de sarcófagídeos (Diptera) do Brasil incluindo a caracterização molecular de *Peckia (Pattonella) intermutans* (Walker) / Jandui Almeida Amorim – Botucatu: [s.n.], 2009.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Botucatu, 2009.

Orientadora: Patrícia Jacqueline Thyssen

Assunto CAPES: 20400004

1. Parasitologia 2. Microorganismos 3. Entomologia forense  
4. Moscas

CDD 595.7

Palavras-chave: DNAm; Entomologia Forense; Genética de populações; Muscomorpha; Taxonomia.

*“O primeiro pecado da humanidade foi a fé;  
a primeira virtude foi a dúvida”.*

**Carl Sagan**

*“A água em estado líquido é uma condição necessária para a vida da forma como a conhecemos, mas está longe de ser suficiente. A vida ainda tem de se originar na água, e a origem da vida pode ter sido um acontecimento altamente improvável. A evolução darwiniana prossegue facilmente depois que a vida se origina. Mas como a vida começou? A origem da vida foi o evento químico, ou a série de eventos, através dos quais as condições vitais para a seleção natural surgiram pela primeira vez. O principal ingrediente foi a hereditariedade, seja o DNA ou (mais provavelmente) alguma coisa que faz cópias como o DNA, mas com menos precisão, talvez seu primo, o RNA. Uma vez que o ingrediente vital — algum tipo de molécula genética — está no lugar certo, a seleção natural darwiniana pode acontecer, e a vida complexa emerge como consequência.”*

**Richard Dawkins**

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Jandui e Georgina, criadores das condições necessárias à consolidação da minha formação de base e fornecedores dos fundamentos morais e éticos que guiam minha vida e me permitem valorizar o conhecimento.

À minha orientadora e amiga Dra. Patrícia Jacqueline Thyssen, pela oportunidade de reingressar na vida acadêmica e orientação.

Aos professores Dr. Arício Xavier Linhares, Dr. Ângelo Pires do Prado e Dr. Odair Benedito Ribeiro pelas estimulantes aulas de Entomologia e Parasitologia.

Aos colegas do Laboratório de Entomologia do IB-Unicamp: Thiago C. Moretti, Maicon D. Grella, Alexandre R. S. Fornari, Marcos J. Alves-Jr., Carina M. Souza e Kelsen Freitas, pelo apoio técnico, os cansativos esforços de coleta e troca de idéias sobre Parasitologia.

À Dra. Roseli Tuan pela oportunidade de estagiar no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da SUCEN e sugestões na elaboração da dissertação.

Ao Dr. Adriano Pinter, Dra. Ana Maria Duarte, Ricardo Zanna, Natália Barom e Kleber Whitaker pela ajuda nos persistentes esforços de bancada.

À Dra. Marisa Guimarães e Dra. Fernanda Ohweiller pelo empréstimo da lupa.

Aos colegas Danilo Carvalho, Carol Ghirardelli, Fernanda Takahashi, Evelin, Cíntia e Jucimara Freire, pelos papos descontraídos durante o almoço.

Aos guardas da portaria da SUCEN, Samuel e Rodrigo, por estarem sempre de olho na minha “motoca”, perigosamente estacionada na conturbada Rua Paula Souza.

Aos professores Dr. Wesley A. C. Godoy e Dr. Lucas del Bianco Faria pelas sugestões e contribuições no exame de qualificação.

Aos colegas Juliana Gião, Juliana Neves, Helton Otsuka, Carolina Reigada, Andressa Bernardes, Luciane Galindo, Giuliana Ruggiero e Carlos A. Alves pela solicitude e hospitalidade nas visitas intermitentes à Botucatu.

Ao pessoal da secretaria de pós-graduação do IBB da Unesp pelos serviços.

Aos amigos Dr. Anderson Ferreira da Cunha, pela preciosa assessoria no desenho dos *primers*, e Dr. Douglas Mascara, pelas enriquecedoras “trocas de figurinhas” sobre experiências profissionais em Biologia.

À Andrea, com carinho, pela paciência nos momentos em que me ausentei e estímulo naqueles em que estive presente.

Aos companheiros Dr. Fabiano “Careca” Scarpa, Dr. J. Rodolfo Lima, Jemuso Go Takano, Johnny Higa e Edson Higa pela longa amizade fraterna e discussões científicas e “abobristicas”.

Às amigas “Ramonés”, Fê e Roberta, pelo incentivo à distância e “olho vivo” nas eventuais oportunidades de emprego para biólogo.

À estimada “Cambada Breaca” e seus agregados: Ed Guedes, Rogério Salerno, Ricardo “Bozó” Gracelli, Rodrigo “Cabeludo” Gracelli, Cristiano “Bucudo”, Fabinho, Vladimir “Juninho” Nicolas, Rodrigo “H” Tavares e Ronaldo, pela “sonzeira” contra o *stress* e as velhas aventuras do *rock’n’roll*. “O Diabo é o pai do *rock*!!!!”.

Ao Edu Narihissa, Zé Ricardo Verona, Maurício “Chimbinha” Nishikata, Carlos “Casé”, Glauce “Domingas”, Cíntia Shimohara, Venerando Santiago, sempre “quebrando o galho” nos freqüentes pedidos de mudança dos horários de trabalho, e a todos os outros amigos do Objetivo, por tolerarem meu mau-humor nos plantões e intervalos de aula.

Aos meus alunos e ex-alunos, por me incitarem ao aprendizado contínuo.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo apoio financeiro concedido a este projeto.

## ÍNDICE GERAL

	Resumo .....	01
	Abstract .....	02
<b>1</b>	- <b>Introdução e Revisão Bibliográfica</b> .....	<b>03</b>
1.1	- Caracterização e importância dos organismos estudados .....	04
1.2	- Procedimentos para a identificação dos insetos .....	11
1.2.1	- Análise morfológica .....	11
1.2.2	- Ferramentas moleculares – considerações teóricas .....	11
1.3	- Marcadores moleculares utilizados para insetos .....	18
1.3.1	- DNA mitocondrial (DNAMt) .....	18
1.3.2	- DNA nuclear .....	21
1.4	- Tipos de dados interpretáveis em análises moleculares .....	23
1.4.1	- Eletroforese de aloenzimas .....	23
1.4.2	- PCR-RFLP (PCR - polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição) .....	23
1.4.3	- RAPD (DNA polimórfico amplificado aleatoriamente) .....	23
1.4.4	- SSCP (polimorfismo conformacional de filamento único) .....	24
1.4.5	- AFLP (polimorfismo no comprimento de fragmentos amplificados) .....	24
1.4.6	- Sequenciamento de bases nucleotídicas .....	25
1.5	- Validação de testes moleculares para a identificação de insetos de importância forense .....	25
1.6	- Os polêmicos barcodes de DNA .....	26
<b>2</b>	- <b>Objetivos Gerais</b> .....	<b>29</b>
<b>3</b>	- <b>Lista e distribuição geográfica de espécies de dípteros da subfamília Sarcophaginae (Diptera) no território brasileiro de 1938 a 2008</b> .....	<b>30</b>
3.1	- Introdução .....	30
3.2	- Material e métodos .....	31
3.3	- Resultados e discussão .....	33
<b>4</b>	- <b>O uso de sequência COI (DNAMt) para análise da variabilidade de <i>Peckia (Pattonella) intermutans</i> (Diptera: Sarcophagidae) de populações de São Paulo e Bahia, Brasil</b> .....	<b>48</b>

4.1 -	Introdução .....	48
4.2 -	Material e métodos .....	50
4.3 -	Resultados e discussão .....	55
<b>5</b> -	<b>Conclusões Gerais</b> .....	<b>66</b>
<b>6</b> -	<b>Referências bibliográficas</b> .....	<b>67</b>
<b>7</b> -	<b>Apêndices</b> .....	<b>83</b>

## RESUMO

Tendo em vista a grande similaridade interespecífica, a identificação de muitos sarcófagídeos usando os caracteres morfológicos é complicada e, sob este aspecto, o desenvolvimento e a aplicação de ferramentas moleculares se mostram cada vez mais necessários à resolução taxonômica e sistemática de diversas espécies. Os dípteros da família Sarcophagidae, especialmente os de hábito necrófilo, têm recebido destaque no campo forense devido à constância com que são encontrados associados a cadáveres, podendo contribuir de forma relevante na estimativa do intervalo pós-morte (IPM), descoberta do local e causa da morte, entre outros. No entanto, para que os espécimes coletados sejam usados de forma apropriada na obtenção de informações para auxiliar o trabalho de perícia, é primordial a identificação correta dos organismos, já que o IPM pode ser calculado com base na taxa de desenvolvimento que varia entre as diferentes espécies. Neste estudo, 194 espécies pertencentes à subfamília Sarcophaginae (Diptera), incluídas em 30 gêneros, são listadas levando em conta suas respectivas distribuições geográficas registradas no território brasileiro. Os gêneros que apresentaram uma grande diversidade de espécies foram *Oxysarcodexia* (24,7%), *Lepidodexia* (10,9%), *Peckia* (10,3%) e *Dexosarcophaga* (8%). *Oxysarcodexia amorosa*, *O. thornax*, *Peckia (Euboettcheria) collusor*, *Peckia (Pattonella) intermutans* e *Sarcodexia lambens* são encontradas na maioria dos estados brasileiros. No arquipélago de Fernando de Noronha, além de *Nephochaetopteryx calida*, que não apresenta até o momento registro de ocorrência para as localidades continentais, foram encontradas espécies de ampla distribuição no Brasil: *O. thornax*, *P. (Peckia) chrysostoma* e *Tricharaea (Sarcophagula) occidua*. Adicionalmente, a análise da variabilidade genética entre representantes de populações de *Peckia (Pattonella) intermutans* (Walker) das cidades de Campinas, Jundiaí, Mogi-Guaçu e Ubatuba (SP) e Salvador (BA) foi efetuada, com base em seqüências nucleotídicas da região carboxi-terminal do gene mitocondrial Citocromo Oxidase I (COI). Esta última abordagem pode contribuir na validação de uma metodologia para identificação molecular da espécie no Estado de São Paulo.

## ABSTRACT

Due to high interspecific similarity, the identification of many sarcophagids by morphological characters is complicated and, in this way, the development and application of molecular tools have been required to address taxonomic and systematic species. The flies of the Sarcophagidae family, especially necrophagous species, have received attention in the forensic field because of the frequency with which they are found associated with cadavers, thus may contribute to estimate the post-mortem interval (PMI), the discovery of place and cause of death, among other. However, for the specimens collected are used properly in obtaining information to assist the investigation, the correct identification of species is essential, since the PMI can be based on the development rate that varies among different species. In this study, 194 species belonging to the Sarcophaginae subtribe (Diptera), included in 30 genera, are listed taking into account their geographic distribution throughout the Brazilian territory. The genera that showed a great species diversity were: *Oxysarcodexia* (24.7%), *Lepidodexia* (10.9%), *Peckia* (10.3%) and *Dexosarcophaga* (8%). *Oxysarcodexia amorosa*, *O. thornax*, *Peckia (Euboettcheria) collusor*, *Peckia (Pattonella) intermutans* and *Sarcodexia lambens* are found in most Brazilian states, and only 3 of these were recorded in Fernando de Noronha archipelago, including *Nephochaetopteryx calida*, which until now has no record of occurrence for continental locations. Furthermore, genetic variability analysis among population of *Peckia (Pattonella) intermutans* (Walker) from Campinas, Jundiaí, Mogi Guaçu, Ubatuba (all cities located in São Paulo State) and Salvador (Bahia State) were performed based on sequences of carboxy-terminal region of the Cytochrome Oxidase I (COI) mitochondrial gene. This latter approach may help to validate a methodology for molecular identification of species from São Paulo State.

## 1 – INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Após a morte, os tecidos de animais, inclusive de humanos, são atrativos para uma grande variedade de invertebrados, especialmente insetos sarcossaprófagos (Nuorteva, 1977). Assim, a aplicação do estudo de insetos e outros artrópodes em associação aos procedimentos criminalísticos, campo científico conhecido como Entomologia Forense, tem contribuído para descobrir informações que possam ser úteis a uma investigação no âmbito legal (Smith, 1986). Entre as várias aplicações da Entomologia Forense, uma das mais freqüentemente empregadas e discutidas é a estimativa do intervalo pós-morte (IPM), que pode ser obtida com base no tempo de desenvolvimento dos espécimes encontrados junto ao cadáver ou no processo de sucessão ecológica apresentado pela fauna cadavérica (Oliveira-Costa, 2007).

Na fauna associada à decomposição de cadáveres, os dípteros, principalmente das famílias Calliphoridae e Sarcophagidae, demonstram maior potencial informativo para análises forenses por serem os primeiros a chegar em um corpo e apresentarem um padrão de sucessão de espécies previsível ao longo da decomposição (Campobasso *et al.*, 2001; Marchenko, 2001).

Para uma acurada estimativa do IPM é essencial fazer a identificação correta dos insetos associados à decomposição, assim como conhecer seu ciclo de vida e suas características ecológicas e biológicas (Erzinçlioglu, 1983). Contudo, para certos grupos como, por exemplo, Sarcophagidae, a diferenciação até o nível de específico pode ser complicada em função de fatores como o grande número de espécies, a falta de diferenças morfológicas observáveis entre as mesmas, a carência de chaves taxonômicas e a insuficiência na descrição dos caracteres morfológicos em algumas já existentes. Na indisponibilidade de indivíduos adultos, tais dificuldades se intensificam, pois nos estágios imaturos as diferenças morfológicas são ainda mais inconspícuas (Thyssen *et al.*, 2005) exigindo que o espécime seja levado ao laboratório para completar o seu desenvolvimento. Deste modo, uma rápida e apurada identificação de espécies torna-se difícil, mesmo para taxonomistas experientes (Liu & Greenberg, 1989).

Nas duas últimas décadas, frente aos obstáculos da taxonomia morfológica, técnicas de biologia molecular têm sido usadas para auxiliar na identificação e diferenciação de espécies de dípteros, entre os quais estão os insetos mais freqüentemente usados no cálculo da estimativa do IPM (Wells & Stevens, 2008). A organização simples, o baixo número de recombinações e a alta taxa de substituições nucleotídicas fazem com que o DNAm seja o

marcador mais utilizado em estudos de sistemática molecular e genética populacional de insetos (Caterino *et al.*, 2000). A facilidade na recuperação eficiente de informações genéticas de amostras danificadas ou pobremente preservadas também favorece o seu uso dentro da área forense (Junqueira *et al.*, 2002; Otranto & Stevens, 2002). Assim, a caracterização da subunidade I do gene mitocondrial Citocromo Oxidase (COI) é hoje amplamente aplicada na obtenção de dados de identificação espécie-específicos (para espécies de importância forense ver Sperling *et al.*, 1994; Malgorn & Coquoz, 1999; Wallman & Donnellan, 2001; Harvey *et al.*, 2003; Zehner *et al.*, 2004; Saigusa *et al.*, 2005; Wells *et al.*, 2007).

O conhecimento dos padrões de distribuição geográfica dos insetos também é outra ferramenta indispensável na Entomologia Forense. A discrepância entre a composição da entomofauna presente em um corpo e aquela observada na região geográfica onde o mesmo foi descoberto pode fornecer evidências de que a vítima foi deslocada (Benecke, 1998). No nível intraespecífico, estudos comparativos entre populações de dípteros localizadas em regiões geográficas separadas, mostram um padrão notório de variabilidade ao se utilizarem marcadores de natureza bioquímica (Brown *et al.*, 1998) ou genética (Roehrdanz, 1989; Stevens & Wall, 1995; Taylor *et al.*, 1996; Infante-Malachias *et al.*, 1999; Wells *et al.*, 2007; Alamalakala *et al.*, 2008). Tal abordagem é fundamental para a validação de ferramentas moleculares na identificação de espécies, considerando que isto só é possível diante da confirmação de monofiletismo recíproco (Wells & Williams, 2007).

O presente estudo visou promover um levantamento da distribuição geográfica das espécies de Sarcophaginae (Diptera: Sarcophagidae) mais comuns no território brasileiro, bem como caracterizar geneticamente populações de *Peckia (Pattonella) intermutans* (Walker), uma das espécies mais comumente associadas a corpos em decomposição no Estado de São Paulo, de acordo com dados da literatura. Tais informações devem contribuir para a identificação destes dípteros, principalmente quando associados a questões de âmbito forense. Uma revisão mais aprofundada dos problemas e a atual situação dentro da área objeto deste estudo serão apresentadas nos itens a seguir.

## **1.1 – Caracterização e importância dos organismos estudados**

O filo Arthropoda inclui, dentro do subfilo Hexapoda, a classe Insecta (Brusca & Brusca, 2003). São animais em geral relativamente pequenos com corpo organizado em cabeça (seis segmentos), tórax (três segmentos) e abdome (até onze segmentos). Na cabeça

são encontrados: um par lateral de olhos compostos, dois ou três ocelos mediais, um par de antenas articuladas, geralmente com função quimio e termorreceptora, mandíbulas e maxilas, cujo segundo par se funde formando o lábio. A estrutura do aparato bucal apresenta grande variação pela modificação de suas peças em função das adaptações a diferentes hábitos alimentares. No tórax, o centro locomotor, há um par de pernas por segmento, cada uma usualmente dividida em coxa, trocanter, fêmur, tíbia, tarso e pré-tarso, também existindo freqüentemente um ou dois pares de asas originárias do segundo e terceiro segmentos. O abdome é desprovido de apêndices e apresenta em sua terminação a genitália, cuja morfologia é bastante variável (Gillot, 2005).

Denotando o grande sucesso evolutivo dos insetos, aproximadamente um milhão de espécies já foram descritas em todo o mundo (Pimm *et al.*, 1995), mas as estimativas do número total de espécies existentes são controversas, variando de três milhões a mais de 30 milhões (May, 1990). Embora a maior biodiversidade se concentre nas florestas tropicais, encontram-se seus representantes em todas as partes do planeta, até mesmo em ambientes antárticos (Usher & Edwards, 1984) e marinhos (Andersen, 1999).

Segundo Gillot (2005), as ordens de insetos com maior diversidade são Coleoptera (300.000 espécies), Lepidoptera (200.000), Hymenoptera (130.000) e Diptera (110.000). Yeates *et al.* (2007) apontaram a existência de 150.000 espécies nesta última. O atual esquema de classificação para os insetos tem seguido a proposta de Gillot (2005) (Tabela 1.1).

Desse modo, a grande relevância atribuída à entomologia é justificada pelas várias formas como os insetos podem interagir com o ser humano. Na agricultura, muitos deles constituem pragas de lavouras causando grandes prejuízos econômicos: certas larvas de dípteros ao se criam em frutos ainda em desenvolvimento, tornando-os inaceitáveis ao mercado (Malavasi *et al.*, 1980); lagartas de lepidópteros danificam plantações de milho, inutilizando-as (Carvalho, 1978); alguns hemípteros e coleópteros se alimentam de sementes ainda presentes nas plantas ou quando as mesmas se encontram estocadas, diminuindo a rentabilidade da cultura ou do produto (Zucchi *et al.*, 1993); danos causados por certos isópteros às plantações de cana ou à silvicultura, que também podem ser atacadas por espécies de himenópteros, no caso, formigas (Boaretto & Forti, 1997; Costa-Leonardo, 2002). Embora, não possam deixar de ser apontados os benefícios de abelhas que, além de produzirem mel, agem como polinizadores aumentando a produção de frutos em pomares (Malerbo-Souza *et al.*, 2003), ou de algumas pequenas espécies de vespas que, por serem parasitóides de outros insetos, servem ao controle biológico de pragas (LaSalle, 1993).

**Tabela 1.1.** Atual esquema de classificação de organismos da Classe Insecta de acordo com Gillot (2005).

---

**Classe Insecta**

- Subclasse Apterygota → Ordem Microcoryphia  
→ Ordem Zygentoma
  - Subclasse Pterygota
    - Infraclasse Paleoptera
      - Ordem Ephemeroptera
      - Ordem Odonata
    - Infraclasse Neoptera
      - \* Divisão Polyneoptera (ortopteróides)
        - Ordem Orthoptera
        - Ordem Grylloblattodea
        - Ordem Dermaptera
        - Ordem Plecoptera
        - Ordem Embioptera
        - Ordem Dictyoptera
        - Ordem Isoptera
        - Ordem Phasmida
        - Ordem Mantophasmatodea
        - Ordem Zoraptera
      - \* Divisão Paraneoptera (hemipteróides)
        - Ordem Psocoptera
        - Ordem Phthiraptera
        - Ordem Hemiptera
        - Ordem Thysanoptera
      - \* Divisão Oligoneoptera (endopterigotas)
        - Ordem Mecoptera
        - Ordem Lepidoptera
        - Ordem Trichoptera
        - Ordem Diptera
        - Ordem Siphonaptera
        - Ordem Neuroptera
        - Ordem Megaloptera
        - Ordem Raphidioptera
        - Ordem Coleoptera
        - Ordem Strepsiptera
        - Ordem Hymenoptera
- 

Muitos insetos adaptaram-se a ambientes modificados pela ação do homem tornando-se total ou parcialmente dependentes deste para sua existência. A partir disso, Nuorteva (1963) estabeleceu um índice de sinantropia para inferir o grau de afinidade de certos dípteros com o ser humano. Em ambientes urbanos e rurais, por exemplo, insetos sinantrópicos podem freqüentemente causar doenças ou atuarem como vetores mecânicos ou biológicos de organismos patogênicos ao homem e animais domésticos. Assim, assumem grande

importância médico-veterinária pelo prejuízo gerado à saúde pública e à economia pecuária (Eldridge & Edman, 2004). Greenberg (1971) tratou com especial atenção a grande relevância que pode ter o conhecimento dos dípteros da subordem Brachycera sob o aspecto sanitário, visto que muitos de seus representantes possuem elevado índice de sinantropia e comumente estão associados a material em decomposição proveniente de fezes, lixo e animais mortos, no qual se alimentam adultos e larvas, possibilitando a veiculação de uma série de microrganismos nocivos ao transitarem neste substrato. Sem mencionar que as larvas de algumas espécies, ao se alimentarem oportunamente de tecidos mortos ou não de animais vivos, em casos de feridas abertas ou com dificuldade de cicatrização, podem lhes causar miíases.

Historicamente, o uso de insetos na busca de resolução para os problemas legais nos remete a centenas de anos no passado. O primeiro registro documental desta prática é atribuído à China do século XIII quando, em um caso de homicídio entre camponeses, os possíveis suspeitos foram obrigados a depositarem suas foices no chão, permitindo que moscas atraídas por traços invisíveis de sangue revelassem a provável arma do crime. Após a identificação do dono da ferramenta foi obtida a confissão de autoria do delito mencionado (Benecke, 2001).

Em seu livro *La faune des cadavres*, Mégnin (1894) descreveu que insetos colonizam corpos de animais em ondas sucessivas, mostrando como a ciência pode aplicar tal conhecimento a favor da área legal e, desta maneira fundou e difundiu a área da Entomologia Forense.

Muitos anos depois, Lord & Stevesson (1986) propuseram dividir a entomologia forense em três categorias: a do tipo urbana que, por exemplo, movida por ações cíveis pode determinar o tempo decorrido entre a colonização inicial de um imóvel por cupins e a percepção da presença dos insetos pelo atual proprietário; a de produtos estocados, relacionada à contaminação de produtos processados ou manufaturados por insetos; e a médico-legal, que permite esclarecer as circunstâncias ou a data da morte em casos nos quais cadáveres são encontrados sob condições suspeitas. Nesta última abordagem, de longe a mais utilizada e discutida, enquadram-se aplicações como a estimativa do intervalo pós-morte (IPM), verificação acerca de possível transporte do corpo do local onde originalmente ocorreu o óbito, associação de suspeitos com a cena do crime (Benecke, 1998), investigação de possível negligência nos cuidados com crianças (Benecke, 1998; Benecke & Lessig, 2001) ou idosos (Benecke *et al.*, 2004) e associação de drogas com o cadáver (Introna *et al.*, 2001).

Outras questões também podem ser resolvidas com o auxílio da Entomologia Forense, tais como a identificação da origem de drogas importadas (Crosby *et al.* 1986), verificação de maus tratos a animais domésticos (Anderson & Huitson, 2004) e determinação do IPM de animais abatidos em caça ilegal para associação de suspeitos com o crime ambiental (Anderson, 1999).

Segundo Amendt *et al.* (2004), adultos, lavas, pupas, pupários ou exuvias podem servir como evidências entomológicas às investigações. Os autores ainda consideram que, entre os integrantes da fauna cadavérica, Diptera (moscas) e Coleoptera (besouros) necrófagos ou predadores destes são os principais indicadores forenses por poderem estar presentes em todas as fases do processo de decomposição, sendo os primeiros de maior importância por chegarem ao cadáver antes de quaisquer outros insetos. Nesta ordem, as famílias Calliphoridae e Sarcophagidae agregam as espécies mais frequentemente encontradas associadas a corpos de animais em decomposição (Byrd & Castner, 2001).

A estimativa do IPM com dados entomológicos foi feita pela primeira vez por Bergeret (1855), sendo hoje a aplicação da Entomologia Forense mais citada e discutida em artigos científicos. Pode ser feita com base no tempo de desenvolvimento das larvas ou nos padrões de sucessão ao longo do processo de decomposição (Oliveira-Costa, 2007). Algumas espécies são extremamente assemelhadas sob o ponto de vista morfológico, principalmente no estágio larval, mas são bionomicamente muito diferentes (Byrd & Castner, 2001). Por isso, para que um espécime (ou seus produtos metabólicos) seja utilizado com confiabilidade visando-se inferir o IPM são indispensáveis sua correta identificação no nível espécie-específico e o conhecimento do seu ciclo de vida e suas características ecológicas e biológicas (Erzinçlioglu, 1983; Higley & Haskell, 2001).

Os organismos mais usados como indicadores forenses são as moscas das famílias Calliphoridae e Sarcophagidae, integrantes da ordem Diptera, cuja classificação é bastante controversa. O modelo utilizado com maior frequência é o de McAlpine & Wood (1989), os quais propõem duas subordens: Nematocera e Brachycera.

Em Nematocera, o corpo de indivíduos adultos em geral é mais delgado e estão presentes longas antenas que possuem de seis a 14 segmentos. As larvas têm cabeça bem diferenciada e mandíbulas móveis no plano horizontal. Nesta subordem estão as famílias contendo os dípteros mais primitivos, embora Culicidae tenha sofrido irradiações relativamente recentes.

Em Brachycera, onde se encontram as moscas, as antenas são dotadas de menos de sete segmentos e, freqüentemente, há uma arista. As larvas têm cabeça pouco diferenciada ou são acéfalas com mandíbulas em forma de foice e móveis no plano vertical. Esta subordem era tradicionalmente subdividida em dois grupos: Cyclorrhapha, atual infraordem Muscomorpha, e Orthorrhapha, atuais infraordens Tabanomorpha e Asilomorpha. O esquema seguinte (Tabela 1.2) descreve, de acordo com McAlpine & Wood (1989), a classificação de Muscomorpha, que agrega os califorídeos e sarcófagídeos.

**Tabela 1.2.** Esquema de classificação de organismos da Infraordem Muscomorpha.

<b>Categorias taxonômicas</b>	<b>Categoria taxômica em nível de família</b>
<b>* DIVISÃO ASCHIZA</b>	
→ Superfamília Platypezoidea:	Platypezidae (inclui Opetiidae) Lonchopteridae Fronomyiidae Sciadoceridae Phoridae (inclui Termitoxeniidae)
→ Superfamília Syrphoidea:	Syrphidae (inclui Microdontidae) Pipunculidae
<b>* DIVISÃO SCHIZOPHORA</b>	
Subdivisão ACALYPTRATA	
→ Superfamília Neroidea:	Micropezidae (inclui Calobatidae, Taeniapteridae e Tylidae) Neriidae Cypselosomatidae (inclui Pseudopomyzidae)
→ Superfamília Diopsoidea:	Tanypezidae Strongylophthalmyiidae Psilidae Somatiidae Nothybiidae Megamerinidae Syringogastridae Diopsidae (inclui Centriocidae)
→ Superfamília Conopoidea:	Conopidae (inclui Stylogasteridae)
→ Superfamília Tephritoidea:	Lonchaeidae Otitidae (inclui Euxestidae, Pterocallidae e Ulidiidae) Platystomatidae Tephritidae Pyrgotidae Tachiniscidae Richardiidae Pallopteridae (inclui Eurygnathomyiidae) Piophilidae (inclui Neottiophilidae e Thyreophoridae)
→ Superfamília Lauxanioidea:	Lauxaniidae Eurychoromyiidae Celyphidae Chamaemyiidae
→ Superfamília Scimyzoidea:	Coelopidae Dryomyzidae (inclui Helcomyzidae) Heloscimyidae

	Sciomyzidae (includi Phaeomyiidae)
	Ropalomeridae
	Sepsidae
→ Superfamília Opomyzoidea:	
- - - Suprafamília Clusioinea	Clusiidae
	Acartophthalmidae
- - - Suprafamília Agromyzoinea	Odiniidae
	Agromyzidae
	Fergusoninidae
- - - Suprafamília Opomyzoinea	Opomyzidae
	Anthomyzidae
- - - Suprafamília Asteioinea	Aulacigastridae (includi Stenomicridae)
	Periscelididae
	Neurochaetidae
	Teratomyzidae
	Xenasteiidae (= Tunisimyidae)
→ Superfamília Carnoidea:	Asteiidae
	Australimyzidae
	Braulidae
	Carnidae
	Tethinidae
	Canacidae
	Milichiidae
	Risidae
	Cryptochetidae
→ Superfamília Sphaeroceroidea:	Chloropidae (includi Mindidae e Siphonellopsidae)
	Heleomyzidae (includi Borboropsidae, Chiropteromyzidae, Cnemospathidae, Heteromyzidae, Notomyzidae, Rhinotoridae e Trixoscelididae)
	Mormotomyiidae
	Chyromyidae
→ Superfamília Ephydroidea:	Sphaeroceridae
	Curtonotidae
	Camillidae
	Drosophilidae
	Diastatidae (includi Campichoetidae)
	Ephydriidae
Subdivisão CALYPTRATAE	
→ Superfamília Hippoboscoidea:	Glossinidae
	Hippoboscidae
	Strebliidae
→ Superfamília Muscoidea:	Nycteribiidae
	Scathophagidae
	Anthomyiidae
	Faniidae
→ Superfamília Oestroidea:	Muscidae (includi Eginiidae)
	Calliphoridae
	Mystacinobiidae
	Sarcophagidae
	Rhinophoridae
	Tachinidae (includi Stackelbergomviidae)
	Oestridae (includi Cuterebridae, Gasterophilidae e Hypodermatidae)

---

## **1.2- Procedimentos para a identificação dos insetos**

A Taxonomia visa classificar os seres vivos em categorias de acordo com critérios estabelecidos pela Sistemática Filogenética, ciência que busca descrever e explicar a grande diversidade de formas de vida com base na história evolutiva dos grupos existentes ou já extintos. Considerando a importância da identificação de insetos para sua utilização na criminalística, percebe-se a necessidade de estudos detalhados a respeito da Sistemática dos representantes desta classe. Grosso modo, o objetivo é criar sistemas de classificação que reflitam a filogenia dos grupos.

