

**Universidade Federal de Pernambuco  
Centro de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Genética**

**Carlos Alberto Santiago Figueirêdo Júnior**

**Diversidade genética de dípteros Calliphoridae de  
importância forense**

**Recife  
2015**

**Carlos Alberto Santiago Figueirêdo Júnior**

**Diversidade genética de dípteros Calliphoridae de  
importância forense**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutor em Genética.

**Orientador:** Dr. Valdir de Queiroz Balbino

**Coorientador:** Dr. José Roberto Pujol-Luz

**Recife**

**2015**

Catálogo na fonte  
Elaine Barroso  
CRB 1728

**Figueirêdo Júnior, Carlos Alberto Santiago**  
**Diversidade genética de dípteros Calliphoridae de importância forense/ Carlos Alberto Santiago Figueirêdo Júnior– Recife: O Autor, 2015.**

**85 folhas : il., fig., tab.**

**Orientador: Valdir de Queiroz Balbino**

**Coorientador: José Roberto Pujol-Luz**

**Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco.**

**Centro de Ciências Biológicas. Ciências Biológicas. Genética 2015.**

**Inclui bibliografia e anexos**

- 1. Genética de populações 2. Díptero 3. Entomologia forense I. Balbino, Valdir de Queiroz (orientador) II. Pujol-Luz, José Roberto (coorientador) III. Título**

**576.58**

**CDD (22.ed.)**

**UFPE/CCB-2015-126**

**Carlos Alberto Santiago Figueirêdo Júnior**

**Diversidade genética de dípteros Calliphoridae de  
importância forense**

**Aprovado em 13/03/2015**

**Banca Examinadora:**

---

**Dr. Valdir de Queiroz Balbino  
Depto. Genética/UFPE**

---

**Dra. Vilma Loreto da Silva  
Depto. Genética/UFPE**

---

**Dra. Manuela Barbosa Rodrigues de Souza  
Depto. Genética/UFPE**

---

**Dr. Wellington Marques da Silva  
Depto. Entomologia/UFRPE**

---

**Dr. Martín Alejandro Montes  
Depto. Biología/UFRPE**

**Recife**

**2015**

## **Agradecimentos**

Agradeço à minha família, especialmente aos meus pais, Carlos e Gilvanete; e à minha esposa, Renata, por todo o amor, carinho, incentivo irrestrito, conforto nas horas difíceis e felicidades em todos os momentos; às minhas irmãs Catharina e Camilla pelo apoio e companheirismo que sempre me propiciaram.

Ao meu orientador Dr. Valdir de Queiroz Balbino pelos ensinamentos, conselhos, paciência, por acreditar em mim e pela amizade.

Ao Dr. José Roberto Pujol-Luz que me acolheu de forma muito generosa em Brasília e por todo suporte que me foi prestado além dos conhecimentos transmitidos.

Aos meus amigos que fizeram parte e os que ainda fazem parte do LABBE, em especial à César, Hercília, Kláudia, Lidiane, Marcus Batista, Marcus Cardoso, Moisés e Tiago, pelos momentos descontraídos e aprendizados vividos tanto dentro do laboratório como fora dele, assim como pela contribuição para a conclusão deste trabalho.

Ao meu amigo de longa data Wellington que me acompanhou ao longo de toda a minha jornada acadêmica e me fazer acreditar sempre.

À todos aqueles que acreditaram em mim e, direta ou indiretamente, contribuíram para a conclusão deste trabalho.

“Somos o que fazemos  
repetidamente, por isso, a excelência  
não é um feito. É um hábito”.

(Aristóteles)

## Resumo

Calliphoridae é uma família de moscas de considerável importância médica e sanitária com espécies que ocorrem em lixos, fezes e carcaças, e também podem atuar como agentes de miíases. Dentro desta família destaca-se a espécie cosmopolita *C. megacephala* que é de grande importância forense, pois se alimentam, cruzam e fazem oviposição sobre os cadáveres. Tendo em vista a importância destes organismos, este estudo visou analisar e desenvolver marcadores genéticos que fossem úteis para identificação molecular de larvas de califorídeos e informativos para estudos de dispersão populacional de *C. megacephala*. Os organismos de estudo foram coletados em quatro localidades do estado de Pernambuco e uma no estado do Ceará. Os espécimes foram identificados e devidamente triados. As PCRs foram realizadas com *primers* amplificadores de marcadores mitocondriais e nuclear descritos na literatura e *primers* desenvolvidos no presente estudo a partir de análises *in silico*. As sequências foram confirmadas por Blastn como pertencentes às espécies correspondentes. As análises genética populacionais de *C. megacephala* indicaram um baixo grau de polimorfismo e conseqüentemente ausência de estruturação nas populações estudadas. Sugerindo que esta espécie foi introduzida no Brasil recentemente, e que não existem barreiras genéticas entre as populações. O resultado das análises *in silico* evidenciaram que o marcador Tag-CYTB, desenvolvido neste estudo fornece resultados mais robustos para taxonomia molecular que o utilizado pelo método barcode para família Calliphoridae.