### **1.2.1- Análise morfológica**

A identificação morfológica dos dípteros de interesse forense adultos é feita através de chaves que se baseiam, preponderantemente, nos padrões de segmentação das antenas, nervura das asas, distribuição de cerdas, pigmentação do corpo e estrutura da genitália masculina (Oliveira-Costa, 2007). Sendo este último caráter o único recurso para a distinção de várias espécies, principalmente dentro da família Sarcophagidae (Carvalho & Mello-Patiu, 2008). Muitas vezes estas chaves são pouco precisas ou claras, além de nem sempre estarem disponíveis em acervos de fácil acesso para o taxonomista. Contudo, quando se trabalha com imaturos, a tarefa de identificar espécimes se torna ainda mais complicada, pois a quantidade de referências bibliográficas disponíveis é ainda menor e os caracteres apresentam diferenças menos conspícuas, observadas na estrutura do esqueleto cefálico, bem como na disposição e morfologia dos espiráculos, tubérculos e espinhos associados ao tegumento (Lopes, 1943 e 1982a; Amorim & Ribeiro, 2001; Thyssen & Linhares, 2007). Técnicas de microscopia de varredura também são úteis para uma identificação mais acurada de espécimes adultos ou imaturos (Leite & Lopes, 1989; Lopes & Leite, 1989 e 1990; Sukontason *et al.*, 2003). Percebe-se que os exemplares machos adultos são os mais facilmente identificáveis, porém, fêmeas, larvas e pupas são mais freqüentemente coletadas junto a carcaças de animais.

### **1.2.2- Ferramentas moleculares – Considerações teóricas**

Tendo em vista as grandes dificuldades impostas à identificação morfológica de certos grupos de insetos, a utilização de marcadores moleculares – relacionados às seqüências de nucleotídeos dos ácidos desoxirribonucléico (DNA) e ribonucléico (RNA) ou, ainda, às seqüências de aminoácidos de proteínas –, sendo passíveis de observação em análises

comparativas, cresceu espantosamente nos estudos de sistemática durante as últimas décadas, resultando na elaboração de novas hipóteses filogenéticas e, conseqüentemente, em mudanças observadas, principalmente nos níveis taxonômicos mais baixos (Caterino *et al.*, 2000).

Ainda na década de 1960, emergiam dois campos do conhecimento que se conjugariam à também recente Sistemática Filogenética de Hennig (1966) para darem-lhe inestimável apoio: as ciências biomoleculares e a computação. O conhecimento da estrutura das macromoléculas (DNA, RNA e proteínas) permitiu que uma quantidade gigantesca de informações fosse adicionada àquelas de natureza morfológica, bioquímica e ecológica acumuladas até o presente momento, preenchendo muitas lacunas no entendimento dos processos de diversificação dos seres vivos, o que pode ser evidenciado pelas reformas promovidas na classificação e nomenclatura de grande parte dos organismos que conhecemos. Para que os crescentes volume e variedade de dados pudessem ser utilizados de forma plena nos estudos evolutivos, foi imprescindível o desenvolvimento de algoritmos computacionais de alta complexidade para o processamento e análise de tamanha quantidade de dados (Hillis *et al.*, 1996).

Neste contexto, o advento da reação em cadeia da polimerase (PCR) (Mullis *et al.*, 1986), mecanismo que replica exponencialmente seqüências nucleotídicas de DNA *in vitro*, facilitando sua detecção e análise, é reconhecido como um marco revolucionário para as áreas das ciências de um modo geral, permitindo a integração entre diversos campos do conhecimento e o avanço, sobretudo, da Sistemática (Palumbi, 1996), a qual engloba a Taxonomia e a Biologia Evolutiva.

Continuaram ocorrendo progressos em favor das técnicas laboratoriais relacionadas a essa abordagem das ciências biológicas, entre os quais podemos citar o desenvolvimento de *kits* comerciais para extrair, amplificar e purificar o material genético obtendo altas qualidade e quantidade de amostras gênicas, a automação do processo de seqüenciamento do DNA (Hunkapiller *et al.* 1991) e a elaboração de ferramentas computacionais cada vez mais sofisticadas para o tratamento e interpretação dos resultados gerados em tais análises (Mount, 2001; Fogel & Corne, 2002). Com esta maior acessibilidade aos dados moleculares é muito comum observarmos novas propostas e discussões nos trabalhos de sistemática e análise filogenética publicados atualmente.

Caracteres moleculares são traços genéticos e, portanto, sua hereditariedade lhes faz úteis na reconstrução de histórias evolutivas. Quando apresentados sob a forma de seqüências de nucleotídeos são de natureza genotípica e, normalmente, não apresentam variações

decorrentes de fatores ambientais, como acontece freqüentemente com caracteres de natureza fenotípica (morfológicos, fisiológicos, etológicos etc.), permitindo que quaisquer organismos sejam estudados e comparados sob uma abordagem universal, inclusive com relação ao grau de divergência entre *taxa*. Tais seqüências representam uma fonte virtualmente infinita de dados acessíveis às técnicas moleculares, podendo trazer à luz polimorfismos silenciosos reveladores de informações importantes sobre a evolução dos organismos. Certos casos em que não se consegue distinguir analogias de homologias através de caracteres fenotípicos são solucionados através de dados moleculares. Sob estes argumentos, Avise (1994) defende a utilização de marcadores de DNA para a inferência filogenética e estudos de genética populacional, mas lembra também que tanto a escolha do marcador quanto do método analítico utilizado para o mesmo podem interferir diretamente no resultado. Dessa forma, apesar de seu grande valor, o uso de dados moleculares não garante por si só que uma árvore filogenética construída possa estar correta.

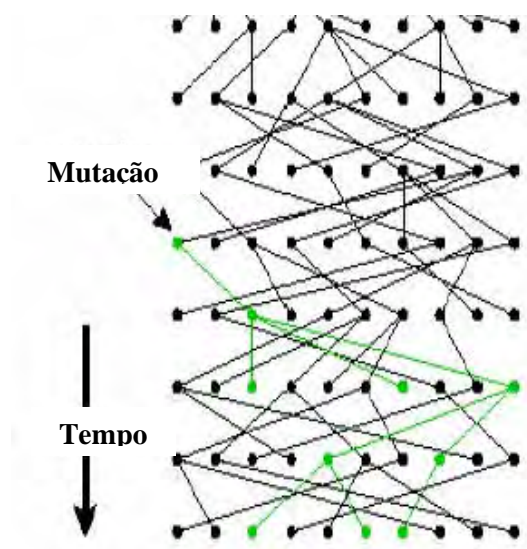
O termo “relógio molecular” foi introduzido por Zuckerkandl & Pauling (1965) para ilustrar como a acumulação de substituições de nucleotídeos, supostamente em uma taxa constante durante a evolução das moléculas, pode auxiliar na construção de árvores filogenéticas. Nesta mesma década, Kimura (1968) formalizou a Teoria Neutra da Evolução, afirmando que em grande maioria as mutações incidentes sobre o DNA dos indivíduos são neutras, ou seja, indiferentes à adaptabilidade das espécies. Um exemplo comum é o das mutações silenciosas, que sob efeito da degeneração do código genético não alteram a cadeia de aminoácidos em proteínas. O autor aborda a deriva gênica como força evolutiva predominante na fixação de mutações ao longo das gerações. De acordo com seus princípios, as mutações sujeitas à seleção natural, quando deletérias, são comuns, mas tendem a não se fixar, enquanto as vantajosas são raras e de rápida fixação se comparadas às neutras, contribuindo pouco para a variabilidade genética e tendo potencial informativo menor para estudos evolutivos. Embora a teoria tenha sido recebida como antidarwinista por alguns representantes da comunidade científica, Kimura (1983) defende sua compatibilidade com as idéias de Darwin (1859).

Ainda neste contexto, Jukes & Cantor (1969) elaboraram um modelo simples de substituição de nucleotídeos, assumindo que as transições (trocas entre bases púricas ou entre bases pirimídicas) ocorrem com a mesma probabilidade que as transversões (trocas entre bases púricas e pirimídicas). Hoje, muitos pesquisadores relatam em vários grupos de animais uma propensão maior a transições do que transversões e observam a importância de não se

ignorar tal fato na inferência filogenética (Lin & Danforth, 2004; Frati *et al.*, 1997; Kocher *et al.*, 1989). Assim, Kimura (1980) estabeleceu um modelo de correção denominado “dois-parâmetros” ou K80, o qual incorpora três premissas básicas: há diferenças nas taxas de transições e transversões, todas as quatro bases nitrogenadas do DNA (A,T,C e G) ocorrem na mesma frequência e as taxas de substituição não variam entre os diferentes sítios nucleotídicos.

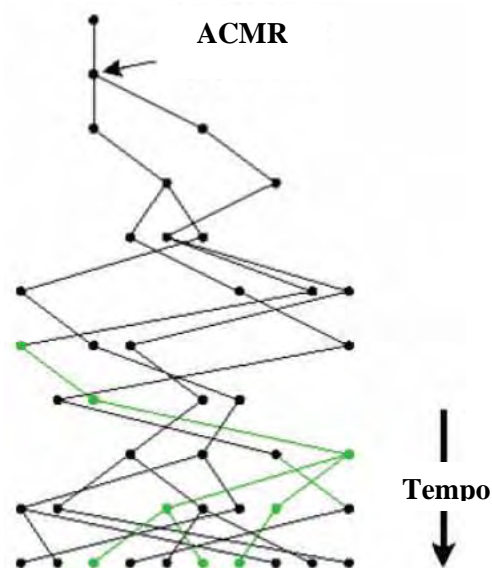
Também considerando que a substituição dos nucleotídeos do DNA ao longo do tempo pode ser vista como um processo estocástico, governado unicamente pela deriva genética, um modelo muito utilizado no estudo da evolução molecular é o de Wright-Fisher (Fisher, 1930; Wright, 1931), que se baseia em relações genealógicas e leva em conta o número de indivíduos envolvidos nos termos do tamanho efetivo da população ( $N_E$ ) (Fig. 1.1). Sua aplicação parte dos seguintes pressupostos: a população em questão, formada por haplótipos diplóides, tem tamanho constante ao longo de gerações discretas (sem sobreposição) e é panmítica. Inexistem recombinações e diferenças de valor adaptativo entre os indivíduos, nos quais cada sítio poderá sofrer apenas uma mutação, sendo esta herdada por todos os seus descendentes e somente eles. Desta forma, a probabilidade de fixação de uma nova mutação em uma população de  $N$  indivíduos será  $\frac{1}{2} N$ .

**Fig. 1.1.** Exemplo ilustrativo do estudo genealógico pelo modelo de Wright-Fisher.



A Teoria da Coalescência (Kingman, 1982a e 1982b) pode ser entendida como uma extensão da Teoria Neutra da Evolução associada a um aperfeiçoamento do modelo de Wright-Fisher, permitindo, pela comparação de seqüências de DNA amostradas em populações de uma mesma espécie, a obtenção de árvores de genes reveladoras do grau de proximidade entre os mesmos e, possivelmente, do ponto temporal em que se encontra aquele contido no ancestral comum mais recente (ACMR) (Fig. 1.2). Seus três princípios básicos são: em uma população, cada um dos alelos de um loco gênico deve descender de uma única e mesma cópia de um gene presente na população inicial; todas as outras linhagens alélicas foram extintas; e a probabilidade de uma linhagem existente ser originária de um gene ancestral específico é igual à frequência inicial do mesmo. A versão original desta teoria não considera o efeito exercido por quaisquer mutações sobre o valor adaptativo dos indivíduos e o fenômeno da recombinação, levando Avise *et al.* (1987) a inferirem que é bastante útil para a visualização dos padrões de variação nucleotídica no DNA mitocondrial.

**Fig. 1.2.** Exemplo ilustrativo do estudo genealógico pela Teoria da Coalescência.



Para uma população diplóide de tamanho  $N$  e taxa constante de mutações neutras  $\mu$  (Kimura, 1983), a frequência inicial de uma nova mutação é  $\frac{1}{2} N$  e o número de novas mutações por geração é  $2 N\mu$ . Assim, assume-se que a taxa de fixação para mutações

independentes da seleção natural será o produto da multiplicação destes dois últimos valores, resultando simplesmente na taxa de introdução de novas mutações ( $\mu$ ).

Hudson (1991) aponta que o tamanho uma população, sua estrutura geográfica e seus alelos selecionados influem em genealogias construídas a partir deste modelo. Estas e outras variáveis acrescentadas por vários colaboradores à Teoria da Coalescência – tais como recombinações, seleção balanceada e migrações – são discutidas por Fernandes-Matioli (2001).

Homologias entre seqüências de nucleotídeos ou aminonoácidos indicam ancestralidade comum, embora seja frequentemente confundida com similaridade. Esta última tem caráter quantitativo e representa o nível de semelhança entre seqüências, sendo empiricamente observável e testável, enquanto a primeira é de natureza qualitativa, devendo ser inferida. Ou seja, pode-se aferir a similaridade de certas seqüências entre zero e 100%, mas não há sentido em dizer que as mesmas são 10, 20, 60 ou 80% homólogas. Elas simplesmente são ou não, o que é determinado *a priori* com base no grau de similaridade e nos fatores que a geraram. Contudo, é comum a confusão entre este dois parâmetros como descrevem Reeck *et al.* (1997).

Entre os fatores potencialmente influentes na similaridade que causam maior perturbação às análises filogenéticas, mascarando as verdadeiras e produzindo falsas homologias, estão a convergência, reversão e reticulação (decorrente de fluxo gênico interpopulacional ou de hibridização interespecífica). Segundo Slatkin & Madison (1989), esta última gera rompimento no padrão de divergência das linhagens, permitindo estimativas de fluxo gênico entre populações, mas pode frustrar tentativas de se usarem métodos filogenéticos para a compreensão de relações intraespecíficas ou interespecíficas. De modo geral, o uso de árvores filogenéticas para inferências de relações entre populações, só é válido se as mesmas são independentes quanto ao gene utilizado (Joseph *et al.*, 1995).

Deduz-se, portanto, que a reconstrução da história evolutiva de um grupo pela utilização genes requer que estes sejam homólogos, mas isso não é o suficiente, pois a homologia de seqüências pode ocorrer sob diferentes circunstâncias (Moritz & Hillis, 1996):

- Ortologias: a duplicação de um gene em um ancestral comum é seguida de especiação, separando as seqüências homólogas, as quais divergem, exceto na função.

- Paralogias: a duplicação de um gene, sem envolver especiação, gera seqüências homólogas e as duas divergem em função intraespecificamente. Se seqüências parálogas sofrerem processo de homogeneização dentro de um *taxon* em função de evolução conjunta,

Patterson (1988) sugere que sejam relacionadas por plerologia. E Wolfe (2000) propõe o termo onologia para a relação entre genes parálogos derivados de um processo de duplicação do genoma completo, os quais julga interessantes para estudos evolutivos por terem divergido pelo mesmo período de tempo a partir de suas origens.

- Xenologias: homologia de seqüências decorrente de transferência horizontal de genes.

A partir dos dados apresentados por esses autores confirma-se a idéia de que, apenas seqüências homólogas ortólogas são úteis à inferência filogenética e, confundí-las com parálogas, pode resultar em filogenias corretas para as moléculas, mas não para os organismos. Fitch (2000) faz uma boa discussão dos problemas envolvidos com a identificação correta de homologias.

De acordo com Simon *et al.* (1994) a ocorrência de substituições múltiplas de nucleotídeos em um único sítio fará com que os eventos substitutivos mais recentes impeçam a percepção dos mais antigos. Isso pode levar a conclusões errôneas que fazem confundir homoplasias com sinapomorfias, ou modificam a interpretação das distâncias filogenéticas entre organismos. Porém, estatisticamente, é possível identificar quais são os genes mais propensos às rápidas substituições, permitindo aplicar mecanismos para minimizar ou contornar esta dificuldade. Os sistemas de correção mais realistas são baseados nas diferenças de probabilidade da ocorrência de substituições entre diferentes sítios nucleotídicos e na tendência de ocorrerem transições ou transversões para ou em um mesmo sítio, como o K80. Contudo, estas correções não anulam completamente os efeitos das substituições múltiplas, o que leva muitos autores a defenderem o uso exclusivo e único de regiões com alto grau de conservação.

Yang (1998) sugere haver uma preocupação excessiva em relação ao prejuízo que sítios com substituições múltiplas podem causar à confiabilidade de inferências filogenéticas baseadas em análise de parcimônia e critica os esquemas adotados por pesquisadores que atribuem pesos baixos aos sítios que apresentam substituições rápidas e pesos altos para aqueles cujas substituições são lentas, sem levarem em conta que genes de evolução rápida são mais úteis ao esclarecimento de relações filogenéticas entre categorias taxonômicas mais basais. Em contrapartida, os sítios nucleotídicos de evolução mais lenta serão mais informativos (e menos freqüentes) para os taxa mais distantes, resultando em árvores mais robustas. Segundo o autor, uma seqüência não corrigida poderá ser considerada saturada de mutações, o que inviabiliza seu potencial informativo para a resolução de filogenias (Jeffroy *et al.*, 2006), quando atingir ao menos 30 a 40% de divergência e não a partir de 15 a 20% de

divergência como sugeriu Meyer (1994). Finalmente, aponta que os maiores problemas encontrados quando são analisadas seqüências muito divergentes recaem sobre a dificuldade em se realizar alinhamentos e sobre a heterogeneidade nas freqüências de bases entre espécies, indicando que o processo de substituição também é heterogêneo, o que pode gerar homoplasias.

É importante notar ainda que a velocidade do processo de substituições de nucleotídeos é maior do que a da especiação. Caso essa diferença não seja considerada é praticamente certo que a inferência filogenética para o grupo taxonômico em questão não refletirá realmente a sua história evolutiva, mas sim a dos alelos do gene utilizado como marcador molecular. Pamilo & Nei (1988) discutem este obstáculo e sugerem a utilização de várias seqüências de DNA provenientes locos gênicos diferentes, cada uma com evolução independente das outras, como uma maneira de contorná-lo. Este mesmo tipo de incongruência pode ocorrer quando polipeptídeos são usados como marcadores (Fitch, 1970).

Inferências baseadas em caracteres moleculares podem se tornar mais consistentes se os mesmo forem avaliados quanto ao peso sob mais de um critério e também associados a outros tipos de informações, como dados sobre aloenzimas, estrutura cromossômica e morfologia, devendo-se dar preferência aos genes cujo nível de variabilidade minimiza o problema das substituições múltiplas e aumenta o compartilhamento de caracteres não homoplásicos (Hillis *et al.*, 1996).

### **1.3 - Marcadores moleculares utilizados para insetos**

#### **1.3.1- DNA mitocondrial (DNAm)**

A fonte de marcadores mais utilizada em análises filogenéticas para insetos e outros animais é o DNAm. Essa grande aceitação se deve a algumas vantagens que o mesmo apresenta: relativa facilidade de isolamento e amplificação (incluindo de espécimes mal conservados), permite análises mais claras já que parte de indivíduos normalmente homoplásmicos (lembrando que a herança mitocondrial é normalmente materna) originários de linhagens estritamente dicotômicas de haplótipos, não apresenta recombinação e tem alta taxa de evolução (Avice, 1994). Porém, deve-se atentar para a existência de seqüências nucleares muito similares a genes mitocondriais, os pseudogenes, cuja presença pode gerar confusões em análises filogenéticas, exigindo maiores precauções na metodologia a ser

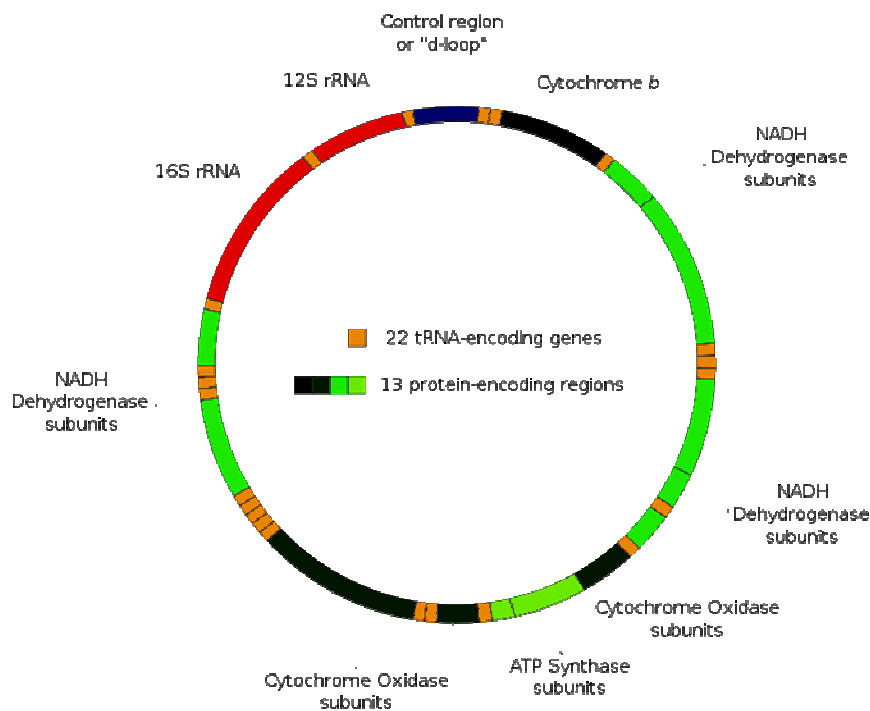
seguida (Zhang & Hewitt, 1996). A Figura 1.3 mostra as diferentes regiões que compõem o DNAm.

### 1.3.1.a - Genes codificadores de RNA ribossomal

O gene para a subunidade 12S do RNAr se mostra filogeneticamente útil para *taxa* distantes, mas pode ser problemático para esclarecer relações entre espécies com divergência recente. Estudos intraespecíficos com *Drosophila pseudoobscura* e *D. persimilis* (Noor & Larkin, 2000) utilizando este marcador mostraram pouca variação, comprometendo a confiabilidade dos dados para a genética de populações. Em outro estudo entre espécies proximamente relacionadas de simulídeos, a região 3' do gene 12 S demonstrou ter aplicabilidade filogenética limitada pela pouca diferença interespecífica observada (apesar de suficiente para identificação) (Ballard, 1994).

Contudo, a geração de homoplasias pelas substituições seriadas pode não ser problemática em comparações entre espécies mais distantemente relacionadas, para as quais seqüências bem conservadas dentro do gene 12S podem fornecer informações úteis. Kambhampati (1995) obteve com este gene dados sobre a filogenia entre Dictyoptera e Isoptera concordantes com os padrões já estabelecidos.

**Fig. 1.3.** Esquema da molécula de DNAm mostrando as diferentes regiões que a compõe.



Quanto ao gene 16S, Simon *et al.* (1994) compararam estudos realizados sobre sua região 3' com dípteros, ortópteros e bactérias, observando que também tem características altamente conservadas, ao passo que a região 5' não pode ser alinhada entre dípteros e gafanhotos. Além disso, relatam que a alta tendência à transversões nesta região reduz muito sua utilidade como marcador filogenético para *taxa* mais basais. Neste artigo, citam ainda uma ampla gama de iniciadores universais disponíveis para o DNAm de insetos, permitindo assim ampliações confiáveis de genes ou regiões homólogas em vários grupos desta ordem.

Xiong & Kocher (1993) utilizaram seqüências da extremidade 3' de gene 16S para investigar um complexo de cinco espécies crípticas de simulídeos distinguíveis apenas por análise cromossômica e encontraram diferença de apenas 5,2% entre as seqüências de bases. A alta freqüência de transversões observada no nível interespecífico comparada com a baixa freqüência apresentada dentro de cada espécie indica a possível ocorrência de substituições múltiplas. Em contrapartida, DeSalle (1992) encontrou entre diferentes gêneros da família Drosophilidae relações filogenéticas baseadas na região em questão do gene 16S, as quais tiveram grande concordância com aquelas previamente obtidas a partir de morfologia.

### **1.3.1.b - Genes codificadores de proteínas**

As regiões codificadoras das subunidades I e II da proteína citocromo oxidase (COI e COII) do DNA mitocondrial estão entre as mais freqüentemente abordadas, incluindo no que se refere ao número de *taxa* quando comparadas às demais, na sistemática de insetos. O mesmo não é observado para outros genes mitocondriais codificadores de proteínas como ND1 (NAD desidrogenase 1), ND2, ND4, ND5, Cyt b (citocromo b) e COIII, cujos ensaios para filogenia tendo sido conduzidos de forma isolada devido ao baixo número de resultados satisfatórios produzidos (Caterino *et al.*, 2000).

Além disso, Simon *et al.* (1994) compilam dados de vários estudos com COI e a elegem como a região mais conservada, em termos de evolução dos aminoácidos. Exemplificando, descrevem um estudo no qual seis espécies de colembolos pertencentes a dois gêneros de famílias diferentes mostraram os seguintes níveis de divergência nas seqüências nucleotídicas: intraespecífica de 1 a 6% , interespecífica (dentro de um mesmo gênero) de 13 a 25% e entre gêneros de 23 a 28%. Para COII estes mesmos autores relatam dados compilados e não publicados, analisando sua aplicabilidade, e observam que a divergência nas seqüências nucleotídicas entre famílias de Thysanoptera ocorre em mesmo grau daquela observada entre esta ordem e Hemiptera. Porém, em Collembola, estudos

envolvendo este gene mostram resultados diferentes, com 20% de divergência entre espécies do mesmo gênero contra 30% entre gêneros de diferentes famílias.

A falta de aplicabilidade também é relatada por Liu & Beckenback (1992) ao comparar 10 ordens de insetos, através da taxa de substituição de aminoácidos codificados pelo gene COII. Segundo os autores, o nível de similaridade entre libélulas e moscas (70%) não é muito diferente daquele observado entre formigas e vespas (65%), levando à conclusão de que é desconexo o valor deste parâmetro para relacionar grau de divergência taxonômica. Assim, pode-se concluir que mesmo proteínas que evoluem lentamente, como COII, que mantém a maioria das posições de aminoácidos conservadas, nem sempre são úteis para esclarecer ou definir relações filogenéticas em *taxa* mais altas, como no nível de família ou ordem.

Já Zehner (2004), utilizando ND5 e COI para comparar a filogenia de 12 espécies europeias de Sarcophagidae (Diptera), observou que o cladograma obtido a partir de ND5 forneceu melhores valores de *bootstrap* (o que pode representar uma taxa de evolução maior para este gene em relação a COI, apesar da diferença entre eles não ter sido muito grande), além de ser o mais concordante em relação às inferências tradicionalmente aceitas, fundamentadas na morfologia do grupo.

### **1.3.2 - DNA nuclear**

O entendimento de que árvores baseadas apenas em genes mitocondriais podem fornecer uma visão parcial e tendenciosa da filogenia de um organismo levou alguns pesquisadores a pensar no uso e exploração de informações relacionadas aos genes nucleares, como marcadores, para entender as relações existentes entre os artrópodes.

#### **1.3.2.a - Genes codificadores de RNA ribossomal**

Embora ainda timidamente utilizados, se comparados ao DNAm, os marcadores nucleares de maior evidência são os genes codificadores de RNA ribossomal (DNAr), devido à sua abundância e facilidade de amplificação e seqüenciamento. Hillis & Dixon (1991) descrevem um arranjo composto pelos genes 18 S, 5.8 S e 28 S, separados por regiões espaçadoras transcritas e não transcritas, formando um mosaico com regiões bem conservadas, que podem ser interessantes para a resolução de conflitos em *taxa* superiores, e outras bem variáveis, cujo alinhamento costuma ser freqüentemente problemático.

Caterino *et al.* (2000) inferem que, para categorias taxonômicas superiores, a utilização de 18S, cujas análises completas geralmente dão suporte a relações de grande congruência com as hipóteses previamente estabelecidas baseadas na morfologia, vem se tornando um padrão, exceto em Diptera e Hymenoptera para as quais se observa predominantemente estudos das regiões ITS (Internal Transcribed Spacer) e 28 S, embora para esta última a obtenção de fragmentos relativamente pequenos (menos de 500 pb) dificulte as comparações de resultados.

Segundo estes mesmos autores, os eventos de divergência mais recentes podem ser de melhor maneira representados por genes nucleares codificantes de proteínas, com taxas de evolução variadas – os quais têm se mostrado uma alternativa na resolução de problemas em níveis para os quais o DNAm é muito conservado –, tendo em vista a variação típica que apresentam quanto à posição de seus codons. Contudo, há desvantagens tais como a possibilidade de heterozigose, o baixo número de cópias obtidas na extração e necessidade da utilização de PCR-transcriptase reversa devido à possível ocorrência de introns extensos (Fang *et al.*, 1997).

### **1.3.2.b - Genes codificadores de proteínas**

Poucos estudos filogenéticos de insetos utilizam genes nucleares codificadores de proteínas, entre os quais o fator de alongação 1 $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ ) tem sido muito observado. Suas seqüências demonstram grande valor em estudos nos níveis de espécie e gênero, embora apresente paralogias (Cho *et al.*, 1995; Danforth & Ji, 1998; Moran *et al.* 1999; Brady & Danforth, 2004).

Apesar de sua recente descoberta, os *introns* internos aos genes nucleares codificadores de proteínas, estão sendo cada vez mais aplicados à sistemática. Palumbi (1996), por exemplo, oferece uma seleção de *introns* e *primers* potencialmente úteis para este fim.

Em um artigo relativamente recente, Caterino *et al.* (2000) realizam um incrível apanhado dos marcadores moleculares já utilizados na sistemática de insetos e argumentam que a grande variedade destes observada em estudos filogenéticos prejudica a capacidade de se somarem os esforços empreendidos por diferentes pesquisadores para um entendimento mais amplo do assunto. Além disso, a maioria dos marcadores escolhidos e desenvolvidos é mais informativa em grupos basais como espécies e subespécies, complementando ou até mesmo resolvendo suas filogenias, mas em níveis taxonômicos superiores poucos estudos

incluem dados suficientes para serem mais do que esboços grosseiros de perfis filogenéticos, tornando limitado o impacto da biologia molecular sobre a nomenclatura formalizada.

## **1.4 - Tipos de dados interpretáveis em análises moleculares**

### **1.4.1 - Aloenzimas**

A aplicação desta técnica dentro da sistemática tem se tornado cada vez menos freqüente em nível interespecífico, comparada ao uso de marcadores de DNA, mas ainda constitui uma importante base de apoio em estudos de genética populacional e de diagnóstico de espécies. Apesar das críticas sobre a confiabilidade de dados de mobilidade eletroforética para a inferência de homologias, técnicas como eletroforese seqüencial têm ajudado a lidar com o problema. Assim, a análise de aloenzimas ainda permanece como um método efetivo e de baixo custo para confirmação de dados moleculares obtidos sob outras formas (Murphy *et al.*, 1996).

### **1.4.2 – Microssatélites**

Na busca de variações, nem sempre geradoras de resultados conclusivos, estudos de sistemática e genética de populações têm freqüentemente recorrido às porções não codificantes do genoma, inclusive a partir de microssatélites (seqüências com unidades de repetição muito curtas entre as quais dinucleotídeos são as mais comuns), que têm um alto grau de polimorfismo em função da alta freqüência de mutação, tornando-se úteis nas análises nos níveis de espécie ou inferiores, ou seja, para linhagens. Isto tem sido freqüentemente observado para Hymenoptera (Choudhary *et al.*, 1993), Diptera de interesse médico e econômico (Luna *et al.*, 2001; Norris *et al.*, 2001; Baliraine, 2003), Coleoptera (Keller & Largiadér, 2002; Sallé *et al.*, 2003; Kim & Sappington, 2005) e, com certa dificuldade para a aplicação, em Lepidoptera (Zhang, 2004).

### **1.4.3 - PCR-RFLP (PCR - polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição)**

No PCR-RFLP as amostras de DNA amplificadas são submetidas à digestão por enzimas de restrição em sítios específicos, gerando fragmentos que formam um padrão de bandas através da eletroforese em gel (Saiki *et al.*, 1985). Mapeados os sítios de restrição, o RFLP é uma alternativa rápida nos estudos de variação de seqüências em conjuntos representativos do genoma permitindo a reconstrução de filogenias (Vanlerberghe-Massuti,

1994) e, mais freqüentemente, o diagnóstico de *taxa* crípticos a partir da análise do DNAm (Murray *et al.*, 2008) ou nuclear (Alam *et al.*, 2007). Há vários registros do emprego desta técnica na identificação de insetos (como por exemplo, nos de interesse forense, em Schroeder *et al.*, 2003; Ratcliffe *et al.*, 2003; Thyssen *et al.*, 2005).

#### **1.4.4 - RAPD (DNA polimórfico amplificado aleatoriamente)**

O RAPD consiste na utilização de *primers* de anelamento aleatório e teve projeção no campo da sistemática a partir da última década pela facilidade de não requerer o desenho de iniciadores específicos (Williams *et al.*, 1990). Os problemas são: a interpretação possivelmente errônea de que certos fragmentos de DNA, que migram juntos na eletroforese, sejam homólogos, a notória dificuldade na repetibilidade dos resultados, a obtenção de fragmentos com tamanho suficiente para dar consistência aos resultados e a necessidade de conjugação de algum outro método de análise (como seqüenciamento ou PCR-RFLP) para a verificação dos dados (Matioli & Passos-Bueno, 2001). Apesar disso, defende Benecke (1998) que, tomados os devidos cuidados, o RAPD se revela uma técnica de pouco custo e rápida.

#### **1.4.5 - SSCP (polimorfismo conformacional de filamento único)**

Esta técnica é baseada em diferenças na estrutura secundária do DNA, decorrentes de variações na seqüência nucleotídica, e na conseqüente variação da sua taxa de mobilidade eletroforética. O gene é denaturado e a fita simples toma uma conformação específica, através de dobramento, de acordo com sua seqüência de bases. Esta conformação e, portanto, a seqüência de bases terá reflexo no deslocamento durante a eletroforese, permitindo detectar polimorfismos, como em heterozigose (Orita *et al.*, 1989). Hayashi (1991) observou sensibilidade à diferença de um único par de bases através do SSCP. Na sistemática entomológica o SSCP é aliado ao PCR de um fragmento específico com o propósito de diagnosticar espécies e utilizado para a triagem de polimorfismos intra e interespecíficos, os quais podem ser seqüenciados para análises filogenéticas. Wong *et al.* (2008) desenvolveram marcadores SSCP individuais para *Aedes aegypti*, os quais provavelmente serão úteis em estudos de campo.

#### **1.4.6 - AFLP (polimorfismo no comprimento de fragmentos amplificados)**

De acordo com Matioli & Passos-Bueno (2001), o AFLP permite a localização de polimorfismos distribuídos aleatoriamente entre organismos. Após serem digeridos por

enzimas de restrição em sítios aleatórios, fragmentos de DNA se ligarão arbitrariamente a adaptadores nos quais irão anelar iniciadores que permitirão sua amplificação. Alamalakala *et al.* (2008) utilizaram esta técnica para a identificação de moscas causadoras de miíases, visando à monitoração das mesmas no ambiente.

#### **1.4.7 - Seqüenciamento de bases nucleotídicas**

O seqüenciamento de DNA tem sido a técnica predominante no levantamento de dados para a sistemática molecular e apresenta duas vantagens principais: a comparabilidade das seqüências obtidas em diferentes estudos (a opção de locos, iniciadores e métodos analíticos similares possibilita o acúmulo de um banco de dados uniformizados e passíveis de comparação) e o consenso da concepção de evolução como veículo de diversificação do DNA. Contudo, é um recurso relativamente oneroso para a obtenção de informações genéticas, pois demanda um equipamento caro e sofisticado, o qual nem sempre está disponível ao pesquisador (Avisé *et al.*, 1994).

Várias alternativas no tratamento de marcadores podem ser mais adequadas em termos operacionais e financeiros, de acordo com a aplicação que se almeja. Embora questões sobre níveis taxonomicamente inferiores, como estrutura populacional ou limite e diagnóstico de espécies, freqüentemente possam ser resolvidas com eletroforese de aloenzimas, RFLP, SSCP, AFLP ou RAPD, em certos casos é necessária a conjugação de uma ou mais dessas técnicas com seqüenciamento para uma resolução satisfatória (Hillis *et al.*, 1996).

Encontram-se depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>) centenas de milhares de seqüências extraídas dos insetos e a lista dos genes envolvidos no estudo da sistemática do grupo é crescente. Tal diversidade de marcadores indubitavelmente contribui com a sistemática molecular de insetos, mas, por outro lado, há o risco de se incorrer em um pluralismo exagerado com relação à utilização de marcadores, o que dificultaria a comparação e síntese dos conhecimentos agregados.

#### **1.5 - Validação de testes moleculares para a identificação de insetos de importância forense**

Wells & Williams (2007) argumentam em seu artigo, no qual validam um teste de bases filogenéticas para a identificação de espécies da subfamília Chrysomyinae (Diptera: Calliphoridae), que devem ser respeitadas duas condições para utilizar-se uma dada seqüência

gênica com fins diagnósticos: (1) acúmulo suficiente de informações nos bancos de dados genéticos que sirvam como referência para a identificação da espécie; (2) e que o genótipo do grupo taxonômico de referência, por si, possibilite a identificação do espécime que se tem em mãos, quando comparados os genótipos.

Em um outro artigo, Wells *et al.* (2007) apontam que a identificação através de marcadores genéticos só é confiável para uma dada espécie se esta estiver dentro de um grupo com monofiletismo recíproco, ou seja, uma linhagem única cujo haplótipo é exclusivo dela. Neste estudo, produzem uma árvore filogenética baseada no gene COI para o gênero *Lucilia* (Diptera: Calliphoridae), corroborando parcialmente as conclusões fornecidas pela análise morfológica do *taxon*, mas apontando para a natureza parafilética de algumas espécies (*L. porphyrina* e *L. illustris*) e para a ausência de monofiletismo recíproco dentro do gênero, considerando a semelhança entre os haplótipos de *L. cuprina* e *L. sericata* (especificamente de Taiwan), ou a relação entre *L. cuprina* e *Hemipyrellia ligurriens*, o que invalida a possibilidade de que moscas do gênero *Lucilia* sejam identificadas geneticamente com confiança.

Um método só pode ser validado para a identificação de espécies em regiões geográficas restritas. Esta é a conclusão observada em outro estudo de Wells *et al.* (2004). Neste, *Chrysomya putoria* e *C. chloropyga*, duas espécies simpátricas da África, cujas semelhanças morfológicas são suficientemente grandes para gerarem equívocos taxonômicos, forneceram dados que não permitiram a validação de um teste de identificação genética: a partir de 24 indivíduos genotipados foram encontrados cinco haplótipos diferentes. Apenas dois haplótipos ocorriam em *C. putoria*, mas também eram observados em espécimes de *C. chloropyga*, para a qual havia um haplótipo exclusivo. Essa intersecção de haplótipos revelou falta de monofiletismo recíproco para cada uma - provavelmente decorrente de um processo de derivação recente a partir do ancestral comum. Porém, a espécie *C. putoria* é a única entre as duas que invadiu o continente americano, onde tal teste de identificação pode ser validado se esta se mantiver como uma linhagem de haplótipo exclusivo.

## 1.6 - Os polêmicos *barcodes* de DNA

Em 2003, Hebert *et al.* propuseram um sistema de bioidentificação global para animais, sugerindo um segmento de apenas aproximadamente 658 pb (pares de bases), correspondente à subunidade I da citocromo oxidase do DNAm (COI), como marcador

padrão para este objetivo. Assim, surgiu o conceito do “DNA barcoding” (“código de barras de DNA”), cujos proponentes visavam criar um banco de dados genéticos universal para todos os animais, com a contribuição e união de esforços científicos, através da globalização de informações sobre organismos importantes do ponto de vista médico, econômico ou ambiental. Além disso, o acúmulo de registros nos bancos de dados permitiria verificar a existência de “possíveis novas espécies”.

Esta abordagem mostrou-se, *a priori*, interessante para a identificação de espécies cuja morfologia pode, em ao menos uma etapa do ciclo de vida, gerar interpretações erradas, uma situação comum entre os dípteros de importância médico-veterinária e forense das famílias Calliphoridae e Sarcophagidae. Nelson *et al.* (2007) utilizaram *barcodes* de DNA para a identificação de califorídeos do gênero *Chrysomya* da costa leste australiana, chegando a construir uma filogenia que utiliza como grupos externos *Calliphora ochracea*, *Hemipyrellia fergusonii* e *Lucilia porphyryna*. O marcador é o típico segmento de 658pb do gene COI descrito acima. Para a diferenciação entre espécies irmãs, que apresentam baixa divergência interespecífica sob a luz deste marcador, foi proposta a utilização de outro como auxiliar, o espaçador interno transcrito 2 (ITS2). Os autores concluem que a técnica é eficiente para a identificação de espécies do gênero em questão, considerando ainda que permite observar monofiletismo recíproco para cada espécie, mas deixam clara a relevância de se usar um marcador alternativo (ITS2), quando o principal (COI), deixa dúvidas quanto à identificação e posição filogenética de uma espécie devido à alta similaridade de sua sequência nucleotídica com a de outra (provavelmente em decorrência de divergências recentes). A filogenia reconstruída pela análise de seqüências destes marcadores foi concordante com os dados baseados em outros genes mitocondriais (ND4, ND4L, COI e COII) relatados anteriormente por Wallman *et al.* (2005) para estes insetos.

Em outro artigo defensor da utilização de *barcodes* de DNA Hebert *et al.* (2004) falam sobre a existência de um complexo com dez espécies crípticas descritas como *Astrartes fulgerator* da região neotropical. Brower (2005) reavalia essa conclusão, inferindo que, na verdade, há de três a sete espécies envolvidas no complexo. Ainda, dá exemplos de que a metodologia empregada em 2004 para a reconstrução da filogenia do grupo carece de fundamentação técnica e teórica. E opina que o uso exclusivo deste marcador na sistemática consiste em uma visão reducionista e imprecisa acerca da complexidade envolvida na análise e decifração de informações obtidas através de seqüências nucleotídicas, a qual põe em risco a

estrutura científica da História Natural por desvalorizar o trabalho de especialistas em taxonomia.

Roe & Sperling (2007) analisaram padrões de divergência dos genes COI e COII para Diptera e Lepidoptera, encontrando maiores diferenças nas análises intraespecíficas do que nas interespecíficas. Neste artigo, concluem não terem encontrado nos limites destes genes qualquer região única com 600 pb (pares de bases) que pudesse ser considerada idealmente informativa.

## 2 – OBJETIVOS GERAIS

1. Listar e registrar a distribuição geográfica de espécies de dípteros da subfamília Sarcophaginae (Diptera: Sarcophagidae) do território brasileiro para inventariar a variedade de espécies por Estado da federação, visando a criação de um catálogo de referência que auxilie na identificação de espécies;

2. Analisar a variabilidade genética da espécie *Peckia (Pattonella) intermutans* (Diptera: Sarcophagidae), a partir de sequências nucleotídicas parciais do gene mitocondrial Citocromo oxidase I (COI), de populações provenientes de regiões topograficamente distintas do Estado de São Paulo e da cidade de Salvador, BA;

3. Validar uma metodologia para análise molecular de insetos da família Sarcophagidae provenientes da região Neotropical, visando uma identificação mais acurada das espécies. Principalmente, quando os exemplares disponíveis forem imaturos ou fêmeas, cujo alto grau de semelhança morfológica interespecífica dificulta extremamente o trabalho dos taxonomistas;

4. Iniciar a criação de um banco de dados a partir dos resultados obtidos, caracterizando as espécies necrófagas de importância forense do Estado de São Paulo, que poderá ser utilizado como parâmetro nas investigações criminais, visando avaliar aspectos como movimento e deslocamento de corpos ou objetos utilizados em eventos criminais e associação de suspeitos com a cena do crime.

### **3 – LISTA E DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DE ESPÉCIES DE DíPTEROS DA SUBFAMÍLIA SARCOPHAGINAE (DIPTERA) NO TERRITÓRIO BRASILEIRO DE 1938 A 2008**

#### **LIST AND GEOGRAPHIC DISTRIBUTION OF DIPTERAN SPECIES OF THE BRAZILIANS SARCOPHAGINAE (DIPTERA: SARCOPHAGIDAE) FROM 1938 TO 2008**

RESUMO. Neste trabalho, 194 espécies pertencentes à subfamília Sarcophaginae (Diptera), incluídas em 30 gêneros, são listadas levando em conta suas respectivas distribuições geográficas registradas no território brasileiro. Dos 20 estados da federação brasileira considerados, pode-se dizer que somente os localizados na região Sudeste (com exceção do Espírito Santo) têm um número de estudos que possibilita uma boa análise da variedade de Sarcophaginae. Os gêneros com maior diversidade de espécies foram *Oxysarcodexia* (24,7%), *Lepidodexia* (10,9%), *Peckia* (10,3%) e *Dexosarcophaga* (8%). *Oxysarcodexia amorosa*, *O. thornax*, *Peckia (Euboettcheria) collusor*, *Peckia (Pattonella) intermutans* e *Sarcodexia lambens* estão notavelmente distribuídas pelo país, ocupando a maioria dos estados. Apenas quatro espécies foram registradas no arquipélago de Fernando de Noronha, incluindo *Nephochaetopteryx calida*, que não apresenta até o momento registro de ocorrência para as localidades continentais. A lista foi organizada a partir da análise de artigos publicados de 1938 a 2008 e inclui muitas espécies de importância médica, veterinária e/ou forense.

Palavras-chave: biodiversidade, sarcófagídeos, levantamento populacional, Brasil.

#### **3.1 - Introdução**

Na classe Insecta, a ordem Diptera é uma das mais diversificadas e bem catalogadas, incluindo cerca de 150.000 espécies descritas (10 a 15% de todos os animais conhecidos), as quais estão organizadas em aproximadamente 10.000 gêneros e 150 famílias (Yeates *et al.*, 2007). Entre estas figuram os Sarcophagidae, com cerca de 2.510 espécies catalogadas por todo o mundo, a maioria concentrada em regiões continentais de clima quente (Pape, 1996).

Das três subfamílias de sarcófagídeos, os Miltogramminae são majoritariamente cleptoparasitas de himenópteros (Spofford & Kurczewski, 1990), embora haja espécies predadoras de ovos de répteis (Lopes 1982b; Trauth & Mullen, 1990). Entre os

Paramacronychiinae encontram-se indivíduos parasitóides de insetos e outros invertebrados (Ferrari, 1987) e causadores de miíases em mamíferos (Sherman *et al.* 2000).

Sarcophaginae possui o maior número de espécies e a maioria é Neotropical, diferentemente das outras duas subfamílias, um dos fatores que corrobora a hipótese de terem se originado no Novo Mundo (Pape, 1996). Ocupam uma grande variedade de nichos, variando entre comensais de plantas insetívoras (Dahlem & Naczi, 2006), coprófagos (Mendes & Linhares, 2002; d'Almeida & Mello, 1996), predadores ou parasitas de moluscos (Barker, 2004), parasitóides de insetos (Ferrari, 1987; Pape, 1994), causadores de miíases em anfíbios (Eizemberg *et al.*, 2007), répteis (Dodge, 1955) e mamíferos, incluindo o homem (Guimarães & Papavero, 1999).

Algumas espécies desta subfamília podem ser bioindicadores de poluição ambiental com metais pesados, observando-se sua relação trófica com anelídeos e moluscos (Pavel & Polvony, 1994). Os saprófagos são úteis na terapia larval (Sherman *et al.* 2000) e, por se alimentarem de tecidos mortos de invertebrados ou vertebrados em decomposição, possuem reconhecida importância dentro das ciências forenses (Catts & Goff, 1992). Após a correta identificação das espécies associadas a um cadáver, por exemplo, sobre os quais depositam larvas de primeiro estágio que iniciam prontamente sua alimentação, dados referentes ao ciclo de vida e distribuição geográfica podem oferecer pistas a respeito das circunstâncias da morte (Benecke, 1998).

Encontram-se catalogados na literatura científica, muitos artigos descritivos da fauna de sarcófagídeos de localidades específicas do Brasil, mas grande parte deles é de difícil acesso, pois seus exemplares estão distribuídos em poucas bibliotecas do país, tornando o trabalho de revisão bibliográfica demorado e exaustivo. Este artigo busca inventariar as espécies de Sarcophaginae (Diptera: Sarcophagidae) encontradas no território brasileiro, citando suas respectivas distribuições geográficas por estado da federação, e visa criar um catálogo de referência que auxilie na identificação de espécies, principalmente as de importância médica, veterinária e/ou forense.

### **3.2 - Material e Métodos**

Foram analisados artigos científicos publicados entre 1938 e 2008, nos quais constavam informações a respeito da diversidade e distribuição geográfica de espécies de Sarcophaginae no Brasil. A compilação destes dados permitiu a confecção de uma tabela

indicadora de registro de ocorrência de cada espécie por estado brasileiro. O Distrito Federal (DF) também será tratado aqui como um estado. Os dados referentes ao arquipélago de Fernando de Noronha foram atribuídos ao estado de Pernambuco (PE), ao qual pertence esta localidade.

A variedade de espécies dentro de cada gênero, estado e região geográfica foi analisada por meio de gráficos em termos percentuais relacionados ao total de espécies listadas para o país.

Adiante, os dados que se encontram descritos e organizados em forma de lista, por estado da federação e região geográfica, foram compilados da literatura seguindo este critério de consulta para:

**São Paulo (SP):** Carvalho (1996); Carvalho *et al.* (2000); Carvalho *et al.* (2004); Guimarães (2004); Linhares (1979 e 1981); Lopes (1938b, 1950, 1954 e 1973b); Lopes & Downs (1949); Lopes & Leite (1991); Lopes & Tibana (1987 e 1988); Mendes (1991); Mendes & Linhares (1993); Monteiro-Filho & Penereiro (1987); Moretti (2006); Pape (1996); Ribeiro (2003); Souza (1993); Souza & Linhares (1997); Tavares (2003) e Thyssen (2000).

**Rio de Janeiro (RJ):** d'Almeida (1989); Leandro & d'Almeida (2005); Lopes (1938b, 1945a, 1950, 1954, 1971, 1973a, 1973b e 1988); Lopes & Leite (1991); Lopes & Tibana (1987 e 1988); Oliveira *et al.* (2002) e Pape (1996).

**Espírito Santo (ES):** Guimarães (2004); Lopes & Leite (1991); Lopes & Tibana (1987) e Pape (1996).

**Minas Gerais (MG):** Dias *et al.* (1984); Guimarães (2004); Lopes (1945a, 1954 e 1973b); Lopes & Downs (1949); Lopes & Leite (1991); Lopes & Tibana (1987 e 1988); Marchiori, C.H. (1997); Marchiori & Linhares (1999a e 1999b); Pape (1996) e Rosa (2007).

**Rio Grande do Sul (RS):** Guimarães (2004); Lopes (1973b); Lopes & Leite (1991); Lopes & Tibana (1987); Pape (1996) e Souza *et al.* (2008).

**Santa Catarina (SC):** Guimarães (2004); Lopes (1938b, 1945a e 1973b); Lopes & Downs (1949); Lopes & Leite (1991); Lopes & Tibana (1987 e 1988) e Pape (1996).

**Paraná (PR):** Guimarães (2004); Lopes (1973b); Lopes & Leite (1991); Lopes & Tibana (1987 e 1988); Moura *et al.* (1997) e Pape (1996).

**Mato Grosso (MT):** Guimarães (2004); Lopes (1938a, 1954 e 1973b); Lopes & Leite (1991); Lopes & Tibana (1982 e 1987) e Pape (1996).

**Goiás (GO):** Guimarães (2004); Lopes (1938b, 1954, 1971 e 1973b); Lopes & Leite (1991); Lopes & Tibana (1987); Marchiori (1997); Marchiori *et al.* (2003a e 2003b) e Pape (1996).

**Brasília (DF):** Barros *et al.* (2008); Lopes & Ferraz (1991) e Lopes & Tibana (1987).

**Amazonas (AM):** Carvalho-Filho & Espósito (2006); Lopes (1938b, 1954 e 1973b) e Lopes & Tibana (1987).

**Amapá (AP):** Couri *et al* (2000) e Pape (1996).

**Roraima (RR):** Lopes & Leite (1991); Lopes & Tibana (1991) e Mello (1989).

**Pará (PA):** Lopes (1938b, 1945a e 1954); Lopes & Tibana (1987) e Pape (1996).

**Bahia (BA):** Lopes (1988); Lopes & Leite (1991); Lopes & Tibana (1987) e Pape (1996).

**Pernambuco (PE):** Cruz (2008); Lopes & Tibana (1987) e Pape (1996). Os dados do arquipélago de Fernando de Noronha foram extraídos de Alvarenga (1962) e Couri *et al.* (2008).

**Rio Grande do Norte (RN):** Lopes & Downs (1949).

**Ceará (CE):** Guimarães (2004); Lopes (1954 e 1974); Lopes & Downs (1949) e Lopes & Tibana (1987).

**Maranhão (MA):** Guimarães (2004); Lopes (1954) e Lopes & Tibana (1987).

**Paraíba (PB):** Lopes & Tibana (1987).

A nomenclatura utilizada para referir-se às espécies seguiu os critérios adotados e atualizados em catálogo produzido por Pape (2006).

### 3.3 - Resultados e Discussão

Foram observadas 194 espécies de Sarcophaginae distribuídas em 20 estados do território brasileiro. Entre os artigos analisados, a maioria daqueles que abordavam a diversidade de dípteros necrófagos em geral, apontaram para uma maior riqueza e menor abundância de sarcófagídeos comparados à outra família de grande importância forense, os Calliphoridae (Cruz, 2008; Couri *et al.*, 2008; Leandro & d'Almeida, 2005; Linhares, 1979 e 1981; Mendes, 1991; Moretti, 2006; Oliveira *et al.*, 2002; Souza, 1993). Esta grande riqueza é corroborada pelos dados da lista que segue abaixo (Tabela 3.1) constante da distribuição geográfica das espécies por estado da federação.

Segundo Lopes (1945b), o Brasil é o país mais diversificado em espécies de *Oxysarcodexia*, sendo as zonas que abrigam florestas tropicais seus centros de biodiversidade (Lopes, 1988). Concordantemente encontra-se neste gênero o maior número de espécies (24,7% do total), seguido por *Lepidodexia* (10,9%), *Peckia* (10,3%) e *Dexosarcophaga* (8,0%). Cada um dos demais gêneros foi representado por menos de 5,5% das espécies consideradas (Fig. 3.1).

**Tabela 3.1.** Lista de ocorrência e distribuição geográfica de espécies de dípteros da Subfamília Sarcophaginae (Diptera: Sarcophagidae) no território brasileiro de 1938 a 2008. Localidades: São Paulo<sup>1</sup>, Rio de Janeiro<sup>2</sup>, Espírito Santo<sup>3</sup>, Minas Gerais<sup>4</sup>, Rio Grande do Sul<sup>5</sup>, Santa Catarina<sup>6</sup>, Paraná<sup>7</sup>, Mato Grosso<sup>8</sup>, Goiás<sup>9</sup>, Distrito Federal<sup>10</sup>, Amazonas<sup>11</sup>, Amapá<sup>12</sup>, Roraima<sup>13</sup>, Pará<sup>14</sup>, Bahia<sup>15</sup>, Pernambuco<sup>16</sup>, Fernando de Noronha<sup>17</sup>, Rio Grande do Norte<sup>18</sup>, Ceará<sup>19</sup>, Maranhão<sup>20</sup> e Paraíba<sup>21</sup>.

gêneros / espécies	Distribuição por Estados da federação e por regiões geopolíticas																				
	Sudeste	Sul	Centro-oeste	Norte	Nordeste																
	<sup>1</sup> SP <sup>2</sup> RJ <sup>3</sup> ES <sup>4</sup> MG <sup>5</sup> RS <sup>6</sup> SC <sup>7</sup> PR <sup>8</sup> MT <sup>9</sup> GO <sup>10</sup> DF <sup>11</sup> AM <sup>12</sup> AP <sup>13</sup> RR <sup>14</sup> PA <sup>15</sup> BA <sup>16,17</sup> PE <sup>18</sup> RN <sup>19</sup> CE <sup>20</sup> MA <sup>21</sup> PB																				
<i>Archimimus propinquus</i>	X																				
<i>Archimimus pseudobarbatus</i>	X																				
<i>Argoravinia alvarengai</i>				X																	
<i>Argoravinia rufiventris</i>		X	X		X																
<i>Blaesoxipha (Acanthodotheca) acridiophagoides</i>	X	X																			
<i>Blaesoxipha (Acanthodotheca) alcedo</i>		X	X																		
<i>Blaesoxipha (Acanthodotheca) exuberans</i>	X																				
<i>Blaesoxipha (Acanthodotheca) inornata</i>			X																		
<i>Blaesoxipha (Acanthodotheca) lanei</i>	X	X			X																
<i>Blaesoxipha (Acanthodotheca) rudis</i>					X																
<b><i>Blaesoxipha (Acridiophaga) sp.</i></b>		X																			
<i>Blaesoxipha (Gigantotheca) plinthopyga</i>					X																

	<sup>1</sup> SP	<sup>2</sup> RJ	<sup>3</sup> ES	<sup>4</sup> MG	<sup>5</sup> RS	<sup>6</sup> SC	<sup>7</sup> PR	<sup>8</sup> MT	<sup>9</sup> GO	<sup>10</sup> DF	<sup>11</sup> AM	<sup>12</sup> AP	<sup>13</sup> RR	<sup>14</sup> PA	<sup>15</sup> BA	<sup>16,17</sup> PE	<sup>18</sup> RN	<sup>19</sup> CE	<sup>20</sup> MA	<sup>21</sup> PB
<i>Boettcheria aurifera</i>	X					X														
<i>Boettcheria retroversa</i>		X																		
<i>Dexosarcophaga ampullula</i>										X										
<i>Dexosarcophaga aurifacies</i>																				X
<i>Dexosarcophaga bidentata</i>												X								
<i>Dexosarcophaga carvalhoi</i>	X			X						X										
<i>Dexosarcophaga globulosa</i>		X						X							X					X
<i>Dexosarcophaga hugoi</i>													X							
<i>Dexosarcophaga inaequalis</i>		X																		X
<i>Dexosarcophaga lenkoi</i>										X										
<i>Dexosarcophaga lopesi</i>													X							
<i>Dexosarcophaga paulistana</i>				X						X										
<i>Dexosarcophaga pusilla</i>																				X
<i>Dexosarcophaga rafaeli</i>													X							
<i>Dexosarcophaga succinta</i>																				X
<i>Dexosarcophaga transitia</i>				X									X							X
<i>Dexosarcophaga spp.</i>	X			X						X										
<i>Emblemasoma erro</i>		X																		
<i>Emblemasoma fumipenne</i>		X																		
<i>Emblemasoma lutzi</i>		X																		
<i>Emblemasoma macropodium</i>	X																			

	<sup>1</sup> SP	<sup>2</sup> RJ	<sup>3</sup> ES	<sup>4</sup> MG	<sup>5</sup> RS	<sup>6</sup> SC	<sup>7</sup> PR	<sup>8</sup> MT	<sup>9</sup> GO	<sup>10</sup> DF	<sup>11</sup> AM	<sup>12</sup> AP	<sup>13</sup> RR	<sup>14</sup> PA	<sup>15</sup> BA	<sup>16,17</sup> PE	<sup>18</sup> RN	<sup>19</sup> CE	<sup>20</sup> MA	<sup>21</sup> PB
<i>Emblemasoma neotropicum</i>									X											
<i>Emblemasoma prosternale</i>		X																		
<i>Emblemasoma zikani</i>		X																		
<i>Emdenimyia korytkowskyi</i>								X										X		
<i>Engelimyia inops</i>	X	X	X	X		X		X						X						
<i>Helicobia aurescens</i>	X			X						X										
<i>Helicobia chapadensis</i>								X					X							
<i>Helicobia iheringi</i>				X																
<i>Helicobia morionella</i>	X	X		X																
<i>Helicobia pilifera</i>	X			X																
<i>Helicobia pilipleura</i>	X	X																		
<i>Helicobia rapax</i>	X	X		X																
<i>Helicobia</i> sp.	X	X		X				X			X					X		X		
<i>Lepidodexia (Asiliodexia) elegans</i>								X												
<i>Lepidodexia (Dexomyiophora) facialis</i>																		X		
<i>Lepidodexia (Harpagopyga) pacta</i>													X	X						
<i>Lepidodexia (Notochaeta) spp.</i>													X							
<i>Lepidodexia (Notochaeta) carvalhoi</i>													X	X						
<i>Lepidodexia (Notochaeta) cognata</i>	X	X		X		X													X	
<i>Lepidodexia (Notochaeta) confusa</i>		X		X																
<i>Lepidodexia (Notochaeta) cyaneiventris</i>		X																		

	<sup>1</sup> SP	<sup>2</sup> RJ	<sup>3</sup> ES	<sup>4</sup> MG	<sup>5</sup> RS	<sup>6</sup> SC	<sup>7</sup> PR	<sup>8</sup> MT	<sup>9</sup> GO	<sup>10</sup> DF	<sup>11</sup> AM	<sup>12</sup> AP	<sup>13</sup> RR	<sup>14</sup> PA	<sup>15</sup> BA	<sup>16,17</sup> PE	<sup>18</sup> RN	<sup>19</sup> CE	<sup>20</sup> MA	<sup>21</sup> PB
<i>Lepidodexia (Notochaeta) diversa</i>	X																			
<i>Lepidodexia (Notochaeta) sinopi</i>								X												
<i>Lepidodexia (Notochaeta) fumipennis</i>	X					X														
<i>Lepidodexia (Notochaeta) fuscianalis</i>													X							
<i>Lepidodexia (Notochaetisca) malacophaga</i>	X																			
<i>Lepidodexia (Notochaetisca) oliverai</i>	X			X																
<i>Lepidodexia (Notochaeta) parva</i>													X							
<i>Lepidodexia (Notochaetisca) rosaliae</i>							X													
<i>Lepidodexia (Notochaetisca) santista</i>	X																			
<i>Lepidodexia (Notochaetisca) travassosi</i>						X														
<i>Lepidodexia (Orodexia) opima</i>	X	X		X							X			X	X			X		
<i>Microcerella erythropya</i>				X																
<i>Microcerella halli</i>	X	X		X	X															X
<i>Nephochaetopteryx augustifrons</i>																				X
<i>Nephochaetopteryx cálida</i>																X*				
<i>Nephochaetopteryx pacatubensis</i>																				X
<i>Nephochaetopteryx pallidifacies</i>																				X
<i>Nephochaetopteryx pallidiventris</i>	X										X			X	X			X		X
<i>Nephochaetopteryx</i> sp.				X				X					X							
<i>Oxysarcodexia admixta</i>	X	X		X		X		X	X	X										
<i>Oxysarcodexia adunca</i>	X	X																		
<i>Oxysarcodexia amorosa</i>	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

	<sup>1</sup> SP	<sup>2</sup> RJ	<sup>3</sup> ES	<sup>4</sup> MG	<sup>5</sup> RS	<sup>6</sup> SC	<sup>7</sup> PR	<sup>8</sup> MT	<sup>9</sup> GO	<sup>10</sup> DF	<sup>11</sup> AM	<sup>12</sup> AP	<sup>13</sup> RR	<sup>14</sup> PA	<sup>15</sup> BA	<sup>16,17</sup> PE	<sup>18</sup> RN	<sup>19</sup> CE	<sup>20</sup> MA	<sup>21</sup> PB
<i>Oxysarcodexia angrensis</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X						
<i>Oxysarcodexia augusta</i>	X	X	X	X	X								X							
<i>Oxysarcodexia aura</i>				X					X											
<i>Oxysarcodexia avuncula</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X		X		X		
<i>Oxysarcodexia bakeri</i>								X	X	X			X		X	X				
<i>Oxysarcodexia berlai</i>														X		X				X
<i>Oxysarcodeia bicolor</i>	X	X																		
<i>Oxysarcodexia carvalhoi</i>	X	X	X	X				X	X		X	X		X				X		
<i>Oxysarcodexia confusa</i>	X	X	X	X	X	X	X													
<i>Oxysarcodexia culminata</i>	X	X	X	X																
<i>Oxysarcodexia culminiforceps</i>	X	X	X	X	X	X	X													
<i>Oxysarcodexia tímida</i>		X																		
<i>Oxysarcodexia Diana</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			X					X		
<i>Oxysarcodexia eberii</i>				X						X										
<i>Oxysarcodexia floricola</i>						X														
<i>Oxysarcodexia fringidea</i>		X	X	X				X			X	X		X	X	X			X	
<i>Oxysarcodexia fluminensis</i>	X	X	X	X					X							X				
<i>Oxysarcodexia grandis</i>	X	X					X													
<i>Oxysarcodexia inflata</i>														X		X			X	
<i>Oxysarcodexia infuncta</i>	X	X			X	X	X													
<i>Oxysarcodexia intona</i>		X	X	X							X			X		X		X	X	X

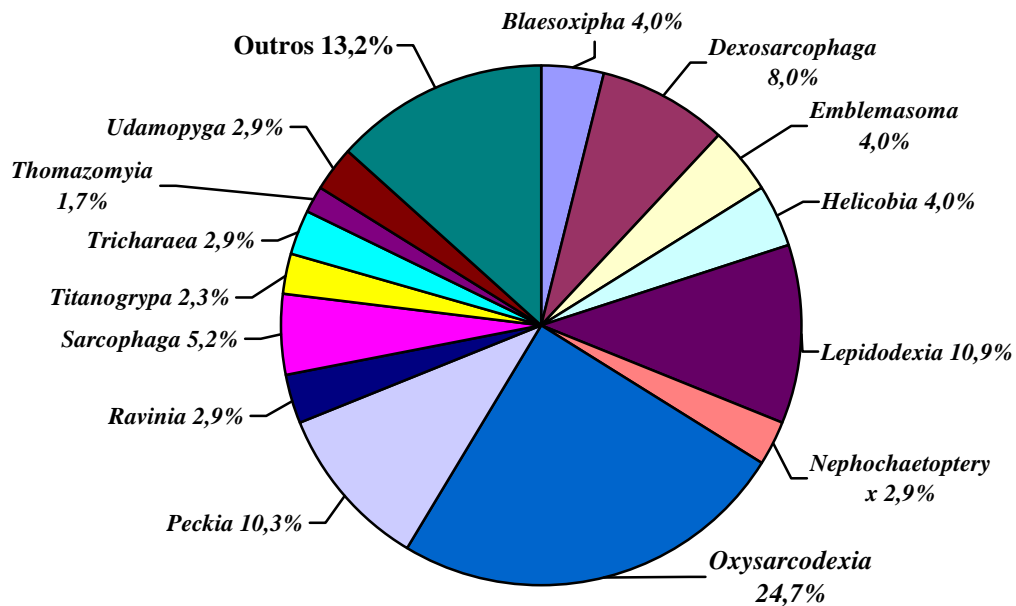
	<sup>1</sup> SP	<sup>2</sup> RJ	<sup>3</sup> ES	<sup>4</sup> MG	<sup>5</sup> RS	<sup>6</sup> SC	<sup>7</sup> PR	<sup>8</sup> MT	<sup>9</sup> GO	<sup>10</sup> DF	<sup>11</sup> AM	<sup>12</sup> AP	<sup>13</sup> RR	<sup>14</sup> PA	<sup>15</sup> BA	<sup>16,17</sup> PE	<sup>18</sup> RN	<sup>19</sup> CE	<sup>20</sup> MA	<sup>21</sup> PB	
<i>Oxysarcodexia meridionalis</i>	X			X					X												
<i>Oxysarcodexia major</i>		X						X				X	X								
<i>Oxysarcodexia modesta</i>	X	X	X	X												X					
<i>Oxysarcodexia morretesi</i>	X	X					X														
<i>Oxysarcodexia neivai</i>	X																				
<i>Oxysarcodexia occulta</i>		X											X					X			
<i>Oxysarcodexia parva</i>	X	X	X	X				X										X			
<i>Oxysarcodexia paulistanensis</i>	X	X	X	X	X	X	X			X											
<i>Oxysarcodexia peculiaris</i>		X	X																		
<i>Oxysarcodexia petropolitana</i>		X	X	X		X															
<i>Oxysarcodexia riograndensis</i>	X	X	X	X												X					
<i>Oxysarcodexia</i> sp.	X			X	X						X		X			X					
<i>Oxysarcodexia simplicoides</i>		X	X	X														X			
<i>Oxysarcodexia terminalis</i>	X	X	X	X				X	X												
<i>Oxysarcodexia tímida</i>		X												X				X	X		
<i>Oxysarcodexia thornax</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X*	X	X	X		X
<i>Oxysarcodexia varia</i>	X				X																
<i>Oxysarcodexia villosa</i>														X							
<i>Oxysarcodexia vittata</i>					X	X															
<i>Oxysarcodexia xanthosoma</i>	X	X	X	X				X			X		X	X	X			X			
<i>Oxyvinia excisa</i>	X																			X	

	<sup>1</sup> SP	<sup>2</sup> RJ	<sup>3</sup> ES	<sup>4</sup> MG	<sup>5</sup> RS	<sup>6</sup> SC	<sup>7</sup> PR	<sup>8</sup> MT	<sup>9</sup> GO	<sup>10</sup> DF	<sup>11</sup> AM	<sup>12</sup> AP	<sup>13</sup> RR	<sup>14</sup> PA	<sup>15</sup> BA	<sup>16,17</sup> PE	<sup>18</sup> RN	<sup>19</sup> CE	<sup>20</sup> MA	<sup>21</sup> PB
<i>Oxyvinia uraricoera</i>													X							
<i>Pacatuba matthewsi</i>																				X
<i>Peckia (Euboettcheria) alvengarai</i>								X					X							
<i>Peckia (Euboettcheria) anguilla</i>	X	X		X				X	X	X			X							X
<i>Peckia (Euboettcheria) australis</i>	X			X	X	X		X												
<i>Peckia (Euboettcheria) collusor</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X			X
<i>Peckia (Euboettcheria) epimelia</i>	X							X												
<i>Peckia (Euboettcheria) florencioi</i>	X			X	X	X		X												
<i>Peckia (Euboettcheria) roppai</i>								X												
<i>Peckia (Euboettcheria) subducta</i>								X												
<i>Peckia (Euboettcheria) sp.</i>	X			X			X				X		X			X				
<i>Peckia (Pattonella) intermutans</i>	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X		X	X	X	X	X			X
<i>Peckia (Pattonella) resona</i>	X				X		X													
<i>Peckia (Pattonella) smarti</i>											X	X		X						
<i>Peckia (Pattonella) pallidipilosa</i>											X									
<i>Peckia (Peckia) adolenda</i>			X	X																X
<i>Peckia (Peckia) chryostoma</i>	X	X	X	X	X				X	X	X	X	X			X	X			X
<i>Peckia (Peckia) pexata</i>	X			X	X				X	X		X								
<i>Peckia (Squamatodes) abnormis</i>	X	X	X	X	X			X						X						X
<i>Peckia (Squamatodes) ingens</i>	X	X	X	X	X			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			X
<i>Peckia (Squamatodes) trivittata</i>	X			X					X	X	X					X				X
<i>Peckiamyia abnormalis</i>		X																		

	<sup>1</sup> SP	<sup>2</sup> RJ	<sup>3</sup> ES	<sup>4</sup> MG	<sup>5</sup> RS	<sup>6</sup> SC	<sup>7</sup> PR	<sup>8</sup> MT	<sup>9</sup> GO	<sup>10</sup> DF	<sup>11</sup> AM	<sup>12</sup> AP	<sup>13</sup> RR	<sup>14</sup> PA	<sup>15</sup> BA	<sup>16,17</sup> PE	<sup>18</sup> RN	<sup>19</sup> CE	<sup>20</sup> MA	<sup>21</sup> PB
<i>Peckiamyia expuncta</i>	X							X												
<i>Ravinia advena</i>	X	X	X	X	X	X	X	X							X					
<i>Ravinia almeidai</i>	X		X	X			X	X												X
<i>Ravinia aureopyga</i>					X															
<i>Ravinia belforti</i>	X	X		X			X	X	X	X			X	X						X
<i>Ravinia effrenata</i>													X							
<i>Retrotomyia retrocita</i>	X																			
<i>Rettenmeyerina serrata</i>																				X
<i>Sarcodexia lambens</i>	X	X		X	X	X		X	X	X	X	X	X	X		X				X
<i>Sarcodexia</i> sp.	X																			
<i>Sarcophahrtiopsis cuneata</i>	X	X														X				X
<i>Sarcophaga (Bercaea) áfrica</i>	X	X		X																
<i>Sarcophaga (Liopygia) crassipalpis</i>					X															
<i>Sarcophaga (Liopygia) ruficornis</i>	X	X		X																
<i>Sarcophaga (Lipoptilocnema) crispina</i>	X	X																		X
<i>Sarcophaga (Lipoptilocnema) crispula</i>	X	X		X																X
<i>Sarcophaga (Lipoptilocnema) koehleri</i>					X															
<i>Sarcophaga (Lipoptilocnema) misella</i>								X												
<i>Sarcophaga (Lipoptilocnema) sp.</i>		X		X					X											
<i>Sarcophaga (Mehria) sp.</i>				X																
<i>Sarcophaga (Neobellieria) polistensis</i>	X	X				X		X												
<i>Sarcophaga (Parasarcophaga) sp.</i>	X																			

	<sup>1</sup> SP	<sup>2</sup> RJ	<sup>3</sup> ES	<sup>4</sup> MG	<sup>5</sup> RS	<sup>6</sup> SC	<sup>7</sup> PR	<sup>8</sup> MT	<sup>9</sup> GO	<sup>10</sup> DF	<sup>11</sup> AM	<sup>12</sup> AP	<sup>13</sup> RR	<sup>14</sup> PA	<sup>15</sup> BA	<sup>16,17</sup> PE	<sup>18</sup> RN	<sup>19</sup> CE	<sup>20</sup> MA	<sup>21</sup> PB
<i>Sarcophaga (Sarcophaga) carnaria</i>											X									
<i>Sinopiella rotunda</i>										X										
<i>Sinopiella rufopilosa</i>								X												
<i>Titanogrypa minensis</i>				X																
<i>Titanogrypa (Sarconeiva) fimbriata</i>	X	X		X																
<i>Titanogrypa (Sarconeiva) iheringi</i>																X				X
<i>Titanogrypa (Cuculomyia) larvicida</i>	X			X						X										
<i>Thomazomyia fluminensis</i>			X																	
<i>Thomazomyia kempfi</i>															X					
<i>Thomazomyia paralis</i>	X																			
<i>Tricharaea (Sarcophagula) canuta</i>	X	X		X																
<i>Tricharaea (Sarcophagula) indonata</i>								X												
<i>Tricharaea (Sarcophagula) macrophthalma</i>																				
<i>Tricharaea (Sarcophagula) occidua</i>	X	X		X				X	X	X	X	X	X	X					X	X
<i>Tricharaea (Sarcophagula) ramirezi</i>				X																
<i>Tricharaea (Sarcophagula) sp.</i>	X	X		X									X							X
<i>Tripanurga albicans</i>	X	X		X			X	X	X					X						
<i>Udamopyga diversa</i>									X											
<i>Udamopyga malacophila</i>									X											
<i>Udamopyga neivai</i>									X											X
<i>Udamopyga percita</i>	X	X																		
<i>Udamopyga setigena</i>					X															
<i>Udamopyga sp.</i>	X																			
<i>Villegasia almeidai</i>		X												X						

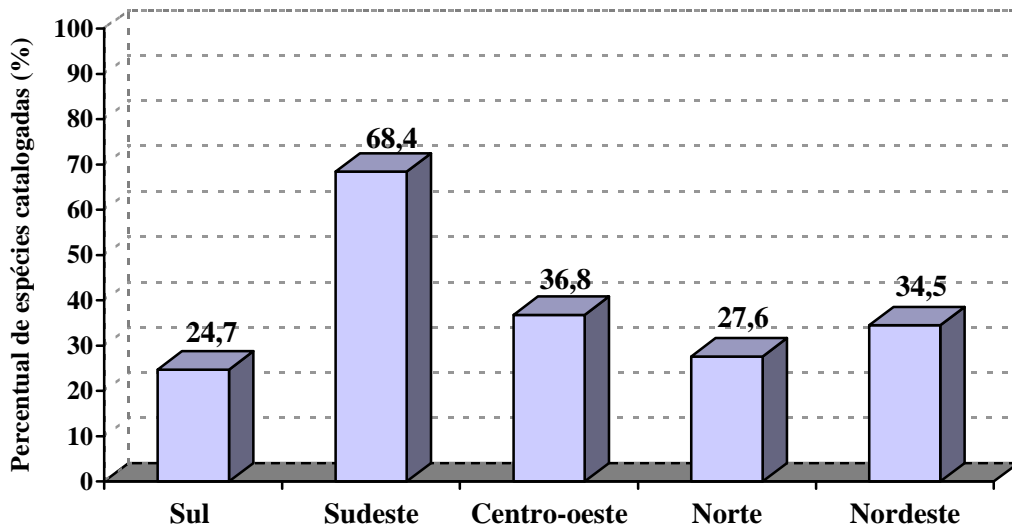
**Fig. 3.1.** Percentual de espécies de Sarcophaginae, levando em conta o gênero, catalogadas em todo o Brasil de 1938-2008.



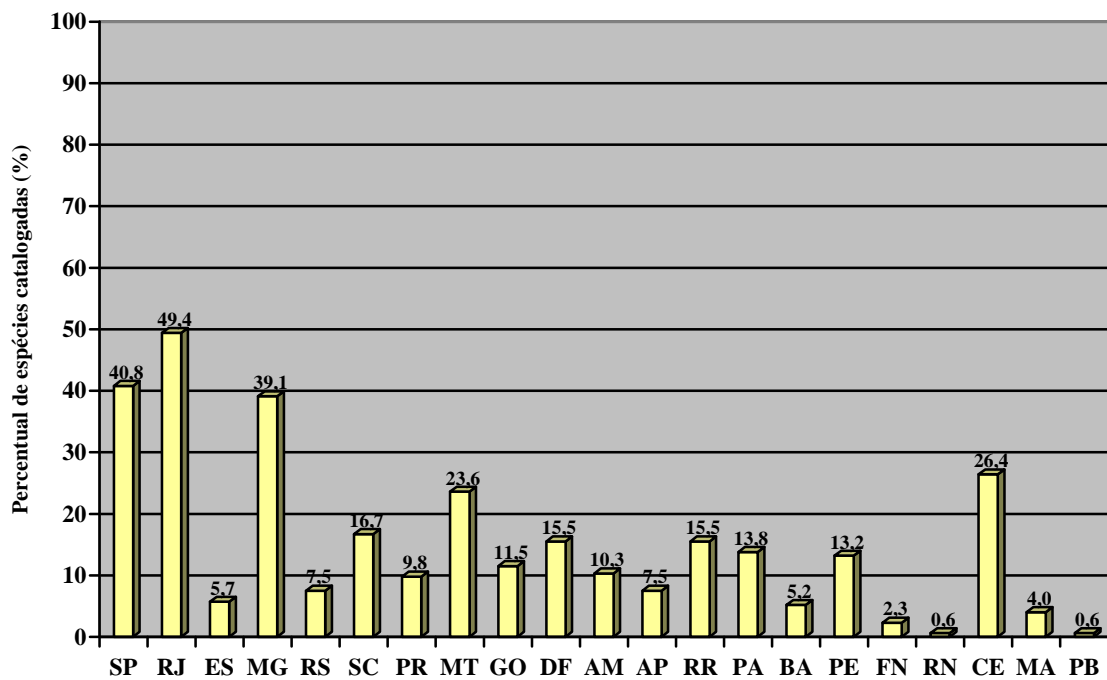
Algumas espécies foram encontradas em todas as regiões do país. Entre estas, a de distribuição geográfica mais ampla foi *O. thornax*, ocorrendo em 17 estados, sendo também notáveis sob este parâmetro *O. amorosa* (12 estados), *Peckia (Euboettcheria) collusor* (13 estados), *P. (Pattonella) intermutans* (13 estados), *Sarcodexia lambens* (12 estados) e *Ravinia belforti* (10 estados). Outras ocorreram em todas as regiões, exceto no Sul (*Dexosarcophaga globulosa*, *O. carvalhoi*, *O. fringidea*, *O. xanthossoma*, *Peckia (E.) anguilla*, *P. (Peckia) chrysostoma*, *P. (Squamatodes) abnormalis*, *P. (S.) ingens*, *P. (S.) trivittata* e *Tricharaea (Sarcophagula) occidua*), no Nordeste (*Engelimyia inops*, *O. angrensis*, e *Tripanurga albicans*) ou no Norte (*O. avuncula*, *R. almeidai* e *Udamopyga neivai*).

A exclusão de tal número de espécies da região Sul do país em relação às demais não causa surpresa se consideradas suas condições climáticas. No entanto, é interessante destacarmos que foram encontradas nesta, a de menor variedade de espécies (Fig. 3.2), oito Sarcophaginae não registrados nas demais regiões, incluindo a Sudeste, geograficamente adjacente e melhor estudada quanto à fauna dos dípteros em questão (Fig. 3.3): *Lepidodexia (Notochaetisca) rosalie*, *L. (N.) travassosi*, *O. floricola*, *O. villata*, *R. aureopyga*, *Sarcophaga (Liopygia) crassipalpis*, *Sarcophaga (Lipoptilocnema) koehleri* e *Udamopyga setigena*.

**Fig. 3.2.** Percentual de espécies de Sarcophaginae catalogadas para cada região geopolítica do território brasileiro de 1938-2008.



**Fig. 3.3.** Percentual de espécies de Sarcophaginae catalogadas para cada estado da federação, incluindo o arquipélago de Fernando de Noronha (FN), pertencente ao estado de Paenambuco (PE).



O valor observado na Figura 3.2 para a região Sudeste resulta das grandes quantidades de espécies em relação ao total listado encontradas no Rio de Janeiro (49,4%), em São Paulo (40,8%) e em Minas Gerais (39,1%), muito superiores às dos demais estados (Fig. 3.3). Ainda sob este aspecto, destaca-se no Centro Oeste o Mato Grosso (23,6%). Apesar do clima tropical quente e úmido, os estados do Norte exibem uma variedade de espécies aparentemente baixa, certamente, em função da falta de estudos nesta região. O mesmo se conclui a respeito do Nordeste, onde apenas o Ceará apresenta uma boa contagem de espécies (26,4%), principalmente, em função dos trabalhos de Lopes e seus colaboradores.

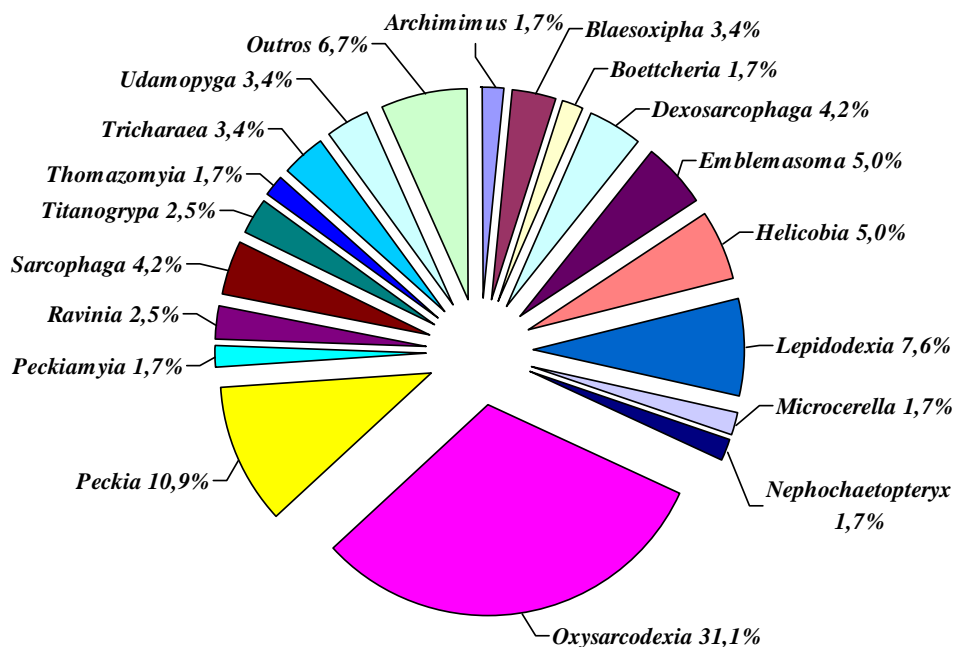
Alvarenga (1962) descreveu *Nephocaetopteryx calida*, espécie não encontrada em terras continentais do Brasil, como único sarcófagídeo presente no arquipélago de Fernando de Noronha (03°51'00''S e 32°25'00''O), pertencente ao estado de Pernambuco, porém, mais próximo da costa de Natal (RN), a 360 Km. Couri *et al.* (2008) analisaram dípteros coletados nesta localidade em 1973 e não encontraram a espécie citada acima e sim *O. thornax* (mais de 90% dos espécimes coletados), *P. (P.) chrysostoma* e *T. (S.) occidua*.

*Lepidodexia (Notochaeta) dimidiata* é citada por Lopes (1945a) e Pape (1996) como constituinte da fauna brasileira. No entanto, nenhum dos autores especifica a localidade onde seus exemplares teriam sido encontrados.

Na lista, observam-se muitas espécies encontradas em apenas uma das regiões geográficas ou um dos estados do país. Contudo, inferências sobre endemismo são arriscadas, pois os dados do Sudeste são referenciados por um número de artigos bem maior em relação às outras regiões (com exceção àqueles relativos ao estado do Espírito Santo), representando a maior variedade de Sarcophaginae descrita em nosso território. Nas outras áreas brasileiras estudos acerca da fauna de sarcófagídeos ainda são muito incipientes, chegando à inexistência de quaisquer informações sobre sua diversidade para alguns estados (Sergipe, Alagoas, Piauí, Tocantins, Mato Grosso do Sul, Rondônia e Acre).

Ao comparar a análise da variedade de espécies por gênero no Brasil (Fig. 3.1) com aquela realizada isoladamente para a região Sudeste (Fig. 3.4) percebe-se que *Oxysarcodexia* se mantém à frente, chegando a subir alguns pontos percentuais (de 24,7% para 31,1%). Porém, este gênero é seguido agora por *Peckia* (10,9%), *Lepidodexia* (7,6%) e *Helicobia* junto com *Emblemasoma* (5,0% cada). Os outros gêneros não atingiram a diversidade de espécies destes últimos.

**Fig. 3.4.** Percentual de espécies de Sarcophaginae, levando em conta o gênero, catalogadas no Sudeste do Brasil de 1938-2008.



Deve ser salientado que as variações não se limitam ao nível interespecífico. Lopes (1974) relatou diferenças morfológicas entre populações de *Udamopyga neivai* do Rio de Janeiro (RJ) e de Pacatuba (CE), distantes cerca de 3500 Km, apontando para um possível início de especiação. Na lista, podem ser observadas muitas outras espécies cujas populações estão sob condições semelhantes de possível isolamento geográfico. Mendes & Linhares (1993) relatam mudanças na estrutura comunitária de sarcófagídeos da zona urbana de Campinas (SP), comparando seus dados aos obtidos na década anterior por Linhares (1981). Também há discrepâncias entre dados de sinantropia e hábito alimentar para diferentes populações da mesma espécie (Couri *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2002; Leão *et al.*, 1995; d’Almeida *et al.*, 1991; d’Almeida, 1984; Linhares, 1981; Ferreira, 1979), sugerindo que esta seja potencialmente mais relevante no âmbito médico-veterinário em uma determinada localidade do que em outra e tenha grande potencial adaptativo.

A lista de Sarcophaginae obtida (Tabela 1), a qual ainda pode ser ampliada, nos faz crer que o Brasil, consensualmente reconhecido como o país de maior biodiversidade no mundo, também deva sustentar este *status* especificamente em relação aos Sarcophagidae. Por exemplo, considerando-se toda a família, Pakalniskis *et al.* (2000) relataram apenas 28

espécies para a Lituânia, Hayat *et al.* (2008) constataram 86 espécies na Turquia e McAlpine *et al.* (1989) citam, aproximadamente, 300 espécies para a região Palearctica e 250 para a Nearctica, inferindo ainda que os componentes da tribo Sarcophagini desta última teriam origem na fauna neotropical. As espécies aqui listadas, apenas dentro de uma subfamília, representam cerca de 25% dos sarcófagídeos neotropicais, de acordo com valores estimados por Pape (1996). Contudo, é notória a demanda de estudos mais detalhados, principalmente, no estado do Espírito Santo e nos outros fora da região Sudeste. O conhecimento de dados relacionados à diversidade, biogeografia, bionomia e biologia destes insetos assume grande importância, visto que os mesmos podem provocar danos à atividade pecuária e à saúde pública (Guimarães & Papavero, 1999) ou gerar informações úteis às ciências forenses (Catts & Goff, 1992).

A grande magnitude da biodiversidade intraespecífica e interespecífica em Sarcophaginae permite percebermos o quão distantes estamos de um conhecimento consistente a respeito dos caracteres ecológicos e biológicos de suas espécies. No Brasil, contamos com o apoio de numerosos cientistas no levantamento destes dados e, em especial, com a notável contribuição deixada pelo Prof. Dr. Hugo de Souza Lopes, reconhecidamente, o maior especialista neste grupo de todos os tempos, tendo descrito aproximadamente 15% das espécies de sarcófagídeos conhecidas (Verves, 1989). Contudo, a busca da compreensão de tamanha biodiversidade exige esforços continuados e integrados por parte da comunidade científica mundial ligada à Dipterologia. Neste artigo buscamos oferecer uma pequena contribuição nesse sentido.

#### **4 – O USO DE SEQUÊNCIA DO GENE COI (DNAMT) PARA ANÁLISE DA VARIABILIDADE DE POPULAÇÕES DA ESPÉCIE *PECKIA (PATTONELLA) INTERMUTANS (DIPTERA: SARCOPHAGIDAE)* DOS ESTADOS DE SÃO PAULO E BAHIA, BRASIL**

##### **THE USE OF COI MTDNA SEQUENCE TO ANALYSIS THE VARIABILITY OF *PECKIA (PATTONELLA) INTERMUTANS (DIPTERA: SARCOPHAGIDAE)* FROM SÃO PAULO AND BAHIA STATES POPULATION, BRAZIL.**

RESUMO. Foram obtidas seqüências nucleotídicas de 427 pb (pares de base) do gene mitocondrial (mtDNA) citocromo oxidase I (COI) de 34 indivíduos de *P. (P.) intermutans* (Walker) (Diptera: Sarcophagidae) coletados nos estados de São Paulo (Campinas, Mogi-Guaçu, Jundiaí e Ubatuba) e Bahia (Salvador), sendo estas alinhadas pelo ClustaX e submetidas à verificação dos índices de variabilidade genética (D, Fst, Gst). As mesmas seqüências foram encaminhadas também às análises filogenética (NJ e MP) pelo MEGA4. Os indivíduos de Ubatuba apresentaram maior divergência em relação aos das outras populações paulistas do que aqueles obtidos em Salvador, um resultado que foi corroborado por todas as formas de análise, sugerindo fluxo gênico extremamente reduzido ou até isolamento geográfico desta primeira população em relação às demais. As árvores filogenéticas também evidenciaram a distinção da população de Ubatuba, mas não resolveram a relação entre os demais grupos de *P. (P.) intermutans*, indicando a necessidade de intensificação das coletas e aperfeiçoamento dos métodos de amplificação para a obtenção de seqüências maiores e mais informativas, inclusive de outros genes mitocondriais e nucleares. A resolução destas filogenias poderia permitir a validação de testes de identificação população-específicos para esta espécie de importância forense.

Palavras-chave: citocromo oxidase I, Sarcophagidae, variabilidade genética, Entomologia Forense.

#### **4.1 - Introdução**

A família Sarcophagidae (Diptera) agrega um grande número de espécies necrófagas amplamente distribuídas que figuram entre os primeiros componentes da fauna cadavérica a colonizarem corpos de humanos e outros animais (Byrd & Castner, 2001), depositando sobre

os mesmos ou nas proximidades larvas de primeiro instar ao invés de ovos (Denno & Cothran, 1976), o que as torna mais rápidas e capazes em acessar o alimento mesmo quando coberto por algum material.

Entre as mais de 750 espécies neotropicais de sarcófagídeos, *Peckia* (*Pattonella*) *intermutans* (Walker), encontrada do México ao Paraguai (Pape, 1996), é uma das mais frequentemente capturadas em experimentos com carcaças de animais e armadilhas para moscas no sudeste do Brasil, onde é considerada hemissinantrópica (Linhares, 1981; D'Almeida, 1984; Dias *et al.*, 1984; Carvalho *et al.*, 2000; Oliveira *et al.*, 2002; Leandro & D'almeida, 2005; Moretti *et al.*, 2008). Carvalho *et al.* (2000) encontraram exemplares desta espécie em carcaças de porcos expostas a uma área de floresta cercada por ambiente urbano e em cadáveres humanos no Instituto Médico Legal na cidade de Campinas, São Paulo, atribuindo-lhe importância como indicador forense para o intervalo pós-morte (IPM).

No entanto, em vista das grandes variações biológicas observadas mesmo entre espécies de dípteros visualmente muito semelhantes e evolutivamente próximos, a utilização de dados entomológicos em causas forenses depende da identificação precisa dos espécimes utilizados como referência, sob o risco de se incorrer em conclusões erradas sobre as circunstâncias do crime caso isso não seja feito (Higley & Haskell, . 2001).

A despeito da grande variedade de sarcófagídeos, muitas espécies da família são morfologicamente indistinguíveis entre si, principalmente nos estágios imaturos (Byrd & Castner, 2001), mas algumas delas, mesmo na fase adulta, só podem ser diferenciadas através da genitália dos machos (Carvalho & Mello-Patiu, 2008) (os menos frequentes em carcaças ou cadáveres), o que proporciona um grande desafio ao entomologista forense. Diante destas dificuldades taxonômicas, vem crescendo a utilização de marcadores moleculares em busca de padrões de polimorfismo intra e interespecífico em Sarcophagidae, embora de forma ainda incipiente em comparação com os dados desta natureza já levantados para o outro grupo de maior importância forense, os Calliphoridae (Wells & Stevens, 2008).

O DNA mitocondrial (DNAMt) e o DNA nuclear ribossomal (DNAr) têm sido as maiores fontes de marcadores moleculares não só para dípteros, mas também para outros insetos (Caterino *et al.*, 2000). Nos poucos artigos publicados sobre análises moleculares com sarcófagídeos observa-se a utilização de diferentes marcadores do DNAMt, as regiões que codificam a subunidade I do gene citocromo oxidase (COI) e a subunidade 5 do gene NAD desidrogenase (ND5) (Wells *et al.*, 2001; Zehner *et al.*, 2004). Ratcliffe (2003) utilizou regiões do DNA nuclear ribossomal (DNAr), os espaçadores internos transcritos 1 e 2 (ITS1 e

ITS2) e os codificadores das subunidades das regiões 18S e 28S do RNA ribossomal (RNAr), para a observação de polimorfismo genético entre dípteros, incluindo os Sarcophagidae. Recentemente, Stamper (2008) inferiu o monofiletismo de 21 espécies pertencentes a 11 gêneros desta família pela análise filogenética de seqüências do mtDNA (COI, COII e ND4) e do gene nuclear codificador do fator de alongação 1 $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ ).

O presente estudo visa analisar de forma inédita a variabilidade genética entre populações de *P. (P.) intermutans* de diferentes municípios do Estado de São Paulo e de Salvador (BA), localidades separadas por diferentes distâncias e com características geográficas distintas, através de seqüências parciais do gene COI, trazendo informações que podem ser úteis às ciências forenses pela caracterização regional da espécie e pela possibilidade de validar um método para sua identificação através de um marcador molecular.

#### 4.2 - Material e métodos

*Coleta e criação dos exemplares para o estudo.* Realizaram-se coletas através de armadilhas em cinco localidades com características topográficas e climáticas distintas, sendo quatro dentro do Estado de São Paulo (Jundiaí, Campinas, Mogi-Guaçu e Ubatuba) e uma no Estado da Bahia (Salvador). Tomando como ponto de partida o município de Campinas, Jundiaí encontra-se a uma distância de 40 km, Mogi-Guaçu a 71 Km, Ubatuba a 290 km e Salvador a 1982 km. As coordenadas geográficas estão expressas na Tabela 4.1.

**Tabela 4.1.** – Localidades onde foram coletados os exemplares de *P. (P.) intermutans* com suas respectivas coordenadas geográficas.

Localidade	Coordenadas Geográficas
Ubatuba (SP)	23°26'02'' S e 45°04'15'' O
Campinas (SP)	22°54'21'' S e 47°03'39'' O
Mogi-Guaçu (SP)	22°22'19'' S e 46°56'31'' O
Jundiaí (SP)	23°11'09'' S e 46°53'02'' O
Salvador (BA)	12°58'15'' S e 38°30'39'' O

As armadilhas (Fig. 4.1), confeccionadas com recipientes plásticos de fundo perfurado e pintadas com tinta preta fosca, seguindo a metodologia proposta por Ferreira (1978), foram mantidas suspensas por um período de 24h nos ambientes e localidades previamente determinados, repetindo-se o procedimento por cinco dias consecutivos. Para atração dos insetos foram utilizadas iscas como vísceras de frango, carcaças de peixe e fígado bovino, todos crus e em decomposição. Após cada período de coleta, removiam-se os recipientes.

**Fig. 4.1** - Armadilha utilizada para coletar exemplares da espécie em estudo.



No laboratório, os espécimes capturados eram anestesiados sob baixa temperatura e submetidos à identificação espécie-específica de acordo com a chave de Carvalho & Mello-Patiu (2008). Entre os indivíduos identificados como *P. (P). intermutans*, alguns foram mortos por congelamento e encaminhados às análises moleculares (Tabela 4.2) e outros foram acomodados em gaiolas para o estabelecimento de criações nos laboratórios de Entomologia do IB, UNICAMP, Campinas, SP, e de Ecologia de Populações do IB, UNESP, Botucatu, SP.

**Tabela 4.2** - Indivíduos de *P. (P.) intermutans* das diferentes localidades utilizados nas análises moleculares e seus respectivos códigos de identificação.

Localidade	Sexo	Código de identificação do Indivíduo
Ubatuba	Machos	UBA70, UBA71
	Fêmeas	UBA53, UBA69, UBA72, UBA73, UBA74
Campinas	Machos	CAM55, CAM56
	Fêmeas	CAM78, CAM79, CAM80, CAM82, CAM83, CAM84, CAM85
Mogi-Guaçu	Fêmeas	MGU91, MGU92, MGU94, MGU96, MGU97
Jundiaí	Fêmeas	JUN99, JUN104, JUN105, JUN106, JUN107, JUN110
Salvador	Machos	SAL59, SAL60, SAL61, SAL62, SAL63, SAL64, SAL67

#### *Análises moleculares*

*Extração de DNA.* Foram testadas diferentes técnicas de extração de DNA a fim de se estabelecer, através do protocolo mais eficiente, a padronização do processo neste estudo: fenol-clorofórmio de acordo com Sambrock *et al.* (1989), fenol-clorofórmio de acordo com Sperling *et al.* (1994), extração através de sal (Aljanabi & Martinez, 1997), Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega) - *Isolating genomic DNA from tissue culture cells and animal tissue* e DNeasy Tissue Kit (Qiagen) - *Purification of Total DNA from Animal Tissues*. Este último foi escolhido como padrão ao ter mostrado melhor desempenho em relação à praticidade e boa qualidade do material obtido com longa durabilidade após ser armazenado adequadamente.

Antes de servirem à extração do DNA, os exemplares de *P. (P.) intermutans*, previamente conservados em etanol 96% a 100%, foram dissecados com o auxílio de pinça e estilete, de modo que a cabeça, as pernas, as asas e o abdome, após serem removidos, removidos foram armazenados como material de testemunho sob as mesmas condições descritas acima para os animais íntegros. Apenas o tórax de cada espécime foi utilizado como fonte do material genético.

O procedimento para a extração do DNA genômico total seguiu as instruções contidas no manual do DNeasy Tissue Kit (Qiagen) para o protocolo *Purification of Total DNA from Animal Tissues*, iniciando-se pela maceração do tórax inteiro (sem apêndices) de cada mosca individualmente até a homogeneização dentro de um tubo *Eppendorf* de 1,5mL com o auxílio

de um pistilo motorizado. Uma única modificação foi realizada no protocolo descrito pelo manual: utilização de 40µl de proteinase K para a trituração do material ao invés dos 20µl sugeridos pelo fabricante.

Todas as amostras de DNA extraídas foram mantidas individualmente em tubos *Eppendorf* de 1,5 mL e armazenadas a -20°C.

*Amplificação do DNA pela PCR.* Foram testados quatro pares de iniciadores (*primers*) para a amplificação de um segmento do gene COI. Os iniciadores de Zehner *et al.* (2004), Sperling *et al.* (1994) e este último modificado para SARCI 5'-CAGCTACTTTATTGATCTTT-3' e SARC II 5'-CATTTCAAGCTGTGTAAGC-3' não ofereceram bons resultados. Assim, com base em uma seqüência de *Peckia (Peckia) chrysostoma*, encontrada no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>) sob o número de acesso AF259515, e o auxílio do programa *Gene Runner 3.05* (Hastings Software Inc., 1994), o par de iniciadores descrito abaixo foi desenhado especificamente para este projeto:

*Peckia* For-1: 5'-CGAGCHGAATTAGGWCAAYCC-3'

*Peckia* Rev-1: 5'-GGGTGTCCGAAAATCAGAA-3'

Estes oligonucleotídeos foram sintetizados pela Invitrogen, e funcionaram de maneira satisfatória na reação da polimerase em cadeia.

As reações de amplificação procederam em um termociclador *T-Gradient Thermblock* da Biometra, utilizando-se 12,5µl de *Go Taq Colorless Mastermix* (Promega), 1,0µl do iniciador *Peckia* For-1 (10µM), 1,0µl do iniciador *Peckia* Rev-1 (10µM), 1- 4µl de DNA em eluição (dependendo da qualidade da amostra extraída) e ddH<sub>2</sub>O (água duplamente deionizada) até completar o volume final de 25µl. Os ciclos de temperatura incluíram um passo inicial de desnaturação de 3min a 94°C seguido por 35 ciclos de 1min a 94°C para desnaturação, 1min a 55°C para anelamento e 1,5min a 72°C para extensão. Ao último ciclo acrescentou-se um passo de alongação de 5min a 72°C.

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% (Sigma, USA) em tampão 1x TBE (40mM Tris-acetate e 1mM EDTA, pH 8.0) a 80V, tratados com solução de brometo de etídeo (EtBr) e fotografados usando-se uma câmera digital Canon com entrada e saída acopladas, respectivamente, a um transiluminador UVB e um computador. O tamanho dos fragmentos amplificados foi estimado por comparação com os marcadores padrão de peso molecular ΦX174/*Hae*III e 1-kb DNA Ladder.

*Purificação do DNA amplificado.* As amostras amplificadas foram purificadas por meio da centrifugação em coluna com o *QIAquick PCR Purification Kit* da Qiagen. Os

*amplicons* (seqüências amplificadas) purificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% (Sigma, USA) em tampão 1x TBE (40mM Tris-acetate e 1mM EDTA, pH 8.0) a 80V, tratados com solução de brometo de etídeo (EtBr) e fotografados usando-se uma câmera digital Canon com entrada e saída acopladas, respectivamente, a um transiluminador UVB e um computador. Para que as amostras fossem enviadas ao sequenciamento, a quantidade de DNA presente em cada uma delas foi estimada através de análise comparativa com o *Low Mass Ladder* da Invitrogen.

*Seqüenciamento das amostras.* Produtos da PCR purificados contendo no mínimo 20ng de DNA foram encaminhados ao seqüenciamento, realizado pelo Centro de Biotecnologia do Instituto Butantã em São Paulo, SP, através do método *Dye terminator*, com o equipamento *3100 Genetic Analyzer* da Applied Biosystems.

*Alinhamento das seqüências.* As 34 sequencias de *P. (P.) intermutans* obtidas foram alinhadas pelo ClustalX (Thompson *et al.*, 1997) e, posteriormente, tratadas no programa Bioedit (Hall, 1999) para que se fizessem os ajustes necessários, permanecendo com o comprimento correspondente a 427pb.

*Estimativa dos parâmetros de diversidade genética.* Analisamos a distribuição da variabilidade de nucleotídeos nas seqüências de um mesmo grupo ou de grupos diferentes com o suporte do pacote DNAsp (Rozas & Rozas, 1995; Rozas *et al.* 2003), o qual estima parâmetros de diversidade de nucleotídeos ( $\pi$ ) para duas populações e a diversidade de haplótipos (h).

*Análises filogenéticas.* Para as análises filogenéticas, realinharam-se as seqüências junto às de outras espécies de sarcófagídeos extraídas do GenBank (Tabela 4.3), formando-se dois grupos separados: em um deles constavam *P. (P.) intermutans*, *P. (Peckia) chrysostoma* e *Blaesoxipha (Gigantotheca) plinthopyga*; no outro, estas três espécies e mais *Sarcophaga omari*, *S. (Lioproctia) aureolata*, *S. (L.) pattoni*, *S. (Liopygia) crassipalpis*, *Sarcophaga (L.) ruficornis*, *S. (Liosarcophaga) brevicornis*, *S. (L.) scopariiformis*, *S. (Neobellieria) bullata*, *S. (N.) cooleyi*, *S. (Parasarcophaga) albiceps*, *S. (P.) taenionota*, *S. (Robineauella) javana* e *S. (Seniorwhitea) princeps*.

Dois árvores filogenéticas foram construídas para cada grupo com o apoio do programa MEGA4 (Tamura *et al.*, 2007), uma por método de distância – Neighbour-joining (NJ) - e outra por máxima parcimônia (MP). Em ambos os casos, obtiveram-se as topologias pelo modelo de substituição de nucleotídeos Kimura dois-parâmetros (Kimura, 1980). Os valores de diferenças entre os ramos dos diversos *taxa* foram obtidos depois de 500 réplicas

testadas pelo *bootstrap*. Para o enraizamento das árvores, a sequência de *B. (G.) plinthopyga* foi utilizada como grupo externo.

**Tabela 4.3** - Espécies de Sarcophagidae cujas seqüências foram coletadas no GenBank.

<b>Nomenclatura específica de acordo com Pape (1996)</b>	<b>Nomenclatura específica indexada no GenBank</b>	<b>Código de acesso no GenBank</b>
<i>B. (G.) plinthopyga</i>	<i>B. plinthopyga</i>	AF259514
-	<i>S. omari</i> *	FJ974742
<i>P. (P.) chrysostoma</i>	<i>P. chrysostoma</i>	AF259515
<i>S. (L.) aureolata</i>	<i>S. (L.) aureolata</i>	EF405951
<i>S. (L.) brevicornis</i>	<i>S. brevicornis</i>	EF405936
<i>S. (L.) crassipalpis</i>	<i>S. crassipalpis</i>	AF259510
<i>S. (L.) pattoni</i>	<i>S. pattoni</i>	FJ479724
<i>S. (L.) ruficornis</i>	<i>S. ruficornis</i>	EF405940
<i>S. (L.) ruficornis</i>	<i>S. ruficornis</i>	EF405941
<i>S. (L.) scopariformis</i>	<i>S. scopariformis</i>	FJ479745
<i>S. (N.) bullata</i>	<i>S. bullata</i>	AF259506
<i>S. (N.) cooleyi</i>	<i>S. cooleyi</i>	AF259507
<i>S. (P.) albiceps</i>	<i>S. albiceps</i>	EF405932
<i>S. (P.) albiceps</i>	<i>S. albiceps</i>	EF405931
<i>S. (P.) taenionota</i>	<i>S. taenionota</i>	EF405934
<i>S. (R.) javana</i>	<i>S. javana</i>	FJ479733
<i>S. (S.) princeps</i>	<i>S. princeps</i>	EF405948
<i>S. (S.) princeps</i>	<i>S. princeps</i>	EF405949

\* este epíteto específico é ausente no catálogo de sarcófagídeos elaborado por Pape (1996). Portanto, não há como garantir a correta identificação do espécime fornecedor da seqüência.

#### **4.3 - Resultados e discussão**

Encontrou-se alta biodiversidade dentro da espécie *P. (P.) intermutans*, expressa de forma mais notória pelos representantes da população de Ubatuba, a qual exibiu o maior

número de haplótipos ( $h$ ), três vezes mais sítios polimórficos ( $S$ ) do que as populações de Campinas e Mogi-Guaçu, além de diversidade de nucleotídeos ( $\pi$ ) (Nei, 1987) e média do número de diferenças de nucleotídeos ( $k$ ) (Tajima, 1983) significativamente superiores às demais populações analisadas (Tabela 4.4).

O modelo de evolução neutra (Kimura, 1983) prediz que locos mitocondriais não são afetados pela seleção natural, evoluindo em função de processos estocásticos como a deriva genética. Embora estudos mais recentes venham de encontro a este modelo, sugerindo que as variações encontradas em certos genes mitocondriais podem ser relacionadas à seleção natural (Ballard & Kreitman, 1994; Rand *et al.*, 1994; Nachman *et al.*, 1996; Cesane *et al.*, 1997; Nachman, 1998; Gerber *et al.*, 2001), ao aplicamos o teste de neutralidade evolutiva de Tajima (1989), o índice “D”, que compara a diversidade de nucleotídeos em relação ao número de mutações e ao número de sítios variáveis, assume valores indicadores de que todas as populações são seletivamente neutras para  $p > 0,10$  quanto ao loco gênico utilizado como marcador (Tabela 4.4).

**Tabela 4.4** - Índices de variabilidade genética e neutralidade entre indivíduos de *P. (P.) intermutans* coletados das populações de São Paulo e da Bahia.

Localidade	N	S	h	$\pi$	k	$H_d$	D
Campinas	9	2	2	0,00104	0,444	0,222	-1,36240*
Mogi-Guaçu	5	2	2	0,00187	0,800	0,400	-0,97260*
Jundiaí	6	0	1	0	0	0	0*
Ubatuba	7	5	3	0,00558	2,381	0,762	0,82563*
Salvador	7	1	2	0,00067	0,286	0,286	-1,00623*
Total	34	7	5	0,00328	1,3993	0,412	-1,16210*

Onde: N = número de indivíduos; S = número de sítios polimórficos; h = número de haplótipos;  $\pi$  = diversidade de nucleotídeos; k = diferença média de nucleotídeos;  $H_d$  = diversidade de haplótipos; D = teste de neutralidade de Tajima. \* Diferença estatística não-significativa para  $p > 0,10$ .

Foram medidos o número médio de diferenças de nucleotídeos ( $k_{xy}$ ) e o número médio de substituições nucleotídicas por sítio ( $D_{xy}$ ) entre pares de populações (Nei, 1987). Os resultados mostrados na Tabela 4.5 permitem perceber que os indivíduos de população de

Ubatuba formam um grupo notadamente distinto, apresentando um nível de divergência em relação às outras populações significativamente maior do que aquele observado entre as mesmas.

**Tabela 4.5** - Análise da divergência genética entre pares das diferentes populações estudadas.

<b>Populações comparadas</b>	<b><math>k_{xy}</math></b>	<b><math>D_{xy}</math></b>
Mogi-Guaçu – Ubatuba	3,257	0,00763
Campinas – Ubatuba	3,206	0,00751
Jundiaí – Ubatuba	3,143	0,00736
Salvador – Ubatuba	3,286	0,00769
Mogi-Guaçu – Salvador	0,543	0,00127
Campinas - Mogi-Guaçu	0,533	0,00125
Mogi-Guaçu – Jundiaí	0,400	0,00094
Campinas – Salvador	0.365	0.00085
Campinas – Jundiaí	0.222	0.00052
Jundiaí – Salvador	0.143	0.00033

Onde:  $k_{xy}$  = número médio de diferenças de nucleotídeos;  $D_{xy}$  = número médio de substituições nucleotídicas por sítio.

A extensão da diferença genética entre populações também é estimada pelo coeficiente  $F_{st}$  (Wright, 1965), sendo pressuposto que a frequência gênica dentro de um grupo tende em divergir ao longo do tempo como resultado da ação de fatores evolutivos como mutação, seleção natural, deriva genética e fluxo gênico. Em síntese, o valor de  $F_{st}$  indica que a proporção das diferenças genéticas entre populações contribui com a variabilidade genética total, sendo o restante da mesma devida a diferenças entre os indivíduos dentro de cada população. Assim, quanto maior o valor de  $F_{st}$ , maior será a relevância da variação entre populações. Sendo esta uma medida relativa, influências decorrentes do tipo de marcador utilizado não são esperadas, o que pode ser visto como vantagem em comparação com medidas de diferenças genéticas absolutas como a distância genética de Nei (1972), passível de apresentar limitações decorrentes de sua dependência da taxa evolutiva do gene empregado no estudo (Wang *et al.*, 2001). Contudo, Nei (1973) afirma que a utilização de  $F_{st}$  não se

adequa a locos com alelos múltiplos na presença de seleção, propondo para estes casos um cálculo para a diferenciação genética entre duas populações, denominando-o  $G_{st}$ .

A Tabela 4.6 mostra que os valores de  $F_{st}$  e a diversidade gênica ( $H_s$ ) (Nei, 1973) são sempre maiores quando a população Ubatuba é analisada em par com alguma das demais, reforçando sua maior diferença genética. Nota-se também que  $G_{st}$ , inversamente proporcional ao fluxo gênico, é maior entre Ubatuba e as cidades do interior paulista, com distâncias que não ultrapassam 420 Km, do que entre as mesmas e Salvador, a mais de 1900 Km de qualquer uma delas. Estes dados, curiosamente, sugerem que há maior probabilidade de isolamento geográfico entre populações de *P. (P.) intermutans* do interior de São Paulo e de Ubatuba do que entre estas primeiras e a de Salvador.

**Tabela 4.6** - Diversidade e diferenciação genética considerando as diferentes populações entre si.

Populações	$H_s$	$F_{st}$	$G_{st}$
Campinas - Mogi-Guaçu	0,27556	- 0,16667	-0,06961
Campinas – Jundiaí	0.14141	0.00000	0.00277
Campinas – Ubatuba	0,44709	0,55941	0,21490
Campinas – Salvador	0,24868	0,00000	-0,03120
Mogi-Guaçu – Jundiaí	0,17143	0,00000	0,00076
Mogi-Guaçu – Ubatuba	0,62619	0,51170	0,13337
Mogi-Guaçu – Salvador	0,32857	0,00000	0,04089
Jundiaí – Ubatuba	0,42328	0,62121	0,28790
Jundiaí – Salvador	0,15873	0,0000	0,00046
Ubatuba – Salvador	0,52381	0,59420	0,18085

Onde:  $H_s$  = diversidade gênica;  $F_{st}$  = diferenciação genética de Wright (1965);  $G_{st}$  = diferenciação genética de Nei (1973).

Ubatuba se encontra no nível do mar junto a uma cadeia de montanhas que se elevam a altitudes de até aproximadamente 1150 m a partir deste ponto, separando-a das cidades do Planalto Paulista, cujas altitudes médias variam entre 600 e 800 m acima do mar. Tais condições topográficas podem favorecer as diferenças genéticas entre *P. (P.) intermutans* de

Ubatuba frente às outras populações da espécie em São Paulo, caso realmente promovam seu isolamento geográfico.

A partir das análises filogenéticas, construíram-se árvores, cujos grupos externos foram representados por *B. (G.) plinthopyga*, pelos métodos de distância (NJ) (Figs. 4.2 e 4.4) e máxima parcimônia (MP) (Figs. 4.3 e 4.5). As topologias destas árvores corroboraram os dados sobre variabilidade genética descritos nas Tabelas 4.4, 4.5 e 4.6, reafirmando a maior divergência nas seqüências de COI da população de Ubatuba diante das demais, denotando-o como um grupo geneticamente diferenciado. Além disso, o comprimento dos ramos da árvore da Figura 4.4 indica que *P. (P.) intermutans* é evolutivamente mais recente comparada às espécies o gênero *Sarcophaga*.

Apesar destes resultados interessantes, as árvores não ofereceram maiores informações a respeito das relações entre populações do interior de São Paulo e de Salvador. Uma das possíveis causas é o número relativamente baixo de indivíduos amostrados (**n**, Tabela 4.4), justificado pela dificuldade em capturá-los, decorrente da baixa frequência com que *P. (P.) intermutans* era observada nos sítios de coleta. Além disso, muitos espécimes foram utilizados - sem a obtenção resultados interpretáveis - nos procedimentos de padronização da extração e amplificação do DNA, os quais exigiram numerosos e demorados testes, visto que até então nenhuma técnica de biologia molecular havia sido descrita para a espécie.

Outro fator limitante na diferenciação de populações pode ter sido o tamanho dos *amplicons* (réplicas de fragmentos com seqüências). A inexistência de iniciadores funcionais para COI desta espécie na literatura tornou necessário o desenvolvimento de iniciadores específicos a partir de uma única seqüência disponível do gênero *Peckia* no GenBank, correspondente à *P. (P.) chrysostoma*. O grau de divergência relativamente alto observado entre estes congêneres (~8,7%) não permitiu o desenho de iniciadores que fornecessem *amplicons* maiores. A Tabela 4.7 traz os níveis de divergência entre as seqüências de *P. (P.) intermutans* obtidas neste estudo e as de *P. (P.) chrysostoma* retiradas do GenBank e usadas na elaboração dos iniciadores. Os valores são concordantes com aqueles encontrados por Wells *et al.* (2001) ao compararem espécies de Sarcophaginae (3,3% a 11,2%). No entanto, não foi possível explicar a maior proximidade evolutiva de *P. (P.) chrysostoma* com espécies de *Sarcophaga* do que com *P. (P.) intermutans* (Figs. 4.4 e 4.5).

Ainda, devemos considerar que COI pode não ser um marcador molecular adequado à diferenciação de populações de *P. (P.) intermutans* nos limites geográficos considerados neste trabalho, com exceção de Ubatuba.

**Tabela 4.7** - Matriz de distâncias entre representantes das populações de *P. (P.) intermutans* (*PPi*) das diferentes localidades amostradas e de *P. (P.) chrysostoma* do GenBank, calculadas pelo modelo de substituição de nucleotídeos Kimura dois-parâmetros (Kimura, 1980).

	<i>PPi</i> - Mogi-guaçu	<i>PPi</i> - Jundiaí	<i>PPi</i> - Salvador	<i>PPi</i> - Ubatuba	<i>PPi</i> - Campinas
<i>PPi</i> -Mogi-Guaçu					
<i>PPi</i> -Jundiaí	0,001				
<i>PPi</i> -Salvador	0,001	0,000			
<i>PPi</i> -Ubatuba	0,008	0,007	0,008		
<i>PPi</i> -Campinas	0,001	0,000	0,000	0,007	
<i>P. (P.) chrysostoma</i>	0,087	0,087	0,087	0,086	0.087

Segundo Pollock *et al.* (2002), quando se trabalha com poucos *taxa* (neste caso, populações), o aumento do número de caracteres (nucleotídeos das seqüências) pode diminuir o erro filogenético, ocorrendo o mesmo quando se trabalha com poucos caracteres e é aumentado o número de *taxa*. São vistos aqui os dois problemas: poucas populações e seqüências nucleotídicas relativamente curtas. Hillis *et al.* (2003) inferem que para a resolução de filogenias entre *taxa* com baixo grau de divergência, como é o caso das populações analisadas de *P. (P.) intermutans* do interior de São Paulo e Salvador, a melhor opção é aumentar o número de caracteres, e não o de *taxa*. Em acordo com a opinião destes autores os estudos serão continuados para o desenvolvimento de iniciadores capazes de gerar *amplicons* maiores.

O enraizamento da árvore com *B. (G.) plinthopyga* não pareceu ter sido interessante, pois o curto comprimento do ramo que ocupa nas árvores das Figuras 4.2 e 4.4 revela pouco número de variações evolutivas acumuladas ao longo do tempo, indicando que pode ser um grupo de especiação recente demais para servir a tal finalidade. Em trabalhos futuros, a inserção de espécies de Calliphoridae ou Muscidae como grupo externo pode ser mais informativa em função do maior grau de divergência em relação aos Sarcophagidae.

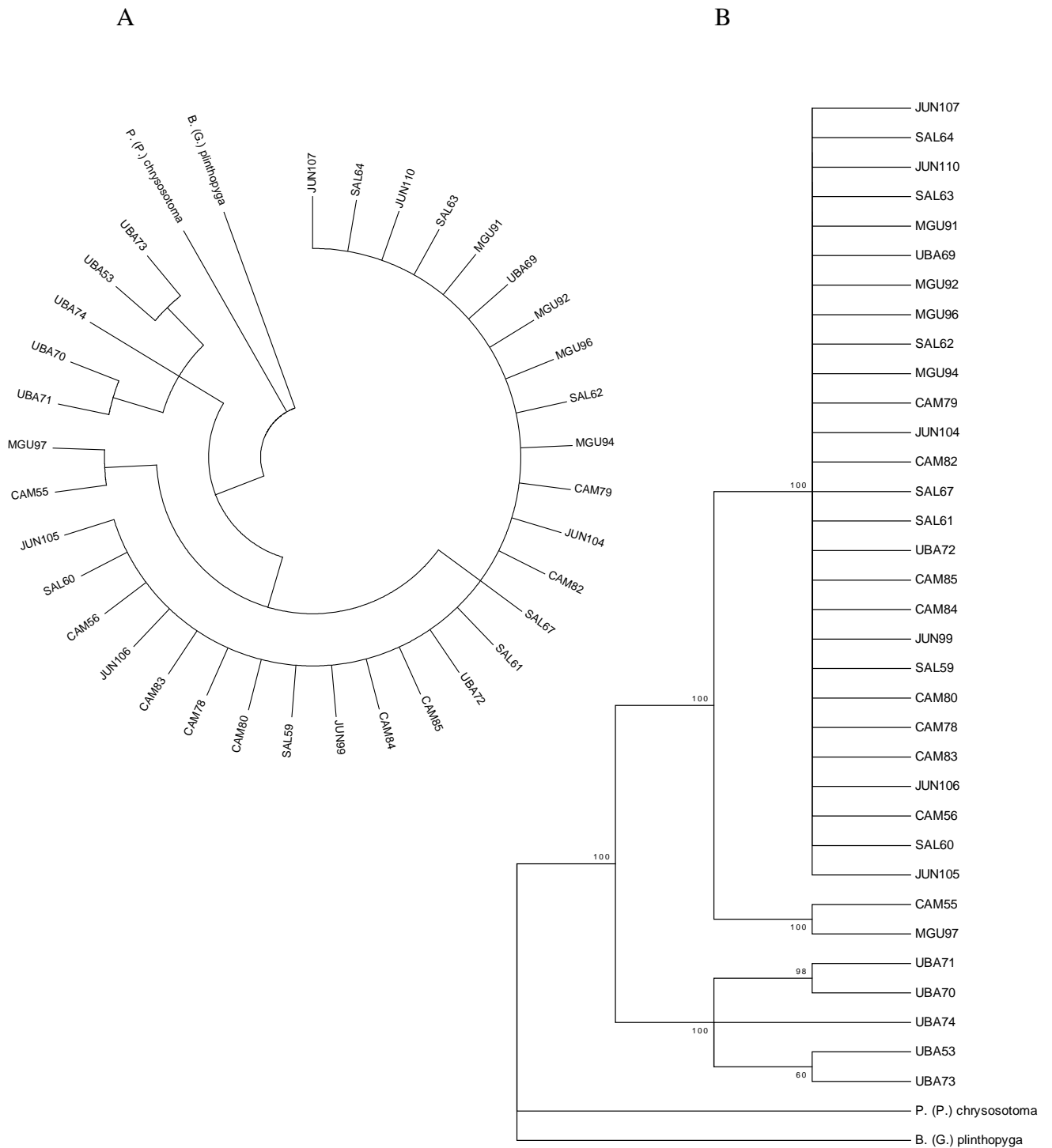
Observando que a população de *P. (P.) intermutans* de Ubatuba foi a única significativamente divergente, conclui-se que o uso isolado do segmento de 427 pb do gene COI analisado não seria útil para a identificação da espécie nem para a diferenciação de suas populações nos limites geográficos considerados nesta pesquisa. Contudo, diante das limitações citadas quanto ao número e tamanho das seqüências, esta divergência pontual traz boas perspectivas sobre resultados futuros, pois, se confirmada a hipótese de isolamento

geográfico para os indivíduos do Litoral Norte de São Paulo em relação aos do Planalto Paulista, abre-se um precedente para a possibilidade de que populações ao leste da Serra do Mar representem linhagens distintas o bastante das demais para que sejam validadas ferramentas moleculares na sua identificação população-específica. Segundo Wells *et al.* (2004), a validação de ferramentas moleculares para a identificação de insetos forenses sempre deve ser feita para populações de localidades específicas.

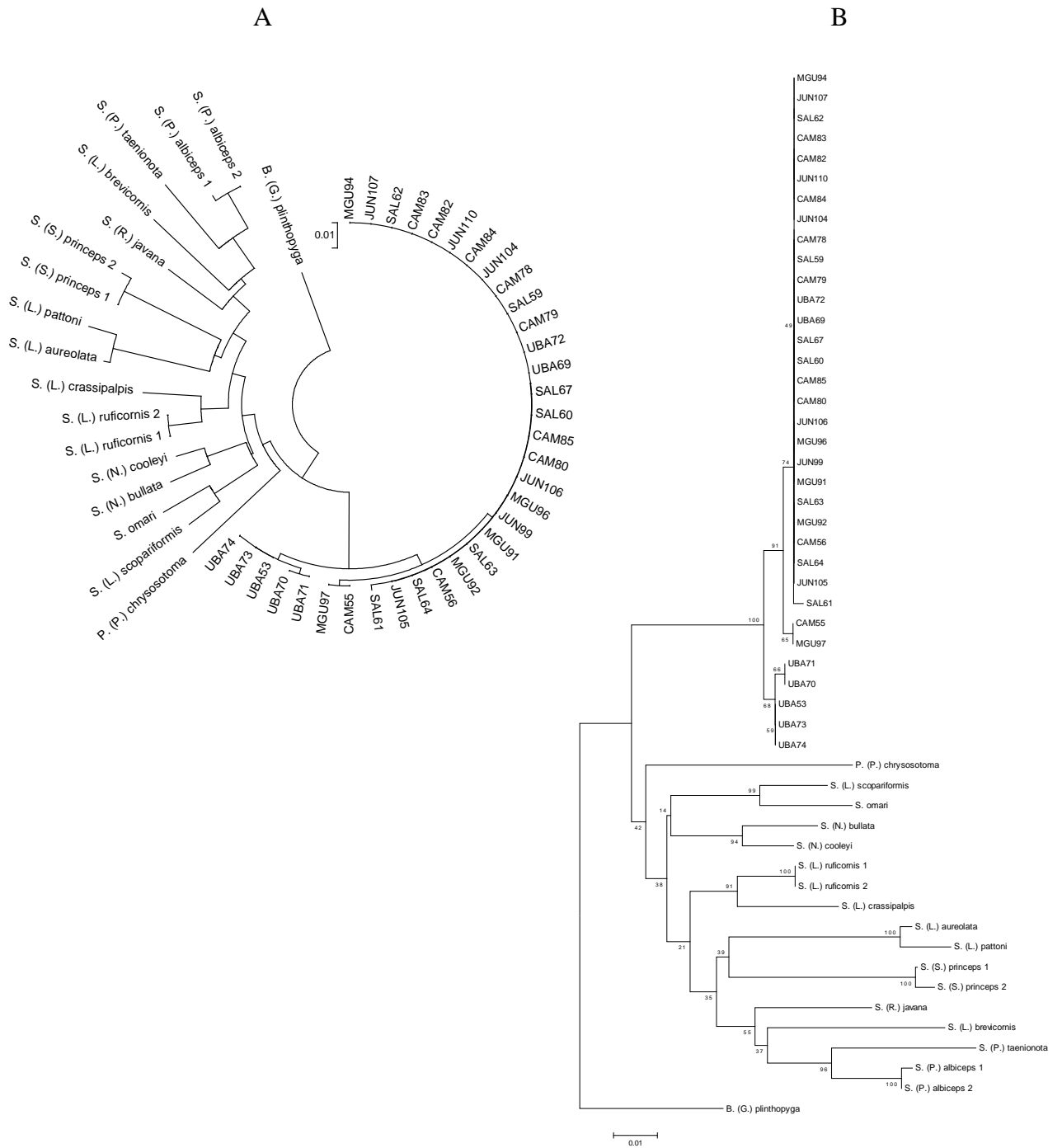
As coletas em campo serão intensificadas para o aumento das amostragens populacionais, e as ferramentas de biologia molecular serão aperfeiçoadas buscando a obtenção de seqüências nucleotídicas maiores e com boa qualidade não só para COI, mas também para outros marcadores moleculares mitocondriais (COII, ND5, 12S, 16S) e nucleares (ITS1, ITS2, 18S, 28S, EF1- $\alpha$ ) já observados em uso na literatura para os Sarcophagidae (Ratliffe *et al.*, 1993; Otranto & Stevens, 2002; Zehner, *et al.*, 2004; Stamper, 2008), os quais permitirão, em conjunto, uma verificação mais confiável da identidade de *P. (P.) intermutans* e de suas populações (como sugeriria Avise, 1994).



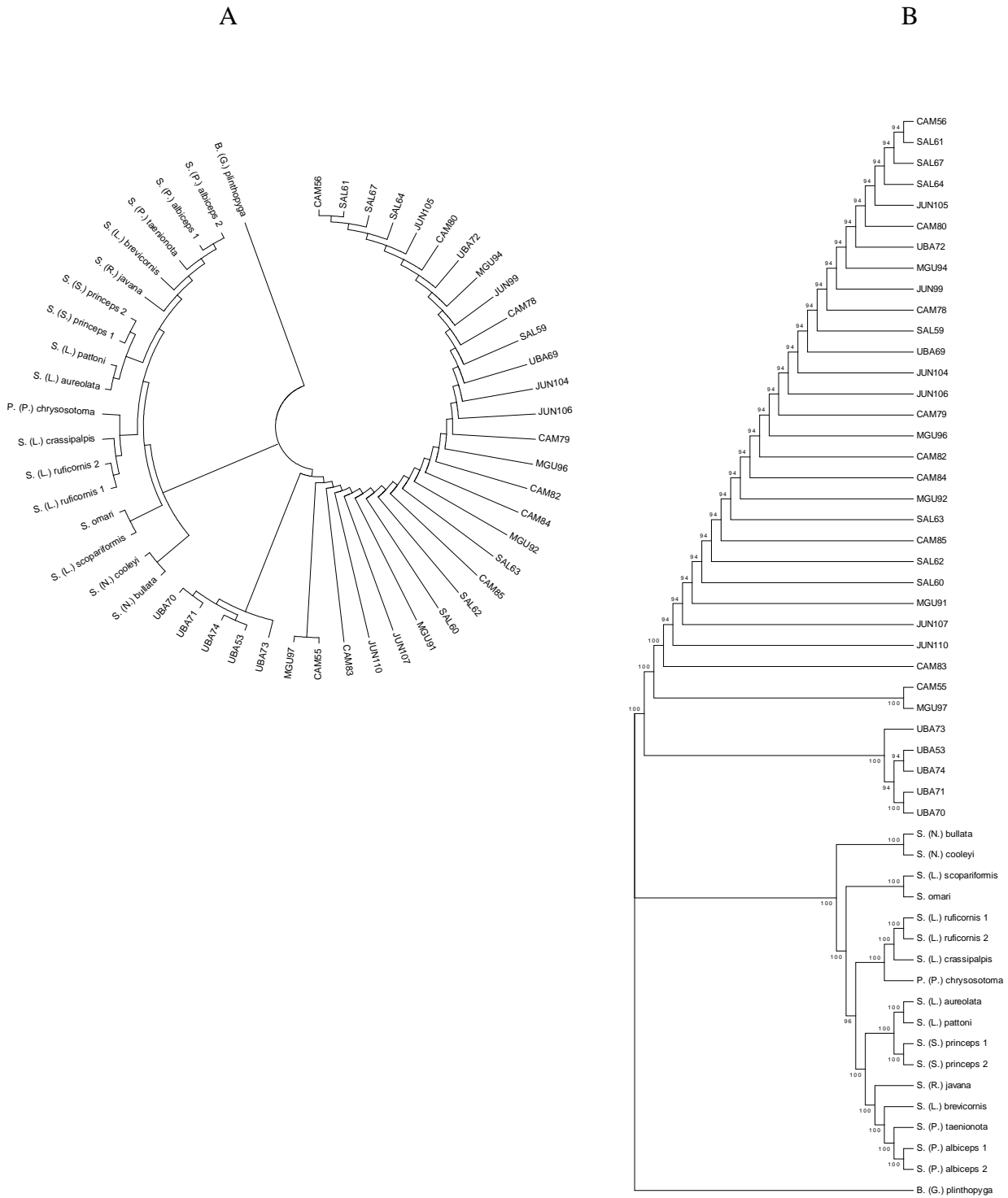
**Fig. 4.3** - Filogenia de *P. (P.) intermutans*, *P. (P.) chrysostoma* e *B. (G.) plinthopyga* (grupo externo) representada por árvore de consenso sob a forma circular (A) e retangular (B) inferida com base na análise de máxima parcimônia (MP) a partir de 500 replicatas computadas.



**Fig. 4.4** - Filogenia de *P. (P.) intermutans*, *P. (P.) chrysostoma*, *B. (G.) plinthopyga* (grupo externo) e espécies de *Sarcophaga* sob a forma circular (A) e retangular (B) inferida com base na distância genética (NJ) computada com o modelo Kimura 2-p sobre sequências nucleotídicas com 427pb de COI (só foram mantidos os ramos que apareceram em mais de 50% das 500 réplicas produzidas pelo *bootstrap*).



**Fig. 4.5** - Filogenia de *P. (P.) intermutans*, *P. (P.) chrysostoma*, *B. (G.) plinthopyga* (grupo externo) e espécies de *Sarcophaga* representada por árvore de consenso sob a forma circular (A) e retangular (B) inferida com base na análise de máxima parcimônia (MP) a partir de 500 replicatas computadas.



## 5 – CONCLUSÕES GERAIS

1. A *checklist* dos Sarcophaginae (Diptera: Sarcophagidae) do território brasileiro com seus respectivos registros de ocorrência permitiu perceber que a única região do país com levantamento significativo de espécies é o Sudeste, estando as demais em grande déficit com relação à descrição deste grupo faunístico, levando a crer que são potenciais focos de descoberta de novas espécies. Apesar da clara necessidade de se intensificarem os estudos sobre a fauna de sarcófagídeos no Brasil, os dados numéricos deste trabalho já indicam que o país tem grandes chances de ser detentor do maior número de espécies da família em todo o mundo.
2. As análises de variabilidade genética de *Peckia (Pattonella) intermutans* com seqüências de 427pb do gene COI extraídas de representantes das populações dos estados de São Paulo (Campinas, Mogi-Guaçu, Jundiaí e Ubatuba) e Bahia (Salvador) mostrou grande divergência do grupo proveniente do litoral norte paulista. Este dado, suportado por análises de variabilidade genética intrapopulacionais e interpopulacionais, assim como por análises filogenéticas pelos métodos de distância (Neighbour-Joining) e máxima parcimônia (MP), indica a possibilidade de haver fluxo gênico extremamente reduzido ou até mesmo isolamento geográfico entre a população de Ubatuba e as demais.
3. Não foi possível estabelecer a partir do marcador molecular descrito acima um teste efetivo de identificação espécie-específica de *P. (P.) intermutans* para fins forenses em virtude dos padrões de polimorfismo encontrados. Pretendemos continuar pesquisas neste sentido, buscando novos iniciadores para a obtenção de seqüências maiores tanto de COI como de outras regiões do DNA mitocondrial e nuclear que possam permitir a validação de ferramentas moleculares para a identificação desta espécie no auxílio de questões criminalísticas.

## 6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alam, M.T., M.K. Das, V. Dev, M.A. Ansari & Y.D. Sharma. 2007.** Identification of two cryptic species in the *Anopheles (Cellia) annularis* complex using ribosomal DNA PCR-RFLP. *Parasitol. Res.* 100(5): 943-948.
- Alamalakala, L., S.R. Skoda, J.E. Foster. 2008.** Amplified fragment length polymorphism used for inter- and intraspecific differentiation of screwworms (Diptera: Calliphoridae). *Bull. Entomol. Res.* 12:1-11.
- Ali-Khan F.E. & Z. Ali-Khan. 1974.** Two cases of human *Sarcophaga* (Diptera: Sarcophagidae) myiasis in Quebec, with descriptions of the larvae. *Can. J. Zool.* 52(5): 643-647.
- Aljanabi, S.M., I. Martinez. 1997.** Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Res.* 25: 4692-4693.
- Alvarenga, M. 1962.** A entomofauna do arquipélago de Fernando de Noronha, Brasil. *Arquivos do Museu Nacional* 52: 21-26.
- Amendt, J., R. Krettek & R. Zehner. 2004.** Forensic entomology. *Naturwissenschaften* 91: 51-65.
- Amorim, J.A. & O.B. Ribeiro. 2001.** Distinction among the Puparia of Three Blowfly Species (Diptera: Calliphoridae) Frequently Found on Unburied Corpses. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 96:* 781-784.
- Andersen, M.N. 1999.** The evolution of marine insects: phylogenetic, ecological and geographical aspects of species diversity in marine water striders. *Ecography.* 22: 98-111.
- Anderson, G.S. 1999.** Wildlife forensic entomology: determining time of death in two illegally killed black bear cubs. *J. Forensic Sci.* 44: 856-859.
- Anderson, G.S. & N.R. Huitson. 2004.** Myiasis in pet animals in British Columbia: The potential of forensic entomology for determining duration of possible neglect. *Can. Vet. J.* 45: 993-998.
- Avisé JC. 1994.** *Molecular Markers, Natural History and Evolution.* New York, Chapman & Hall. 511p.
- Avisé, J., J. Arnold, R.M. Ball, E. Bermingham, T. Lamb, J.E. Neigel, C.A. Reeb & N.C. Saunders. 1987.** Intraspecific phylogeography: the molecular bridge between population genetics and systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 18: 489-522.
- Baliraine, F.N., M. Bonizzoni, E.O. Osir, S.A. Lux, F.J. Mula, L. Zheng, L.M. Gomulski, G. Gasperi & A.R. Malacrida. 2003.** Comparative analysis of microsatellite loci in four fruit fly species of the genus *Ceratitis* (Diptera: Tephritidae). *Bull. Entomol. Res.* 93: 1-10.
- Ballard, J.W.O. 1994.** Sequence data resolves a morphological conundrum in *Austrosimulium* (Diptera: Simuliidae). *J. Aust. Entomol. Soc.* 33: 131-135.
- Ballard, W.O. & M. Kreitman. 1994.** Unraveling selection in the mitochondrial genome of *Drosophila*. *Genetics* 138:757-772.

- Barros, R.M., C.A. Mello-Patiu & J.R. Pujol-Luz. 2008.** Sarcophagidae (Insecta:Diptera) associados à decomposição de carcaças de *Sus scrofa* (Suidae) em área de cerrado do Distrito Federal, Brasil. *Rev. Bras. Entomol.* 52(4): 606-609
- Barker, G.M. 2004.** Natural enemies of terrestrial molluscs. CABI Publishers, Wallingford, UK.
- Benecke, M. 1998.** Six forensic entomology cases: description and commentary. *J. Forensic Sci.* 43(4): 797-805.
- Benecke, M. 2001.** A brief history of forensic entomology. *Forensic Sci. Int.* 120: 2-14.
- Benecke, M. & R. Lessig. 2001.** Child neglect and forensic entomology. *Forensic Sci. Int.* 120: 155–159.
- Benecke, M., E. Josephi & R. Zweihoff. 2004.** Neglect of the elderly: forensic entomology cases and considerations. *Forensic Sci. Int.* 146: 195–199.
- Bergeret, M. 1855.** Infanticide. Momification naturelle du cadavre. *Annales d'Hygiène Publique et de Médecine Légale* 4: 442–452.
- Boaretto M.A.C. & L.C. Forti. 1997.** Perspectivas no controle de formigas cortadeiras. *Série Técnica IPEF* 11(30): 31-46.
- Brady, S.G. & B.N. Danforth. 2004.** Recent intron gain in elongation factor-1a of colletid bees (Hymenoptera: Colletidae). *Mol. Biol. Evol.* 21(4): 691–696.
- Brower, A.V.Z. 2006.** Problems with DNA barcodes for species delimitation: ‘ten species’ of *Astrartes fulgerator* reassessed (Lepidoptera: Hesperiiidae). *Syst. Biodivers.* 4: 127-132.
- Brown, W.V., R. Morton, M.J. Lacey, J.P. Spradbery & R.J. Mahon. 1998.** Identification of the geographical source of adults of the Old World screw-worm fly, *Chrysomya bezziana* Villeneuve (Diptera: Calliphoridae), by multivariate analysis of cuticular hydrocarbons. *Comp. Biochem. Physiol.*, 119: 391-399.
- Brusca, R.C. & G.J. Brusca. 2003.** Invertebrates. 2<sup>nd</sup> ed. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland, Massachusetts.
- Byrd J.H. & J.L. Castner. 2001.** Insects of forensic importance. In: Byrd JH, Castner JL (eds) *Forensic entomology – the utility of arthropods in legal investigations.* pp 287-302. CRC Press, Boca Raton.
- Campobasso, C.P., G. Di Vella & F. Introna. 2001.** Factors affecting decomposition and Diptera colonization. *Forensic Sci. Int.*, 120: 18-27.
- Carvalho, L.M.L. 1996.** Sucessão entomológica de populações de insetos associados à decomposição de carcaças de suínos expostos em ambiente natural de mata mesófila semidecídua, Campinas, SP. Universidade Estadual de Campinas, SP. Dissertação de Mestrado. 77p.

- Carvalho, L.M.L., P.J. Thyssen, A.X. Linhares F.B. & Palhares. 2000.** A checklist of arthropods associated with carrion and human corpses in southeastern Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 95: 135-138.
- Carvalho, L.M.L., P.J. Thyssen, M.L. Goff & A.X. Linhares. 2004.** Observations on the succession patterns of necrophagous insects onto a pig carcass in an urban area of Southeastern Brazil. *Aggrawal's Int. J. For. Med. Toxicol.*, 5: 33-39.
- Carvalho C.J.B. & C.A. Mello-Patiu. 2008.** Key to the adults of the most common forensic species of Diptera in South America. *Rev. Bras. Entomol.* 52(3): 390-406.
- Carvalho, R.P.L. 1978.** Pragas do milho. In: Paterniani, E., Coord. Melhoramento e produção de milho no Brasil. Piracicaba/ESALQ. Fundação Cargill: 505-561.
- Carvalho-Filho, F.S. & M.C. Esposito. 2006.** Estudo preliminar sobre os sarcófagídeos (Insecta: Diptera) na base petrolífera de Porto Urucu, Coari, Amazonas. Anais do II Workshop de Avaliação Técnica e Científica da Rede CTPetro Amazônia, Manaus: INPA, 2006. (consultado em 18 de fevereiro de 2009: [http://projetos.inpa.gov.br/ctpetro/workshop\\_site/Resumos\\_PT1/pdf/SARCOPHAGIDAE\\_FERNANDO.pdf](http://projetos.inpa.gov.br/ctpetro/workshop_site/Resumos_PT1/pdf/SARCOPHAGIDAE_FERNANDO.pdf) ).
- Caterino, M.S., S. Cho & F.A.H. Sperling. 2000.** The current state of insect molecular systematics: A thriving tower of Babel. *Annu. Rev. Entomol.* 45: 1-54.
- Catts, E.P. & M.L. Goff. 1992.** Forensic Entomology in criminal investigation. *Annu. Rev. Entomol.* 37: 253-272.
- Catts E.P. & N.H. Haskell. 1990.** Entomology and death: a procedural guide. Joyce's Print Shop, Clemson, USA.
- Casane, D., N. Dennebouy, H. Rochambeau, J.C. Mounolou & M. Monnerot. 1997.** Nonneutral evolution of tandem repeats in the mitochondrial DNA control region of lagomorphs. *Mol. Biol. Evol.* 14(8):779-789.
- Cho, S., A. Mitchell, J.C. Regier, C. Mitter, R.W. Poole, T.P. Friedlander & S. Zhao. 1995.** A highly conserved nuclear gene for low-level phylogenetics: Elongation factor-1 $\alpha$  recovers morphologybased tree for heliothine moths. *Mol. Biol. Evol.* 12: 650-656.
- Choudhary, M., J.E. Strassmann, C.R. Solís & D.C. Queller. 1993.** Microsatellite variation in a social insect. *Biochem Genet.* 31: 87-96.
- Costa-Leonardo, A.M. 2002.** Cupins-praga: Morfologia, biologia e controle. Rio Claro, Divisa.
- Couri, M.S., C.J.E. Lamas, C.C.C. Aires, C.A. Mello-Patiu, V.C. Maia, D.M. Pamplona & P. Magno. 2000.** Diptera da Serra do Navio (Amapá, Brasil): Asilidae, Bombyliidae, Calliphoridae, Micropezidae, Muscidae, Sarcophagidae, Stratiomyiidae, Syrphidae, Tabanidae e Tachinidae. *Rev. Bras. Zool.* 2: 91-100.
- Couri, M.S., G. P. S. Barros & M. P. Orsini. 2008.** Dipterofauna do Arquipélago de Fernando de Noronha (Pernambuco, Brasil). *Rev. Bras. Entomol.* 52(4): 588-590.

- Crosby, T., J. Watt, A. Kistemaker & P. Nelson. 1986.** Entomological identification of the origin of imported *Cannabis*. *Forensic Science Society* 26: 35–44.
- Cruz T.M. 2008.** Diversidade e sucessão ecológica de insetos associados á decomposição animal em um fragmento de Mata Atlântica de Pernambuco. Universidade Federal de Pernambuco, PE. Dissertação de Mestrado. 102p.
- Dahlem G.A. & R.F.C. Naczi. 2006.** Flesh Flies (Diptera: Sarcophagidae) associated with north american pitcher plants (Sarraceniaceae), with descriptions of three new species. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 99: 218-240.
- D’Almeida, J.M. 1984 .** Sinantropia de Sarcophagidae (Diptera) na Região Metropolitana do Estado do Rio de Janeiro. *Arq. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.* 7(2): 101-110.
- D’Almeida, J.M. 1989.** Substratos utilizados para a criação de dípteros caliptratos no Jardim Zoológico do Rio de Janeiro (Rio-Zoo). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz,* 84: 257-264.
- D’Almeida, J.M., M.C. Jourdan & S. Cesario. 1991.** Dípteros Caliptrados Sinantrópicos do Aterro Sanitário de Jardim Gramacho, Rio de Janeiro. *Rev. Brasil. Biol.* 51(2): 307-311.
- D’Almeida, J.M. & R.P. Mello. 1996.** Comportamento de dípteros muscóides frente a substrato de oviposição, em laboratório, no Rio de Janeiro, RJ, Brasil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 91(1): 131-136.
- Danforth B.N. & S. Ji. 1998.** Elongation factor-1 alpha occurs as two copies in bees: implications for phylogenetic analysis of *EF-1a* sequences in insects *Mol. Biol. Evol.* 15: 225–235
- Darwin, C. 1859.** On the origin of species by means of natural selection. J. Murray, London.
- Denno, R.F. & W.R. Cothran. 1976.** Competitive interactions and ecological strategies of Sarcophagid and Calliphorid flies inhabiting rabbit carrion. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 69: 109–113.
- DeSalle R. 1992.** The phylogenetic relationships of flies in the family Drosophilidae deduced from mtDNA sequences. *Mol Phylogenet Evol* 1: 31-40.
- Dias, E.S., D.P. Neves & H.S. Lopes. 1984.** Estudos sobre a fauna de Sarcophagidae (Diptera) de Belo Horizonte – Minas Gerais. I – Levantamento taxonômico e sinantrópico. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 79: 83-91.
- Dodge, H.R. 1955.** Sarcophagid flies parasitic on reptiles. *Proc. Ent. Soc. Washington* 57(4): 183-187.
- Eizemberg R., L.T. Sabagh & R.S. Mello. 2008.** First record of myiasis in *Aplastodiscus arildae* (Anura: Hylidae) by *Notochaeta bufonivora* (Diptera: Sarcophagidae) in the Neotropical area. *Parasitol. Res.* 102(2): 329-331
- Eldridge, B.F. & D.J. Edman. 2004.** Medical Entomology, a text book on public health and veterinary problems caused by arthropods. Revisited edition. Kluwer Academic Publishers, Netherland.
- Erzinçlioglu, Y.Z. 1983.** The application of entomology to forensic medicine. *Med. Sci. Law* 23: 57-63.

- Fang, Q.Q., S. Cho, J.C. Regier, C. Mitter, M. Matthews, R.W. Poole, T.P. Friedlander & S. Zhou. 1997.** A new nuclear gene for insect phylogenetics: dopa decarboxylase is informative of relationships within Heliiothinae (Lepidoptera: Noctuidae). *Syst. Biol.* 46:269–83.
- Ferrar, P. 1987.** A guide to the breeding habits and immature stages of Diptera Cyclorrhapha. Entomonograph vol. 8. E.J. Brill/Scandinavian Science Press. Leiden, Copenhagen.
- Fernandes-Matioli, F.M.C. 2001.** Genealogias e o processo de coalescência. In SR Matioli, *Biologia Molecular e Evolução*, Holos, Ribeirão Preto, p. 162-171.
- Ferreira, M.J.M., 1978.** Sinantropia de dípteros muscóideos de Curitiba, Paraná. I. Calliphoridae. *Rev. Bras. Biol.* 38: 445-459.
- Ferreira, M.J.M. 1979.** Sinantropia de dípteros muscóideos de Curitiba, Paraná. II – Sarcophagidae. *Rev. Bras. Biol.*, 39(4): 773-781.
- Fisher, R.A. 1930.** The genetical theory of natural selection. Clarendon Press, Oxford.
- Fitch, W.M. 1970.** Distinguishing homologous from analogous proteins. *Syst. Zool.* 19: 99-113.
- Fitch, W.M. 2000.** Homology: a personal view on some of the problems. *Trends Genet.* 16(5) :227-31.
- Frati, F., C. Simon, J. Sullivan & D.L. Swofford. 1997.** Evolution of the Mitochondrial Cytochrome Oxidase II Gene in Collembola. *J. Mol. Evol.* 44:145–158.
- Fogel, G.B. & D.W. Corne. 2002.** *Evolutionary Computation in Bioinformatics*, Elsevier Science, San Francisco.
- Gerber, A.S., R. Loggins, S. Kumar & T.E. Dowling. 2001.** Does non-neutral evolution shape observed patterns of DNA variation in animal mitochondrial genomes? *Annu. Rev. Genet.* 35: 539-566.
- Gillot, C. 2005.** *Entomology*. Springer. Netherlands.
- Geenberg, B. 1971.** Flies and disease, Ecology, classification and biotic association. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 83(6): 1210- 1214.
- Guimarães, J.H. & N. Papavero. 1999.** Myiasis in man and animal in the neotropical region. Plêiade/FAPESP. São Paulo.
- Guimarães, H.J.L. 2004.** Redescrição dos machos de dez espécies neotropicais de *Ravinia Rubineau-Desvoidy 1863* (Díptera: Sarcophagidae). *Arquivos do Museu Nacional* 62(1): 45-66.
- Hall, T.A. 1999.** Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series.* 41: 95-98.
- Harvey, M.L., I.R. Dadour & S. Gaudieri. 2003.** Mitochondrial DNA cytochrome oxidase I gene:potential for distinction between immature stages of some forensically important fly species (Diptera) in western Australia. *Forensic Sci. Intern.*, 131: 134-139.
- Hayashi, K. 1991.** PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. *PCR Method Appl.* 1: 34–38.

- Hayat, R., R. Richet, N. Bayrak & G. Pekbey. 2008.** Contributions to the Knowledge of Flesh Flies (Diptera: Sarcophagidae) from Turkey, with a New Record. *Turk. J. Zool.* 32: 385-390.
- Hebert, P.D.N., A. Cywinska, S.L. Ball & J.R. deWaard. 2003.** Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 270: 313 – 322 .
- Hebert, P.D.N., E.H. Penton, J.M. Burns, D.H. Janzen & W. Hallwaches. 2004.** Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101: 14812–14817.
- Hennig, W. 1966.** Phylogenetic Systematics. University of Illinois Press, Urbana.
- Higley L.G. & N.H. Haskell. 2001.** Insect development and forensic entomology. In: Byrd JH, Castner JL (eds) forensic entomology: the utility of arthropods in legal investigations. CRC, Boca Raton, Fla., pp 287–302.
- Hillis D.M. & M.T. Dixon. 1991.** Ribosomal DNA molecular evolution and phylogenetic inference. *Q. Rev. Biol.* 66:411–54.
- Hillis, D.M., C. Moritz & B.K. Mable. 1996.** Molecular Systematics. 2<sup>nd</sup> ed. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland, Massachusetts, U.S.A.
- Hillis, D.M., D.D. Pollock, J.A. McGuire & D.J. Zwickl. 2003.** Is sparse sampling a problem for phylogenetic inference? *Syst. Biol.* 52(1) : 124-126.
- Hudson, R.R. 1991.** Gene genealogies and the coalescent process. in D. Futuyama and J. Antonovics, eds. Oxford surveys in Evolutionary Biology, Vol.7. Oxford Univ. Press, Oxford. p. 1-44
- Hunkapiller T., R.J. Kaiser, B.F. Koop & L. Hood. 1991.** Large-scale and automated DNA sequence determination. *Science.* 254: 59-67
- Infante-Malachias M.E., K.S.C. Yotoko & A.M.L. Azeredo-Spin. 1999.** Random amplified polymorphic DNA of screw worm fly populations (Diptera: Calliphoridae) from Southeastern Brazil and Northern Argentina. *Genome* 42: 772–779.
- Introna, F., C.P. Campobasso & M.L. Goff. 2001.** Entomotoxicology. *Forensic Sci. Int.* 120: 42–47.
- Jeffroy, O., H. Brinkmann, F. Delsuc & H. Philippe. 2006.** Phylogenomics: the beginning of incongruence? *Trends Genet.* 22: 225-231.
- Joseph, L., C. Moritz & A. Hugall. 1995.** Molecular support for vicariance as a source of diversity in rainforest. *Proc. R. Soc. Lond. B* 260: 177-182.
- Junqueira, A.C.M., A.C. Lessinger & A.M.L. Azeredo-Spin. 2002.** Methods for the recovery of mitochondrial DNA sequences from museum specimens of myiasis-causing flies. *Med Vet Entomol* 16 :39-45 .
- Jukes, T.H. & C.R. Cantor. 1969.** Evolution of protein molecules. in Munro, H.N. Mammalian protein metabolism. Academic Press, New York. pp. 21-123.
- Kambhampati, S. 1995.** A phylogeny of cockroaches and related insects based on DNA sequence of mitochondrial ribosomal RNA genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92: 2017-2020.

- Keller, I. & C.R. Largiadér. 2002.** Identification of one Xlinked and five autosomal microsatellite loci in *Carabus violaceus* (Coleoptera, Carabidae) and their applicability to related taxa. *Mol. Ecol. Notes*. 2: 290–292.
- Kim K.S. & T.W. Sappington. 2005.** Genetic structuring of western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae) populations in the U.S. based on microsatellite loci analysis. *Environ. Entomol.* 34:494–503.
- Kimura, M. 1968.** "Evolutionary rate at the molecular level". *Nature* 217: 624–626.
- Kimura, M. 1980.** A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16: 111–120.
- Kimura, M. 1983.** *The Neutral Theory of Molecular Evolution.* Cambridge University Press, Cambridge.
- Kingman, J.F.C. 1982a.** The coalescent. *Stochast. Proc. Appl.* 13: 235-248.
- Kingman, J.F.C. 1982b.** On the Genealogy of Large Populations. *J. Appl. Prob.* 19A: 27-43.
- Kocher, T.D., W.K. Thomas, A. Meyer, S.V. Edwards, S. Paabo, F.X. Villablanca & A.C. Wilson. 1989.** Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 6196-6200.
- LaSalle, J. 1993.** Parasitic Hymenoptera, biological control and biodiversity. In: LaSalle J, Gauld JD (eds) *Hymenoptera and biodiversity.* CAB International, Wallingford, pp 197–215.
- Leandro, M.J.F. & J.M. d'almeida. 2005.** Levantamento de Calliphoridae, Fanniidae, Muscidae e Sarcophagidae em um fragmento de mata na Ilha do Governador, Rio de Janeiro, Brasil. *Iheringia, Ser. Zool.* 95(4):377-381.
- Leão, R.N.Q., H.F. Neto, J.P.N. Cruz & R. Tibana. 1995.** Mífase uretral por *Sarcodexia lambens* (Wiedemann, 1830) (Diptera: Sarcophagidae). Relato de um caso. IV Congresso da Sociedade Brasileira de Parasitologia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.
- Leite, A.C.R. & H.S. Lopes. 1989.** Scanning electron microscopy of the first instar larvae of *Sarcodexia lambens* and *Peckia chrysostoma* (Diptera: Sarcophagidae). *Mem Inst. Oswaldo Cruz* 84(4): 307-309.
- Lin C.P. & B.N. Danforth. 2004.** How do insect nuclear and mitochondrial gene substitution patterns differ? Insights from Bayesian analyses of combined datasets. *Mol. Phylogenet. Evol.* 30: 686–702.
- Linhares, A.X. 1979.** *Sinantropia de dípteros muscóides de Campinas.* Universidade Estadual de Campinas, SP. Dissertação de Mestrado. 129p.
- Linhares, A.X. 1981.** Synanthropy of Calliphoridae and Sarcophagidae (Diptera) in the city of Campinas, São Paulo, Brazil. *Rev. Bras. Entomol.* 25: 189-215.
- Liu, D. & B. Greenberg. 1989.** Immature stages of some flies of forensic importance. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 82: 80-93.

- Liu, H., A.T. Beckenbach. 1992.** Evolution of the mitochondrial cytochrome oxidase II gene among 10 orders of insects. *Mol. Phylog. Evol.* 1:41–52.
- Lopes, H.S. 1938a.** Sobre um interessante novo gênero de Sarcophagidae que apresenta redução dos esternitos abdominais. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 33(3): 433-435.
- Lopes, H.S. 1938b.** Notas sobre Sarcophagidae neotrópicos. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 33(2): 333-348.
- Lopes, H.S. 1943.** Contribuição ao conhecimento das larvas dos Sarcophagidae com especial referência ao esqueleto cefálico (Díptera). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 38(2): 127-163.
- Lopes, H.S. 1945a.** Contribuição ao conhecimento das espécies do gênero *Notochaeta* Aldrich, 1916 (Díptera:Sarcophagidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 42(3): 502-550.
- Lopes, H.S. 1945b.** Contribuição ao conhecimento das espécies do gênero *Oxysacodexia* Townsend. *Bol. Esc. Nac. Vet.* 1: 62-154.
- Lopes, H.S. 1950.** Sobre os gêneros *Boettcheria* Parker, 1914 e *Boettcherimima* n. gen. (Díptera: Sarcophagidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 48: 687-732.
- Lopes, H.S. 1954.** Contribuição ao conhecimento das espécies do gênero *Sarcophagula* Wulp, 1887 (Diptera: Sarcophagidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 52 (3/4): 587-602.
- Lopes, H.S. 1971.** Notes on *Emblemasoma* and *Pessoamyia* (Diptera: Sarcophagidae). *Rev. Bras. Biol.* 31(1): 89-97.
- Lopes, H.S. 1973a.** Two new genera of neotropical Sarcophagidae (Diptera). *Rev. Bras. Biol.* 33(2): 193-199.
- Lopes, H.S. 1973b.** Collecting and rearing Sarcophagid flies (Diptera) in Brazil during forty years. *An. Acad. Bras. Cienc.*, 45: 279-299.
- Lopes, H.S. 1974.** Sarcophagid flies Díptera from Pacatuba, satae of Ceará, Brazil. *Rev. Bras. Biol.* 34(2): 271-294.
- Lopes, H.S. 1980.** On some Sarcophagidae (Diptera) from Pirapora, state of Minas Gerais, Brazil. *Rev. Bras. Biol.* 40(1): 5-8.
- Lopes, H.S. 1982a.** The importance of mandible and clypeal arch of the first instar larvae in the classification of Sarcophagidae (Diptera). *Rev. Bras. Entomol.* 26(3-4): 293-326.
- Lopes, H.S. 1982b.** On *Eumacronychia sternalis* Allen (Diptera: Sarcophagidae) with larvae living on eggs and hatchlings of the East Pacific Green Turtle. *Rev. Bras. Biol.* 42: 425-429.
- Lopes, H.S. 1988.** Old and new neotropical Sarcophagidae (Diptera). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 83(2): 239-251.
- Lopes, H.S. & A.C.R. Leite. 1989.** Morphology of the egg of *Sarcodexia lambens* (Diptera: Sarcophagidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 84(4): 497-500.
- Lopes, H.S. & A.C.R. Leite. 1990.** Scanning electron microscopy of the male genitalia of Sarcophagidae (Diptera). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 85(1): 1-9.

- Lopes, H.S. & A.C.R. Leite. 1991.** Notes on the male genitalia of species of *Ravinia* and *Chaetoravinia* (Diptera: Sarcophagidae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz 86(1): 95-101.
- Lopes, H.S. & M.V. Ferraz. 1991.** A New species of *Sinopiella* (Diptera :Sarcophagidae) from Brasília, DF, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 86(1): 103-105.
- Lopes, H.S. & R. Tibana. 1982.** Sarcophagid flies (Diptera) from Sinop, state of Mato Grosso, Brazil Mem. Inst. Oswaldo Cruz 77(3): 285-298.
- Lopes, H.S. & R. Tibana. 1987.** On *Oxysarcodexia* (Diptera: Sarcophagidae), with descriptions of five new species, key, list and geographic distribution of the species. Rev. Bras. Biol. 47(3): 329-347.
- Lopes, H.S. & R. Tibana. 1988.** On Johnsoniini(Diptera: sarcophagidae), with *Notochaetisca* new name, and descriptions of eight new species. Rev. Bras. Biol. 48(2): 315-332.
- Lopes, H.S. & R. Tibana. 1991.** Sarcophagidae (Diptera) de Roraima, Brasil. Acta Amazônica 21 (único): 151-157.
- Lopes, H.S. & W.G. Downs. 1949.** Contribuição ao conhecimento das espécies do gênero *Acanthodotheca* Townsend (Díptera: Sarcophagidae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz 49 (3/4): 571-603.
- Lord, W. D. & J. R. Stevenson. 1986.** Directory of forensic entomologists. 2 ed. Misc. Publ. Armed Forces Pest Mgt. Board, Washington, D.C, 42 pp.
- Luna, C., M. Bonizzonia, Q. Cheng, A.S. Robinson, S. Aksoy & L. Zheng. 2001.** Microsatellite Polymorphism in Tsetse Flies (Diptera: Glossinidae). J. Med. Entomol. 38(3):376-381.
- Malgorn, Y. & R. Coquoz. 1999.** DNA typing for identification of some species of Calliphoridae of interest in forensic entomology. Forensic Sci. Int., 102: 111-119.
- Malavasi, A., J.S. Morgante & R.A. Zucchi. 1980.** Biologia de ‘moscas-das-frutas’ (Diptera: Tephritidae). I. Lista de hospedeiros e ocorrência. Rev. Bras. Biol. 40: 9-16.
- Malerbo-Souza, D.T., R.H. Nogueira-Couto & L.A. Couto.2003.** Polinização em cultura de laranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck, var. Pera-Rio). Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci. 40(4): 237-242.
- Marchenko, M.I. 2001.** Medicolegal importance of the cadver entomofauna for the determination of the time of death. Forensic Sci. Int. 120 : 89-109.
- Marchiori, C.H. 1997.** Dípteros muscóideos associados a fezes frescas de gado bovino e seus parasitóides, nos municípios de Uberlândia-MG e Itumbiara-GO. Universidade Estadual de Campinas, SP. Tese de doutorado. 110p.
- Marchiori, C.H. & A.X. Linhares. 1999a.** Constância, dominância e frequência mensal de dípteros muscóideos e seus parasitóides (Hymenoptera e Coleoptera) associados a fezes frescas de gado bovino em Uberlândia, MG. An. Soc. Entomol. Brás. 28: 375-387.
- Marchiori, C.H. & A.X. Linhares. 1999b.** Índices Faunísticos e variação mensal de Dípteros Muscóideos e himenópteros parasitóides associados a fezes bovinas. Brazil. J. Ecol. 3: 63-67.

- Marchiori, C.H., E.R. Caldas, K.G.S. Almeida & A.X Linhares. 2003a.** Muscoid dipterous collected from cattle dung pats in pastures in Itumbiara, Goiás, Brazil. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 55: 123-125.
- Marchiori, C.H., L.A. Pereira & O.M. Silva-Filho. 2003b.** Primeiro relato do parasitóide *Pachycrepoideus vindemiae* Rondani (Hymenoptera: Pteromalidae) parasitando pupas *Sarcodexia lambens* Wiedemann (Diptera: Sarcophagidae) no Brasil. *Cienc. Rural*, 33: 173-175.
- Matioli S.R.M & M.R.S. Passos-Bueno. 2001.** Métodos baseados em PCR para análise de polimorfismos de ácidos nucleicos. In SR Matioli, *Biologia Molecular e Evolução*, Holos, Ribeirão Preto, p. 162-171.
- May, R.M. 1990.** How many species. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 330: 293-304.
- McAlpine, J.F & D.M. Wood. 1989.** *Manual of Nearctic Diptera*, Vol. 3. Research Branch, Agriculture Canada, Monograph 32.
- Mello, C.A. 1989.** Uma nova espécie de *Farrimyia* Dodge, 1965 (Díptera: Sarcophagidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 84(4): 373-376.
- Mello-Patiu, C.A. & A.S.P.S. Neto. 2007.** Revisão das duas espécies de *Tapacura* Tibana & Lopes, 1985 (Diptera: Sarcophagidae: Sarcophaginae). *Biota Neotropica* 7(1): 195-198.
- Mégnin, P. 1894.** La faune des cadavres. *Encyclopedie Scientifique des Aide-Memoire*, G. Masson, Gauthier-Villars et fills, Paris.
- Mendes, J. 1991.** Relação entre atratividade por iscas e estágios de desenvolvimento ovariano em fêmeas de dípteros muscóideos sinantrópicos de Campinas, SP. Universidade Estadual de Campinas, SP, Dissertação de Mestrado. 129p.
- Mendes, J. & A.X. Linhares. 1993.** Sazonalidade, preferência por iscas e desenvolvimento ovariano em várias espécies de Sarcophagidae (Diptera). *Rev. Bras. Entomol.* 37: 355-364.
- Mendes, J. & A.X. Linhares. 2002.** Cattle Dung Breeding Diptera in Pastures in Southeastern Brazil: Diversity, Abundance and Seasonality. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 97(1): 37-41.
- Meyer , A. 1994.** Shortcomings of the cytochrome b gene as a molecular marker. *Trends Ecol. Evol.* 9: 278-280.
- Monteiro-Filho, E.L.A. & J.L. Penereiro. 1987.** Estudo da decomposição e sucessão sobre uma carcaça animal numa área do estado de São Paulo. *Rev. Bras. Biol.*, 47: 289-295.
- Moran N.A., M.E. Kaplan, M.J. Gelsey, T.G. Murphy & E.A. Scholes. 1999.** Phylogenetics and evolution of the aphid genus *Uroleucon* based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Syst. Entomol.* 24:85-93.
- Moretti, T.C. 2006.** Artrópodes associados às carcaças de pequenos roedores expostas em área de formação secundária no município de Campinas, SP. Universidade Estadual de Campinas, SP. Dissertação de Mestrado. 86p.

- Moretti, T.C., O.B. Ribeiro, P.J. Thyssen & D.R. Solis. 2008.** Insects on decomposing carcasses of small rodents in a secondary forest in Southeastern Brazil. *Eur. J. Entomol.* 105: 691-696.
- Moritz, C. & D.M. Hillis. 1996.** Molecular Systematics: context and controversies. In *Molecular Systematics*, ed. DM Hillis, C Moritz, BK Mable. Sunderland, MA: Sinauer. 2nd ed.
- Morris, B. 1987.** First reported case of human aural myiasis caused by the flesh fly *Parasarcophaga crassipalpis* (Diptera: Sarcophagidae). *J. Parasitol.* 73(5):1068-1069.
- Mount, D.W. 2001.** Bioinformatics: Sequence and Genome Analysis. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Moura, M.O., C.J.B. Carvalho & E.L.A. Monteiro-Filho. 1997.** A preliminary analysis of insects of medico-legal importance in Curitiba, state of Paraná. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 92: 269-274.
- Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn & H. Erlich. 1986.** Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harbor. Symp. Quant. Biol. 51: 263-273.
- Murphy R.W., J.W. Sites, D.G. Buth & C.H. Haufler. 1996.** Proteins: isozyme electrophoresis. In *Molecular Systematics*, ed. D.M. Hillis, C. Moritz, B.K. Mable, p. 51–120.
- Murray, T.E., U. Fitzpatrick, M.J.F. Brown and R.J. Paxton. 2008.** Cryptic species diversity in a widespread bumble bee complex revealed using mitochondrial DNA RFLPs. *Conserv. Genet.* 9(3): 653-666.
- Nachman, M.W. 1998.** Deleterious mutations in animal mitochondrial DNA. *Genetica* 101/102 : 61-69.
- Nachman, M.W., W.M. Brown, M. Stoneking & C.F. Aquadro. 1996.** Nonneutral mitochondrial DNA variation in humans and chimpanzee. *Genetics* 142: 953-963.
- Nei, 1972.** Genetic distance between populations. *Amer. Naturalist* 106 : 283-292.
- Nei, 1973.** Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70(12) : 3321-3323.
- Nei, M. 1987.** *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia Univ. Press, New York.
- Nelson, L.A., J.F. Wallman & M.L. Dowton. 2007.** Using COI barcodes to identify forensically and medically important blowflies. *Med Vet Entomol* 21: 44-52.
- Noor, A.F. & J.C. Larkin. 2000.** A Re-evaluation of 12S Ribosomal RNA Variability in *Drosophila pseudoobscura*. *Mol. Biol. Evol.* 17(6): 938–941.
- Norris, D.E., A.C. Surtleef, Y.E. Touré & G.C. Lanzaro. 2001.** Microsatellite DNA polymorphism and heterozygosity among field and laboratory populations of *Anopheles gambiae* s.s. (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 38(2): 336-340.
- Nuorteva, P. 1963.** Synantropy of blowflies (Díptera: Calliphoridae) in Finland. *Ann. Ent. Fenn.* 29: 1-49.

- Nuorteva, P. 1977.** Sarcosaprophagous insects as forensic indicators. In: *Forensic medicine: a study in trauma and environmental hazards*. vol. II. W.B. Saunders Company, pp. 1072-1095.
- Oliveira, V.C., J.M. d'almeida, M.J. Paes & A. Sanavria. 2002.** Population Dynamics of Calyptrate Diptera (Muscidae and Sarcophagidae) at the Rio-Zoo Foundation, Riio de Janeiro, RJ, Brazil. *Braz. J. Biol.* 62(2): 191-196.
- Oliveira-Costa, J. 2007.** Entomologia Forense. Quando os insetos são vestígios. Editora Millenium. Campinas, São Paulo.
- Orita, M., H. Iwahana, H. Kanazawa, K. Hayashi & T. Sekiya. 1989.** Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86: 2766-70.
- Otranto, D. & J.R. Stevens. 2002.** Molecular approaches to the study of myiasis causing larvae. *Int. J. Parasitol.* 32: 1345-1360.
- Pamilo, P. & M. Nei. 1988.** Relationships between gene trees and species trees. *Mol. Biol. Evol.* 5: 568-583.
- Pape, T. 1994.** The world *Blaesoxipha* Loew, 1861 (Diptera: Sarcophagidae). *Ent Scand. Suppl.* 45: 1-247.
- Pape, T. 1996.** Catalogue of the Sarcophagidae of the world (Insecta: Diptera). *Memoirs on Entomology, International*, 8: 1-558.
- Patterson, C. 1988.** Homology in classical and molecular biology. *Mol. Biol. Evol.* 5: 603-625.
- Pavel, J. & D. Polvony. 1994.** Results of two years' investigations of heavy metal content in fleshflies and their hosts (Diptera: Sarcophagidae/Annelida: Lumbricidae/Gastropoda: Helicidae). *Entomol. Gen.* 18(3-4): 213-226.
- Palumbi, S.R. 1996.** Nucleic acids II: the polymerase chain reaction. In *Molecular Systematics*, ed. DM Hillis, C Moritz, BK Mable. Sunderland, MA: Sinauer. 2nd ed.
- Pakalniskis, S., J. Rimsaite, R. Sprangauskaite-Bernotiene, R. Butautaite & S. Podenas. 2000.** Checklist of Lithuanian Díptera. *Acta Zoologica Lituanica.* 10(1): 3-58.
- Pimm, S.L., G.J. Russell, J.L. Gittleman & T.M. Brooks. 1995.** The future of biodiversity. *Science.* 269: 347-350.
- Pollock, D.D., D.J. Zwickl, J.A. McGuire & D.M. Hillis. 2002.** Increasing taxon sampling is advantageous for phylogenetic inference. *Syst. Biol.* 51: 664-671.
- Rand, D.M., M.L. Dorfsman & L.M. Kann. 1994.** Neutral and non-neutral evolution of *Drosophila* mitochondrial DNA. *Genetics* 138:741-756.

- Ratcliffe, S.T., D.W. Webb, R.A. Weinziel & H.M. Robertson. 2003.** PCR-RFLP identification of Diptera (Calliphoridae, Muscidae and Sarcophagidae) — a generally applicable method. *J. Forensic Sci.* 48:783–85.
- Reeck, G.R., C. Haën, D.C. Teller, R.F. Doolittle, W.M. Fitch, R.E. Dickerson, P. Chambon, A.C. McLachlan, E. Margoliash, T.H. Jukes & E. Zuckerkandl. 1987.** ‘Homology’ in proteins and nucleic acids: a terminology muddle and a way out of it. *Cell* . 50: 667.
- Ribeiro, N.M.D. 2003.** Comparação entre a decomposição e a sucessão entomológica em carcaças de suínos expostas em área de cerrado e mata ciliar, no Sudeste Brasileiro. Universidade Estadual de Campinas, SP. Dissertação de Mestrado, 64p.
- Roe, A.D. & F.A.H. Sperling. 2007.** Patterns of evolution of mitochondrial cytochrome c oxidase I and II and implications for DNA barcoding. *Mol. Phyl. Evol.* 44: 325-345.
- Roehrdanz, R.L. 1989.** Intraspecific genetic variability in mitochondrial DNA of screwworm fly (*C.hominivorax*). *Biochem. Genet.* 27: 551–559.
- Rosa, T.A. 2007.** Artropodofauna de interesse forense no Cerrado do município de Uberlândia, MG: abundância relativa, diversidade e sucessão entomológica. Universidade Federal de Uberlândia. Dissertação de Mestrado. 84p.
- Rozas, J., J.C. Sánchez-DelBarrio, X. Messeguer & R. Rozas. 2003.** DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19(18): 2496–2497.
- Rozas J. & R. Rozas. 1995.** DnaSP, DNA sequence polymorphism: an interactive program for estimating population genetics parameters from DNA sequence data. *Cabios.* 11(6): 621-625.
- Saigusa, K., M. Takamiya & Y. Aoki. 2005.** Species identification of the forensically important flies in Iwate prefecture, Japan based on mitochondrial cytochrome oxidase gene subunit I (COI) sequences. *Leg. Med.* 7: 175–178.
- Saiki, R.K., S. Scharf, F. Faloona, K.B. Mullis, H.A. Erlich & N. Arnheim. 1985.** Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* 230 (4732): 1350–4.
- Sallé, A., C. Kerdelhué, M. Breton & F. Lieutier. 2003.** Characterization of microsatellite loci in the spruce bark beetle *Ips typographus* (Coleoptera: Scolytinae). *Mol. Ecol. Notes* 3: 336–337.
- Sambrock, J., E.F. Fritsch & T. Maniatis. 1989.** *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* 2<sup>nd</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schroeder, H., H. Klotzbach, S. Elias, C. Augustin & K. Pueschel. 2003.** Use of PCR–RFLP for differentiation of calliphorid larvae (Diptera: Calliphoridae) on human corpses. *Forensic Sci. Int.* 132: 76–81.
- Simon, C., F. Frati, A. Beckenbach, B. Crespi, H. Liu & P. Flook. 1994.** Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 87:651–701.

- Sherman, R.A., M.J.R. Hall & S. Thomas. 2000.** Medicinal maggots: an ancient remedy for some contemporary afflictions. *Annu.Rev. Entomol.* 45: 55-81.
- Shiota, T., Y. Yoshida, S. Hirai & S. Torii. 1990.** Intestinal Myiasis Caused by *Parasarcophaga crassipalpis* (Diptera: Sarcophagidae). *Pediatrics* 85: 215-217.
- Slatkin, M. & W.P. Maddison. 1989.** A cladistic measure of gene flow inferred from the phylogenies of alleles. *Genetics* 123: 603–13.
- Smith, K.G.V. 1986.** A manual of forensic entomology. British Museum Natural History, Cornell University Press, London.
- Souza, A.M. 1993.** Sucessão entomológica na decomposição de carcaça animal, com ênfase nas famílias Calliphoridae e Sarcophagidae (Diptera). Universidade Estadual de Campinas, SP. Dissertação de Mestrado. 96p.
- Souza, A.M. & A.X. Linhares. 1997.** Diptera and Coleoptera of potential forensic importance in southeastern Brazil: relative abundance and seasonality. *Med. Vet. Entomol.* 11: 8-12.
- Souza, A.S.B., F.D. Kirst & R.F. Krüger. 2008.** Insects of forensic importance from Rio Grande do Sul State in southern Brazil. *Rev. Bras. Entomol.* 52: 641-646.
- Sperling F.A.H., G.S. Anderson & D.A. Hickey. 1994.** A DNA-based approach to the identification of insect species used for postmortem interval estimation. *J. Forensic Sci.* 39:418–427.
- Spofford, M.G. & F.E. Kurczewski. 1990.** Comparative larvipositional behaviours and cleptoparaitic frequencies of Nearctic species of Miltogrammini (Diptera: Sarcophagidae). *J. Nat. Hist.* 24: 731-755.
- Stamper, T.I. 2008.** Improving the Accuracy of Postmortem Interval Estimations Using Carrion Flies (Diptera: Sarcophagidae, Calliphoridae and Muscidae). PhD, University of Cincinnati, Arts and Sciences : Biological Sciences. 111p.
- Stevens, J., & R. Wall. 1995.** The use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis for studies of genetic variation in populations of the blowfly *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) in southern England. *Bull. Entomol. Res.* 85(4): 549–555.
- Sukontason, K., K.L. Sukontason & S. Pingjai. 2003.** Scanning electron micorscopy of the third-instar sarcophagid (Diptera: Sarcophagidae) recovered from a mummified human corpse in Thailand. Differentiation of the third Instar of forensically important fly species in Thailand. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo* 45(2):95-98.
- Tajima, F. 1983.** Evolutionary relationship of DNA sequences in finitepopulations. *Genetics* 105: 437-460.
- Tajima, F. 1989.** Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123: 585-595.
- Tamura, K., J. Dudley, M. Nei & S. Kumar. 2007.** MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24(8): 1596–1599.

- Tavares, M.C.H. 2003.** Sucessão faunística de populações de insetos associados à decomposição de carcaças de suínos expostas em diferentes altitudes e condições pluviométricas na reserva florestal da Serra do Japi, Jundiaí, SP. Universidade Estadual de Campinas, São Paulo. Tese de Doutorado. 121p.
- Taylor, D.B., R.D. Petterson Jr. & G.E. Moya-Borja. 1996.** Populations genetics and gene variation in screwworms (Diptera: Calliphoridae) from Brazil. *Biochem. Genet.* 34(1–2): 67–76.
- Thompson J.D., T.J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin & D.G. Higgins. 1997.** The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25: 4876–4882.
- Thyssen, P.J. 2000.** Decomposição e sucessão entomológica em carcaças de suínos (*Sus scrofa* L.) de tamanhos diferentes: estudos em ambiente de mata natural na região de Campinas – SP. Universidade Estadual de Campinas, SP, Dissertação de Mestrado. 85p.
- Thyssen, P.J. 2005.** Caracterização das formas imaturas e determinação das exigências térmicas de duas espécies de califorídeos (Díptera) de importância forense. Universidade Estadual de Campinas, SP. Tese de doutorado. 102p.
- Thyssen, P.J. & A.X. Linhares. 2007.** First description of the immature stages of *Hemilucilia segmentaria* (Diptera: Calliphoridae). *Biol. Res.* 40: 271-280.
- Trauth, S.E. & G.R. Mullen. 1990.** Additional observations on sarcophagid fly infestations of *Sceloporus undulatus* (Sauria: Iguanidae) egg clutches in Arkansas. *Southwest. Nat.* 35:97–98.
- Usher, M.B. & M. Edwards. 1984.** A dipteran from south of the Antarctic Circle: *Belgica antarctica* (Chironomidae) with a description of its larva. *Biol. J.Linnean Soc.* 23(1): 19-31.
- Vanlerberghe-Masutti, F. 1994.** Molecular identification and phylogeny of parasitic wasp species (Hymenoptera: Trichogrammatidae) by mitochondrial DNA RFLP and RAPD markers. *Insect Mol. Biol.* 3:229-237.
- Verves, Y.G. 1989.** Hugo de Souza Lopes and the modern system of Sarcophagidae (Díptera). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 84(4): 529-545.
- Wallman, J.F. & S.C. Donnellan. 2001.** The utility of mitochondrial DNA sequences for the identification of forensically important blowflies (Diptera: Calliphoridae) in southeastern Australia. *Forensic Sci. Int.* 120: 60-67.
- Wallman, J.F., R. Leys & K. Hogendoorn. 2005.** Molecular systematics of australian carrion-breeding blowflies (Diptera: Calliphoridae) based on mitochondrial DNA. *Invertebr. Syst.* 19: 1-15.
- Wang, R., L. Zheng, Y.T. Touré, T. Dandekar, F.C. Kafatos. 2001.** When genetic distance matters: Measuring genetic differentiation at microsatellite loci in whole-genome scans of recent and incipient mosquito species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98: 10769-10774.

- Wells, J.D. & D.W. Williams. 2007.** Validation of a DNA-based method for identifying Chrysomyinae (Diptera: Calliphoridae) used in a death investigation. *Int. J. Legal Med* 121: 1–8.
- Wells, J.D. & J.R. Stevens. 2008.** Application of DNA-Based Methods in Forensic Entomology. *Annu. Rev. Entomol.* 53: 103-120.
- Wells, J.D., N. Lunt & M.H. Villet. 2004.** Recent African derivation of *Chrysomya putoria* from *C. chloropyga* and mitochondrial DNA parphyly of cytochrome oxidase subunit one in blowflies of forensic importance. *Med. Vet. Entomol.* 1: 121–125.
- Wells, J.D., R. Wall & J.R. Stevens. 2007.** Phylogenetic analysis of forensically important *Lucilia* flies based on cytochrome oxidase I sequence: a cautionary tale for forensic species determination. *Int. J. Legal Med.* 121: 229–233.
- Wells, J.D., T. Pape & F.A.H. Sperling. 2001.** DNA-based identification and molecular systematics of forensically important sarcophagidae (diptera). *J. Forensic Sci.* 2001,46(5):1098–1102.
- Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski & S.V. Tingey. 1990.** DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531–36.
- Wolfe, K. 2000.** Robustness - it's not where you think it is. *Nature Genetics.* 25(1): 3-4.
- Wong, J., F. Tripet, J.L. Rasgon, G.C. Lanzaro & T.W. Scott. 2008.** SSCP analysis of scnDNA for genetic profiling of *Aedes aegypti*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 79 (4): 511-517.
- Wright, S. 1931.** Evolution in Mendelian populations. *Genetics.* 16:97-159.
- Wright, S. 1965.** The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution* 19: 395-420.
- Xiong, B. & T.D. Kocher. 1993.** Phylogeny of sibling species of *Simulium venustum* and *Simulium verecundum* (Diptera: Simuliidae) based on sequences of mitochondrial large subunit rRNA gene. *Mol. Phylogenet. Evol.* 2(4): 293-303.
- Yang, Z. 1998.** On the Best Evolutionary Rate for Phylogenetic Analysis. *Syst. Biol.* 47(1) :125-133.
- Yeates, D.K., B.M. Wiegmann, G.W. Courtney, R. Meyer, C. Lambkin & T. Pape. 2007.** Phylogeny and systematics of Diptera: Two decades of progress and prospects. *Zootaxa* 1668: 565–590.
- Zhang, D.X. 2004.** Lepidopteran microsatellite DNA: redundant but promising. *Trends Ecol. Evol.* 19(10): 507-509.
- Zhang, D.X. & G.M. Hewitt. 1996.** Nuclear integrations: challenges for mitochondrial DNA markers. *Trends Ecol. Evol.* 11: 247–251.
- Zehner, R., J. Amendt, S. Schutt, J. Sauer, R. Krettek & D. Povolny. 2004.** Genetic identification of forensically important flesh flies (Diptera: Sarcophagidae). *Int. J. Legal Med.* 118: 245–247
- Zucchi, R.A., S.S. Neto & O. Nakano. 1993.** Guia de identificação de pragas agrícolas. Piracicaba, FEALQ.

**Zuckerkandl, E. & L.C. Pauling. 1965.** Evolutionary divergence and convergence in proteins. Pp. 97-166. In Bryson, V. & H.J. Vogel (eds.), *Evolving genes and proteins*. Academic Press, New York.

7 – APÊNDICES

Seqüências parciais do gene COI obtidas de exemplares da espécie *P. (P.) intermutans* coletados em Mogi-Guaçu (MGU), Campinas (CAM), Jundiaí (JUN), Ubatuba (UBA) e Salvador (SAL) para as análises de diversidade genética e filogenia.

	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
	10	20	30	40	50				
<b>MGU94</b>	CCAATTATAA	TTGGAGGATT	TGGAAATTGA	TTAGTTCCAA	TTATACTAGG				
<b>MGU96</b>	CCAATTATAA	TTGGAGGATT	TGGAAATTGA	TTAGTTCCAA	TTATACTAGG				
<b>CAM84</b>	CCAATTATAA	TTGGAGGATT	TGGAAATTGA	TTAGTTCCAA	TTATACTAGG				
<b>CAM82</b>	CCAATTATAA	TTGGAGGATT	TGGAAATTGA	TTAGTTCCAA	TTATACTAGG				
<b>CAM85</b>	CCAATTATAA	TTGGAGGATT	TGGAAATTGA	TTAGTTCCAA	TTATACTAGG				
<b>CAM80</b>	CCAATTATAA	TTGGAGGATT	TGGAAATTGA	TTAGTTCCAA	TTATACTAGG				
<b>JUN99</b>	CCAATTATAA	TTGGAGGATT	TGGAAATTGA	TTAGTTCCAA	TTATACTAGG				
<b>JUN107</b>	CCAATTATAA	TTGGAGGATT	TGGAAATTGA	TTAGTTCCAA	TTATACTAGG				
<b>MGU91</b>	CCAATTATAA	TTGGAGGATT	TGGAAATTGA	TTAGTTCCAA	TTATACTAGG				
<b>CAM79</b>	CCAATTATAA	TTGGAGGATT	TGGAAATTGA	TTAGTTCCAA	TTATACTAGG				
<b>CAM78</b>	CCAATTATAA	TTGGAGGATT	TGGAAATTGA	TTAGTTCCAA	TTATACTAGG				
<b>CAM83</b>	CCAATTATAA	TTGGAGGATT	TGGAAATTGA	TTAGTTCCAA	TTATACTAGG				
<b>MGU92</b>	CCAATTATAA	TTGGAGGATT	TGGAAATTGA	TTAGTTCCAA	TTATACTAGG				
<b>JUN104</b>	CCAATTATAA	TTGGAGGATT	TGGAAATTGA	TTAGTTCCAA	TTATACTAGG				
<b>JUN106</b>	CCAATTATAA	TTGGAGGATT	TGGAAATTGA	TTAGTTCCAA	TTATACTAGG				
<b>JUN110</b>	CCAATTATAA	TTGGAGGATT	TGGAAATTGA	TTAGTTCCAA	TTATACTAGG				
<b>SAL64</b>	CCAATTATAA	TTGGAGGATT	TGGAAATTGA	TTAGTTCCAA	TTATACTAGG				
<b>SAL62</b>	CCAATTATAA	TTGGAGGATT	TGGAAATTGA	TTAGTTCCAA	TTATACTAGG				
<b>SAL67</b>	CCAATTATAA	TTGGAGGATT	TGGAAATTGA	TTAGTTCCAA	TTATACTAGG				
<b>CAM55</b>	CCAATTATAA	TTGGAGGATT	TGGAAATTGA	TTAGTTCCAA	TTATACTAGG				
<b>MGU97</b>	CCAATTATAA	TTGGAGGATT	TGGAAATTGA	TTAGTTCCAA	TTATACTAGG				
<b>UBA53</b>	CCAATTATAA	TTGGAGGATT	TGGAAATTGA	TTAGTTCCAA	TTATACTAGG				
<b>UBA73</b>	CCAATTATAA	TTGGAGGATT	TGGAAATTGA	TTAGTTCCAA	TTATACTAGG				
<b>UBA71</b>	CCAATTATAA	TTGGAGGATT	TGGAAATTGA	TTAGTTCCAA	TTATACTAGG				
<b>CAM56</b>	CCAATTATAA	TTGGAGGATT	TGGAAATTGA	TTAGTTCCAA	TTATACTAGG				
<b>UBA72</b>	CCAATTATAA	TTGGAGGATT	TGGAAATTGA	TTAGTTCCAA	TTATACTAGG				
<b>SAL63</b>	CCAATTATAA	TTGGAGGATT	TGGAAATTGA	TTAGTTCCAA	TTATACTAGG				
<b>JUN105</b>	CCAATTATAA	TTGGAGGATT	TGGAAATTGA	TTAGTTCCAA	TTATACTAGG				
<b>SAL60</b>	CCAATTATAA	TTGGAGGATT	TGGAAATTGA	TTAGTTCCAA	TTATACTAGG				
<b>UBA69</b>	CCAATTATAA	TTGGAGGATT	TGGAAATTGA	TTAGTTCCAA	TTATACTAGG				
<b>SAL61</b>	CCAATTATAA	TTGGAGGATT	TGGAAATTGA	TTAGTTCCAA	TTATACTAGG				
<b>SAL59</b>	CCAATTATAA	TTGGAGGATT	TGGAAATTGA	TTAGTTCCAA	TTATACTAGG				
<b>UBA70</b>	CCAATTATAA	TTGGAGGATT	TGGAAATTGA	TTAGTTCCAA	TTATACTAGG				
<b>UBA74</b>	CCAATTATAA	TTGGAGGATT	TGGAAATTGA	TTAGTTCCAA	TTATACTAGG				

	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
	60	70	80	90	100		
<b>MGU94</b>	AGCCCCTGAT	ATAGCCTTTC	CTCGAATAAA	TAATATAAGT	TTTTGACTTT		
<b>MGU96</b>	AGCCCCTGAT	ATAGCCTTTC	CTCGAATAAA	TAATATAAGT	TTTTGACTTT		
<b>CAM84</b>	AGCCCCTGAT	ATAGCCTTTC	CTCGAATAAA	TAATATAAGT	TTTTGACTTT		
<b>CAM82</b>	AGCCCCTGAT	ATAGCCTTTC	CTCGAATAAA	TAATATAAGT	TTTTGACTTT		
<b>CAM85</b>	AGCCCCTGAT	ATAGCCTTTC	CTCGAATAAA	TAATATAAGT	TTTTGACTTT		
<b>CAM80</b>	AGCCCCTGAT	ATAGCCTTTC	CTCGAATAAA	TAATATAAGT	TTTTGACTTT		
<b>JUN99</b>	AGCCCCTGAT	ATAGCCTTTC	CTCGAATAAA	TAATATAAGT	TTTTGACTTT		
<b>JUN107</b>	AGCCCCTGAT	ATAGCCTTTC	CTCGAATAAA	TAATATAAGT	TTTTGACTTT		
<b>MGU91</b>	AGCCCCTGAT	ATAGCCTTTC	CTCGAATAAA	TAATATAAGT	TTTTGACTTT		

<b>CAM79</b>	AGCCCCTGAT	ATAGCCTTTC	CTCGAATAAAA	TAATATAAGT	TTTTGACTTT
<b>CAM78</b>	AGCCCCTGAT	ATAGCCTTTC	CTCGAATAAAA	TAATATAAGT	TTTTGACTTT
<b>CAM83</b>	AGCCCCTGAT	ATAGCCTTTC	CTCGAATAAAA	TAATATAAGT	TTTTGACTTT
<b>MGU92</b>	AGCCCCTGAT	ATAGCCTTTC	CTCGAATAAAA	TAATATAAGT	TTTTGACTTT
<b>JUN104</b>	AGCCCCTGAT	ATAGCCTTTC	CTCGAATAAAA	TAATATAAGT	TTTTGACTTT
<b>JUN106</b>	AGCCCCTGAT	ATAGCCTTTC	CTCGAATAAAA	TAATATAAGT	TTTTGACTTT
<b>JUN110</b>	AGCCCCTGAT	ATAGCCTTTC	CTCGAATAAAA	TAATATAAGT	TTTTGACTTT
<b>SAL64</b>	AGCCCCTGAT	ATAGCCTTTC	CTCGAATAAAA	TAATATAAGT	TTTTGACTTT
<b>SAL62</b>	AGCCCCTGAT	ATAGCCTTTC	CTCGAATAAAA	TAATATAAGT	TTTTGACTTT
<b>SAL67</b>	AGCCCCTGAT	ATAGCCTTTC	CTCGAATAAAA	TAATATAAGT	TTTTGACTTT
<b>CAM55</b>	AGCCCCTGAT	ATAGCCTTTC	CTCGAATAAAA	TAATATAAGT	TTTTGACTTT
<b>MGU97</b>	AGCCCCTGAT	ATAGCCTTTC	CTCGAATAAAA	TAATATAAGT	TTTTGACTTT
<b>UBA53</b>	AGCTCCTGAT	ATAGCCTTTC	CTCGAATAAAA	TAATATAAGT	TTTTGACTTT
<b>UBA73</b>	AGCTCCTGAT	ATAGCCTTTC	CTCGAATAAAA	TAATATAAGT	TTTTGACTTT
<b>UBA71</b>	AGCTCCTGAT	ATAGCCTTTC	CTCGAATAAAA	TAATATAAGT	TTTTGACTTT
<b>CAM56</b>	AGCCCCTGAT	ATAGCCTTTC	CTCGAATAAAA	TAATATAAGT	TTTTGACTTT
<b>UBA72</b>	AGCCCCTGAT	ATAGCCTTTC	CTCGAATAAAA	TAATATAAGT	TTTTGACTTT
<b>SAL63</b>	AGCCCCTGAT	ATAGCCTTTC	CTCGAATAAAA	TAATATAAGT	TTTTGACTTT
<b>JUN105</b>	AGCCCCTGAT	ATAGCCTTTC	CTCGAATAAAA	TAATATAAGT	TTTTGACTTT
<b>SAL60</b>	AGCCCCTGAT	ATAGCCTTTC	CTCGAATAAAA	TAATATAAGT	TTTTGACTTT
<b>UBA69</b>	AGCCCCTGAT	ATAGCCTTTC	CTCGAATAAAA	TAATATAAGT	TTTTGACTTT
<b>SAL61</b>	AGCCCCTGAT	ATAGCCTTTC	CTCGAATAAAA	TAATATAAGT	TTTTGACTTT
<b>SAL59</b>	AGCCCCTGAT	ATAGCCTTTC	CTCGAATAAAA	TAATATAAGT	TTTTGACTTT
<b>UBA70</b>	AGCTCCTGAT	ATAGCCTTTC	CTCGAATAAAA	TAATATAAGT	TTTTGACTTT
<b>UBA74</b>	AGCTCCTGAT	ATAGCCTTTC	CTCGAATAAAA	TAATATAAGT	TTTTGACTTT

....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|

110 120 130 140 150

<b>MGU94</b>	TACCTCCAGC	ATTAACCTTA	CTTCTTGTA	GTAGAATAGT	AGAAAATGGG
<b>MGU96</b>	TACCTCCAGC	ATTAACCTTA	CTTCTTGTA	GTAGAATAGT	AGAAAATGGG
<b>CAM84</b>	TACCTCCAGC	ATTAACCTTA	CTTCTTGTA	GTAGAATAGT	AGAAAATGGG
<b>CAM82</b>	TACCTCCAGC	ATTAACCTTA	CTTCTTGTA	GTAGAATAGT	AGAAAATGGG
<b>CAM85</b>	TACCTCCAGC	ATTAACCTTA	CTTCTTGTA	GTAGAATAGT	AGAAAATGGG
<b>CAM80</b>	TACCTCCAGC	ATTAACCTTA	CTTCTTGTA	GTAGAATAGT	AGAAAATGGG
<b>JUN99</b>	TACCTCCAGC	ATTAACCTTA	CTTCTTGTA	GTAGAATAGT	AGAAAATGGG
<b>JUN107</b>	TACCTCCAGC	ATTAACCTTA	CTTCTTGTA	GTAGAATAGT	AGAAAATGGG
<b>MGU91</b>	TACCTCCAGC	ATTAACCTTA	CTTCTTGTA	GTAGAATAGT	AGAAAATGGG
<b>CAM79</b>	TACCTCCAGC	ATTAACCTTA	CTTCTTGTA	GTAGAATAGT	AGAAAATGGG
<b>CAM78</b>	TACCTCCAGC	ATTAACCTTA	CTTCTTGTA	GTAGAATAGT	AGAAAATGGG
<b>CAM83</b>	TACCTCCAGC	ATTAACCTTA	CTTCTTGTA	GTAGAATAGT	AGAAAATGGG
<b>MGU92</b>	TACCTCCAGC	ATTAACCTTA	CTTCTTGTA	GTAGAATAGT	AGAAAATGGG
<b>JUN104</b>	TACCTCCAGC	ATTAACCTTA	CTTCTTGTA	GTAGAATAGT	AGAAAATGGG
<b>JUN106</b>	TACCTCCAGC	ATTAACCTTA	CTTCTTGTA	GTAGAATAGT	AGAAAATGGG
<b>JUN110</b>	TACCTCCAGC	ATTAACCTTA	CTTCTTGTA	GTAGAATAGT	AGAAAATGGG
<b>SAL64</b>	TACCTCCAGC	ATTAACCTTA	CTTCTTGTA	GTAGAATAGT	AGAAAATGGG
<b>SAL62</b>	TACCTCCAGC	ATTAACCTTA	CTTCTTGTA	GTAGAATAGT	AGAAAATGGG
<b>SAL67</b>	TACCTCCAGC	ATTAACCTTA	CTTCTTGTA	GTAGAATAGT	AGAAAATGGG
<b>CAM55</b>	TACCTCCAGC	ATTAACCTTA	CTTCTTGTA	GTAGAATAGT	AGAAAATGGA
<b>MGU97</b>	TACCTCCAGC	ATTAACCTTA	CTTCTTGTA	GTAGAATAGT	AGAAAATGGA
<b>UBA53</b>	TACCTCCAGC	ACTAACCTTA	CTTCTTGTA	GTAGAATAGT	AGAAAATGGA
<b>UBA73</b>	TACCTCCAGC	ACTAACCTTA	CTTCTTGTA	GTAGAATAGT	AGAAAATGGA
<b>UBA71</b>	TACCTCCAGC	ACTAACCTTA	CTTCTTGTA	GTAGAATAGT	AGAAAATGGA
<b>CAM56</b>	TACCTCCAGC	ATTAACCTTA	CTTCTTGTA	GTAGAATAGT	AGAAAATGGG
<b>UBA72</b>	TACCTCCAGC	ATTAACCTTA	CTTCTTGTA	GTAGAATAGT	AGAAAATGGG
<b>SAL63</b>	TACCTCCAGC	ATTAACCTTA	CTTCTTGTA	GTAGAATAGT	AGAAAATGGG
<b>JUN105</b>	TACCTCCAGC	ATTAACCTTA	CTTCTTGTA	GTAGAATAGT	AGAAAATGGG
<b>SAL60</b>	TACCTCCAGC	ATTAACCTTA	CTTCTTGTA	GTAGAATAGT	AGAAAATGGG
<b>UBA69</b>	TACCTCCAGC	ATTAACCTTA	CTTCTTGTA	GTAGAATAGT	AGAAAATGGG
<b>SAL61</b>	TACCTCCAGC	ATTAACCTTA	CTTCTTGTA	GTAGAATAGT	AGAAAATGGG

<b>SAL59</b>	TACCTCCAGC	ATTAACCTTA	CTTCTTGTA	GTAGAATAGT	AGAAAATGGG
<b>UBA70</b>	TACCTCCAGC	ACTAACCTTA	CTTCTTGTA	GTAGAATAGT	AGAAAATGGA
<b>UBA74</b>	TACCTCCAGC	ACTAACCTTA	CTTCTTGTA	GTAGAATAGT	AGAAAATGGA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|  
160 170 180 190 200

<b>MGU94</b>	GCTGGAACAG	GATGAACTGT	TTACCCTCCT	TTATCATCTA	ATATTGCCCA
<b>MGU96</b>	GCTGGAACAG	GATGAACTGT	TTACCCTCCT	TTATCATCTA	ATATTGCCCA
<b>CAM84</b>	GCTGGAACAG	GATGAACTGT	TTACCCTCCT	TTATCATCTA	ATATTGCCCA
<b>CAM82</b>	GCTGGAACAG	GATGAACTGT	TTACCCTCCT	TTATCATCTA	ATATTGCCCA
<b>CAM85</b>	GCTGGAACAG	GATGAACTGT	TTACCCTCCT	TTATCATCTA	ATATTGCCCA
<b>CAM80</b>	GCTGGAACAG	GATGAACTGT	TTACCCTCCT	TTATCATCTA	ATATTGCCCA
<b>JUN99</b>	GCTGGAACAG	GATGAACTGT	TTACCCTCCT	TTATCATCTA	ATATTGCCCA
<b>JUN107</b>	GCTGGAACAG	GATGAACTGT	TTACCCTCCT	TTATCATCTA	ATATTGCCCA
<b>MGU91</b>	GCTGGAACAG	GATGAACTGT	TTACCCTCCT	TTATCATCTA	ATATTGCCCA
<b>CAM79</b>	GCTGGAACAG	GATGAACTGT	TTACCCTCCT	TTATCATCTA	ATATTGCCCA
<b>CAM78</b>	GCTGGAACAG	GATGAACTGT	TTACCCTCCT	TTATCATCTA	ATATTGCCCA
<b>CAM83</b>	GCTGGAACAG	GATGAACTGT	TTACCCTCCT	TTATCATCTA	ATATTGCCCA
<b>MGU92</b>	GCTGGAACAG	GATGAACTGT	TTACCCTCCT	TTATCATCTA	ATATTGCCCA
<b>JUN104</b>	GCTGGAACAG	GATGAACTGT	TTACCCTCCT	TTATCATCTA	ATATTGCCCA
<b>JUN106</b>	GCTGGAACAG	GATGAACTGT	TTACCCTCCT	TTATCATCTA	ATATTGCCCA
<b>JUN110</b>	GCTGGAACAG	GATGAACTGT	TTACCCTCCT	TTATCATCTA	ATATTGCCCA
<b>SAL64</b>	GCTGGAACAG	GATGAACTGT	TTACCCTCCT	TTATCATCTA	ATATTGCCCA
<b>SAL62</b>	GCTGGAACAG	GATGAACTGT	TTACCCTCCT	TTATCATCTA	ATATTGCCCA
<b>SAL67</b>	GCTGGAACAG	GATGAACTGT	TTACCCTCCT	TTATCATCTA	ATATTGCCCA
<b>CAM55</b>	GCTGGAACAG	GATGAACTGT	TTACCCTCCT	TTATCATCTA	ATATTGCCCA
<b>MGU97</b>	GCTGGAACAG	GATGAACTGT	TTACCCTCCT	TTATCATCTA	ATATTGCCCA
<b>UBA53</b>	GCTGGAACAG	GATGAACTGT	TTACCCTCCT	TTATCATCTA	ATATTGCCCA
<b>UBA73</b>	GCTGGAACAG	GATGAACTGT	TTACCCTCCT	TTATCATCTA	ATATTGCCCA
<b>UBA71</b>	GCTGGAACAG	GATGAACTGT	TTACCCTCCT	TTATCCTCTA	ATATTGCCCA
<b>CAM56</b>	GCTGGAACAG	GATGAACTGT	TTACCCTCCT	TTATCATCTA	ATATTGCCCA
<b>UBA72</b>	GCTGGAACAG	GATGAACTGT	TTACCCTCCT	TTATCATCTA	ATATTGCCCA
<b>SAL63</b>	GCTGGAACAG	GATGAACTGT	TTACCCTCCT	TTATCATCTA	ATATTGCCCA
<b>JUN105</b>	GCTGGAACAG	GATGAACTGT	TTACCCTCCT	TTATCATCTA	ATATTGCCCA
<b>SAL60</b>	GCTGGAACAG	GATGAACTGT	TTACCCTCCT	TTATCATCTA	ATATTGCCCA
<b>UBA69</b>	GCTGGAACAG	GATGAACTGT	TTACCCTCCT	TTATCATCTA	ATATTGCCCA
<b>SAL61</b>	GCTGGAACAG	GGTGAAGTGT	TTACCCTCCT	TTATCATCTA	ATATTGCCCA
<b>SAL59</b>	GCTGGAACAG	GATGAACTGT	TTACCCTCCT	TTATCATCTA	ATATTGCCCA
<b>UBA70</b>	GCTGGAACAG	GATGAACTGT	TTACCCTCCT	TTATCCTCTA	ATATTGCCCA
<b>UBA74</b>	GCTGGAACAG	GATGAACTGT	TTACCCTCCT	TTATCATCTA	ATATTGCCCA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|  
210 220 230 240 250

<b>MGU94</b>	TGGAGGAGCA	TCTGTTGATT	TGGCAATTTT	TTCTCTTCAT	TTAGCAGGAA
<b>MGU96</b>	TGGAGGAGCA	TCTGTTGATT	TGGCAATTTT	TTCTCTTCAT	TTAGCAGGAA
<b>CAM84</b>	TGGAGGAGCA	TCTGTTGATT	TGGCAATTTT	TTCTCTTCAT	TTAGCAGGAA
<b>CAM82</b>	TGGAGGAGCA	TCTGTTGATT	TGGCAATTTT	TTCTCTTCAT	TTAGCAGGAA
<b>CAM85</b>	TGGAGGAGCA	TCTGTTGATT	TGGCAATTTT	TTCTCTTCAT	TTAGCAGGAA
<b>CAM80</b>	TGGAGGAGCA	TCTGTTGATT	TGGCAATTTT	TTCTCTTCAT	TTAGCAGGAA
<b>JUN99</b>	TGGAGGAGCA	TCTGTTGATT	TGGCAATTTT	TTCTCTTCAT	TTAGCAGGAA
<b>JUN107</b>	TGGAGGAGCA	TCTGTTGATT	TGGCAATTTT	TTCTCTTCAT	TTAGCAGGAA
<b>MGU91</b>	TGGAGGAGCA	TCTGTTGATT	TGGCAATTTT	TTCTCTTCAT	TTAGCAGGAA
<b>CAM79</b>	TGGAGGAGCA	TCTGTTGATT	TGGCAATTTT	TTCTCTTCAT	TTAGCAGGAA
<b>CAM78</b>	TGGAGGAGCA	TCTGTTGATT	TGGCAATTTT	TTCTCTTCAT	TTAGCAGGAA
<b>CAM83</b>	TGGAGGAGCA	TCTGTTGATT	TGGCAATTTT	TTCTCTTCAT	TTAGCAGGAA
<b>MGU92</b>	TGGAGGAGCA	TCTGTTGATT	TGGCAATTTT	TTCTCTTCAT	TTAGCAGGAA
<b>JUN104</b>	TGGAGGAGCA	TCTGTTGATT	TGGCAATTTT	TTCTCTTCAT	TTAGCAGGAA
<b>JUN106</b>	TGGAGGAGCA	TCTGTTGATT	TGGCAATTTT	TTCTCTTCAT	TTAGCAGGAA



	310	320	330	340	350
<b>MGU94</b>	CGATCTACAG	GAATCACATT	TGACCGAATA	CCTTTATTTG	TTTGATCTGT
<b>MGU96</b>	CGATCTACAG	GAATCACATT	TGACCGAATA	CCTTTATTTG	TTTGATCTGT
<b>CAM84</b>	CGATCTACAG	GAATCACATT	TGACCGAATA	CCTTTATTTG	TTTGATCTGT
<b>CAM82</b>	CGATCTACAG	GAATCACATT	TGACCGAATA	CCTTTATTTG	TTTGATCTGT
<b>CAM85</b>	CGATCTACAG	GAATCACATT	TGACCGAATA	CCTTTATTTG	TTTGATCTGT
<b>CAM80</b>	CGATCTACAG	GAATCACATT	TGACCGAATA	CCTTTATTTG	TTTGATCTGT
<b>JUN99</b>	CGATCTACAG	GAATCACATT	TGACCGAATA	CCTTTATTTG	TTTGATCTGT
<b>JUN107</b>	CGATCTACAG	GAATCACATT	TGACCGAATA	CCTTTATTTG	TTTGATCTGT
<b>MGU91</b>	CGATCTACAG	GAATCACATT	TGACCGAATA	CCTTTATTTG	TTTGATCTGT
<b>CAM79</b>	CGATCTACAG	GAATCACATT	TGACCGAATA	CCTTTATTTG	TTTGATCTGT
<b>CAM78</b>	CGATCTACAG	GAATCACATT	TGACCGAATA	CCTTTATTTG	TTTGATCTGT
<b>CAM83</b>	CGATCTACAG	GAATCACATT	TGACCGAATA	CCTTTATTTG	TTTGATCTGT
<b>MGU92</b>	CGATCTACAG	GAATCACATT	TGACCGAATA	CCTTTATTTG	TTTGATCTGT
<b>JUN104</b>	CGATCTACAG	GAATCACATT	TGACCGAATA	CCTTTATTTG	TTTGATCTGT
<b>JUN106</b>	CGATCTACAG	GAATCACATT	TGACCGAATA	CCTTTATTTG	TTTGATCTGT
<b>JUN110</b>	CGATCTACAG	GAATCACATT	TGACCGAATA	CCTTTATTTG	TTTGATCTGT
<b>SAL64</b>	CGATCTACAG	GAATCACATT	TGACCGAATA	CCTTTATTTG	TTTGATCTGT
<b>SAL62</b>	CGATCTACAG	GAATCACATT	TGACCGAATA	CCTTTATTTG	TTTGATCTGT
<b>SAL67</b>	CGATCTACAG	GAATCACATT	TGACCGAATA	CCTTTATTTG	TTTGATCTGT
<b>CAM55</b>	CGATCTACAG	GAATCACATT	TGACCGAATA	CCTTTATTTG	TTTGATCTGT
<b>MGU97</b>	CGATCTACAG	GAATCACATT	TGACCGAATA	CCTTTATTTG	TTTGATCTGT
<b>UBA53</b>	CGATCTACAG	GAATCACATT	TGACCGAATA	CCTTTATTTG	TTTGATCTGT
<b>UBA73</b>	CGATCTACAG	GAATCACATT	TGACCGAATA	CCTTTATTTG	TTTGATCTGT
<b>UBA71</b>	CGATCTACAG	GAATCACATT	TGACCGAATA	CCTTTATTTG	TTTGATCTGT
<b>CAM56</b>	CGATCTACAG	GAATCACATT	TGACCGAATA	CCTTTATTTG	TTTGATCTGT
<b>UBA72</b>	CGATCTACAG	GAATCACATT	TGACCGAATA	CCTTTATTTG	TTTGATCTGT
<b>SAL63</b>	CGATCTACAG	GAATCACATT	TGACCGAATA	CCTTTATTTG	TTTGATCTGT
<b>JUN105</b>	CGATCTACAG	GAATCACATT	TGACCGAATA	CCTTTATTTG	TTTGATCTGT
<b>SAL60</b>	CGATCTACAG	GAATCACATT	TGACCGAATA	CCTTTATTTG	TTTGATCTGT
<b>UBA69</b>	CGATCTACAG	GAATCACATT	TGACCGAATA	CCTTTATTTG	TTTGATCTGT
<b>SAL61</b>	CGATCTACAG	GAATCACATT	TGACCGAATA	CCTTTATTTG	TTTGATCTGT
<b>SAL59</b>	CGATCTACAG	GAATCACATT	TGACCGAATA	CCTTTATTTG	TTTGATCTGT
<b>UBA70</b>	CGATCTACAG	GAATCACATT	TGACCGAATA	CCTTTATTTG	TTTGATCTGT
<b>UBA74</b>	CGATCTACAG	GAATCACATT	TGACCGAATA	CCTTTATTTG	TTTGATCTGT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|

	360	370	380	390	400
<b>MGU94</b>	AGTAATTACA	GCTTTATTAT	TACTTCCTTC	TTTACCAGTA	C'TTGCCGGAG
<b>MGU96</b>	AGTAATTACA	GCTTTATTAT	TACTTCCTTC	TTTACCAGTA	C'TTGCCGGAG
<b>CAM84</b>	AGTAATTACA	GCTTTATTAT	TACTTCCTTC	TTTACCAGTA	C'TTGCCGGAG
<b>CAM82</b>	AGTAATTACA	GCTTTATTAT	TACTTCCTTC	TTTACCAGTA	C'TTGCCGGAG
<b>CAM85</b>	AGTAATTACA	GCTTTATTAT	TACTTCCTTC	TTTACCAGTA	C'TTGCCGGAG
<b>CAM80</b>	AGTAATTACA	GCTTTATTAT	TACTTCCTTC	TTTACCAGTA	C'TTGCCGGAG
<b>JUN99</b>	AGTAATTACA	GCTTTATTAT	TACTTCCTTC	TTTACCAGTA	C'TTGCCGGAG
<b>JUN107</b>	AGTAATTACA	GCTTTATTAT	TACTTCCTTC	TTTACCAGTA	C'TTGCCGGAG
<b>MGU91</b>	AGTAATTACA	GCTTTATTAT	TACTTCCTTC	TTTACCAGTA	C'TTGCCGGAG
<b>CAM79</b>	AGTAATTACA	GCTTTATTAT	TACTTCCTTC	TTTACCAGTA	C'TTGCCGGAG
<b>CAM78</b>	AGTAATTACA	GCTTTATTAT	TACTTCCTTC	TTTACCAGTA	C'TTGCCGGAG
<b>CAM83</b>	AGTAATTACA	GCTTTATTAT	TACTTCCTTC	TTTACCAGTA	C'TTGCCGGAG
<b>MGU92</b>	AGTAATTACA	GCTTTATTAT	TACTTCCTTC	TTTACCAGTA	C'TTGCCGGAG
<b>JUN104</b>	AGTAATTACA	GCTTTATTAT	TACTTCCTTC	TTTACCAGTA	C'TTGCCGGAG
<b>JUN106</b>	AGTAATTACA	GCTTTATTAT	TACTTCCTTC	TTTACCAGTA	C'TTGCCGGAG
<b>JUN110</b>	AGTAATTACA	GCTTTATTAT	TACTTCCTTC	TTTACCAGTA	C'TTGCCGGAG
<b>SAL64</b>	AGTAATTACA	GCTTTATTAT	TACTTCCTTC	TTTACCAGTA	C'TTGCCGGAG
<b>SAL62</b>	AGTAATTACA	GCTTTATTAT	TACTTCCTTC	TTTACCAGTA	C'TTGCCGGAG
<b>SAL67</b>	AGTAATTACA	GCTTTATTAT	TACTTCCTTC	TTTACCAGTA	C'TTGCCGGAG
<b>CAM55</b>	AGTAATTACA	GCTTTATTAT	TACTTCCTTC	TTTACCAGTA	C'TTGCCGGAG
<b>MGU97</b>	AGTAATTACA	GCTTTATTAT	TACTTCCTTC	TTTACCAGTA	C'TTGCCGGAG

UBA53	AGTAATTACA	GCTTTATTAT	TACTTCTTTC	TTTACCAGTA	CTTGCCGGAG
UBA73	AGTAATTACA	GCTTTATTAT	TACTTCTTTC	TTTACCAGTA	CTTGCCGGAG
UBA71	AGTAATTACA	GCTTTATTAT	TACTTCTTTC	TTTACCAGTA	CTTGCCGGAG
CAM56	AGTAATTACA	GCTTTATTAT	TACTTCTTTC	TTTACCAGTA	CTTGCCGGAG
UBA72	AGTAATTACA	GCTTTATTAT	TACTTCTTTC	TTTACCAGTA	CTTGCCGGAG
SAL63	AGTAATTACA	GCTTTATTAT	TACTTCTTTC	TTTACCAGTA	CTTGCCGGAG
JUN105	AGTAATTACA	GCTTTATTAT	TACTTCTTTC	TTTACCAGTA	CTTGCCGGAG
SAL60	AGTAATTACA	GCTTTATTAT	TACTTCTTTC	TTTACCAGTA	CTTGCCGGAG
UBA69	AGTAATTACA	GCTTTATTAT	TACTTCTTTC	TTTACCAGTA	CTTGCCGGAG
SAL61	AGTAATTACA	GCTTTATTAT	TACTTCTTTC	TTTACCAGTA	CTTGCCGGAG
SAL59	AGTAATTACA	GCTTTATTAT	TACTTCTTTC	TTTACCAGTA	CTTGCCGGAG
UBA70	AGTAATTACA	GCTTTATTAT	TACTTCTTTC	TTTACCAGTA	CTTGCCGGAG
UBA74	AGTAATTACA	GCTTTATTAT	TACTTCTTTC	TTTACCAGTA	CTTGCCGGAG

....|....|....|....|....|..  
                  410                  420

MGU94	CAATTACTAT	ATTATTAACT	GACCGAA
MGU96	CAATTACTAT	ATTATTAACT	GACCGAA
CAM84	CAATTACTAT	ATTATTAACT	GACCGAA
CAM82	CAATTACTAT	ATTATTAACT	GACCGAA
CAM85	CAATTACTAT	ATTATTAACT	GACCGAA
CAM80	CAATTACTAT	ATTATTAACT	GACCGAA
JUN99	CAATTACTAT	ATTATTAACT	GACCGAA
JUN107	CAATTACTAT	ATTATTAACT	GACCGAA
MGU91	CAATTACTAT	ATTATTAACT	GACCGAA
CAM79	CAATTACTAT	ATTATTAACT	GACCGAA
CAM78	CAATTACTAT	ATTATTAACT	GACCGAA
CAM83	CAATTACTAT	ATTATTAACT	GACCGAA
MGU92	CAATTACTAT	ATTATTAACT	GACCGAA
JUN104	CAATTACTAT	ATTATTAACT	GACCGAA
JUN106	CAATTACTAT	ATTATTAACT	GACCGAA
JUN110	CAATTACTAT	ATTATTAACT	GACCGAA
SAL64	CAATTACTAT	ATTATTAACT	GACCGAA
SAL62	CAATTACTAT	ATTATTAACT	GACCGAA
SAL67	CAATTACTAT	ATTATTAACT	GACCGAA
CAM55	CAATTACTAT	ATTATTAACT	GACCGAA
MGU97	CAATTACTAT	ATTATTAACT	GACCGAA
UBA53	CAATTACTAT	ATTATTAACT	GACCGAA
UBA73	CAATTACTAT	ATTATTAACT	GACCGAA
UBA71	CAATTACTAT	ATTATTAACT	GACCGAA
CAM56	CAATTACTAT	ATTATTAACT	GACCGAA
UBA72	CAATTACTAT	ATTATTAACT	GACCGAA
SAL63	CAATTACTAT	ATTATTAACT	GACCGAA
JUN105	CAATTACTAT	ATTATTAACT	GACCGAA
SAL60	CAATTACTAT	ATTATTAACT	GACCGAA
UBA69	CAATTACTAT	ATTATTAACT	GACCGAA
SAL61	CAATTACTAT	ATTATTAACT	GACCGAA
SAL59	CAATTACTAT	ATTATTAACT	GACCGAA
UBA70	CAATTACTAT	ATTATTAACT	GACCGAA
UBA74	CAATTACTAT	ATTATTAACT	GACCGAA