Palavras-chave: *C. megacephala*; marcadores mitocondriais; estruturação genética.

## Abstract

Calliphoridae is a family of flies of considerable medical and health importance with species that occur in trash, feces and carcasses, and can also act as myiasis agents. Within this family there is the cosmopolitan species *C. megacephala* which is of great forensic importance, since it feeds and make oviposition on the carcasses. Given the importance of these organisms, this study aims to analyze and develop genetic markers that are useful for molecular identification of Calliphoridae larvae for population dispersion studies of *C. megacephala*. All organisms of this study were collected at four localities in Pernambuco state and one locality in Ceará state. The specimens were identified and properly screened. PCRs were performed with *primers* that amplify mitochondrial and nuclear markers described in the literature and with *primers* developed in the present study from *in silico* analyzes. Sequences were confirmed by Blastn as belonging to the relevant species. The population genetic analysis of *C. megacephala* indicated a low degree of polymorphism and consequently lack of structure in the populations studied. This result suggests that this species was introduced in Brazil recently, and that there are no genetic barriers among those populations. *In silico* analysis showed that the marker Tag-CYTB, developed in this study provides more robust results for molecular taxonomy that the ones used by barcode method for Calliphoridae family.

**Key words:** *C. megacephala*; mitochondrial markers; genetic structure.

## Lista de Ilustrações

- Figura 1 Principais dípteros de importância forense. a) Família Calliphoridae. b) Sarcophagidae. c) Muscidae. (Fonte: Byrd e Castner, 2001). 4
- Figura 2 Vista dorsal de um espécime de *Chrysomya megacephala*. 6
- Figura 3 Armadilha utilizada nas coletas. a) Armadilha original proposta por Ferreira (1978). b) Armadilha modificada. Fonte: Ferreira (1978). 23
- Figura 4 Espécies encontradas nos municípios de Brejo da M. de Deus, Tamandaré, Recife, Serra Talhada e Sobral. a) *C. megacephala*. b) *C. albiceps*. c) *C. putoria*. d) *Co. macellaria*. e) *Co. Hominivorax*. f) *Ch ideoidea*. g) *P. eximia* h) *P. cuprina*. i) *H. segmentaria*. j) *H. semidiaphana*. k) *M. bicolor*. 30
- Figura 5 Sequências nucleotídicas do gene COI de *C. megacephala* das populações de Recife, Tamandaré, Brejo da Madre de Deus, Serra Talhada e Sobral. 31
- Figura 6 Elaboração da sequência consenso formada pelos *primer forward* e reverso utilizando o *Staden* 1.6. 32
- Figura 7 Gráfico da distribuição das frequências do número de diferenças pareadas (*Mismatch distribution*) das amostras de *C. megacephala* das populações de Recife, Tamandaré, Brejo da Madre de Deus e Sobral. 38
- Figura 8 Rede de haplótipos mostrando as inter-relações existentes entre os haplótipos de *C. megacephala* das populações de Recife, Tamandaré, Brejo da Madre de Deus, Serra Talhada e Sobral. A circunferência dos haplótipos é proporcional a frequência dos mesmos. Os números em vermelho indicam os sítios onde ocorreram as mutações. 39
- Figura 9 Sequências nucleotídicas do gene ITS2 de *C. megacephala* da população 40

- de Recife.
- Figura 10 Gráfico da distribuição das frequências do número de diferenças pareadas 42  
(*Mismatch distribution*) das amostras de *C. megacephala* da população de Recife.
- Figura 11 Rede de haplótipos mostrando as inter-relações existentes entre os 43  
haplótipos do gene ITS2 de *C. megacephala* da população de Recife. A circunferência dos haplótipos é proporcional a frequência dos mesmos. Os números em vermelho indicam os sítios onde ocorreram as mutações.
- Figura 12 Árvore filogenética das 15 espécies de Dípteros baseada nos 13 genes 46  
mitocondriais (11.196 pb). Topologia determinada por *Neighbor-Joining*.
- Figura 13 Árvore filogenética das 15 espécies de Dípteros baseada no fragmento de 46  
379 pb do gene NAD6. Topologia determinada por *Neighbor-Joining*.
- Figura 14 Árvore filogenética das 15 espécies de Dípteros baseada no fragmento 47  
correspondente ao barcode. Topologia determinada por *Neighbor-Joining*.
- Figura 15 Elaboração da sequência consenso formada pelos *primers* Tag-CYTB 53  
*forward* e reverso utilizando o *Staden* 1.6.
- Figura 16 Gráfico da distribuição das frequências do número de diferenças pareadas 54  
(*Mismatch distribution*) do gene CYTB das amostras de *C. megacephala* da população de Recife.
- Figura 17 Rede de haplótipos mostrando as inter-relações existentes entre os 54  
haplótipos do gene CYTB de *C. megacephala* da população de Recife. A circunferência dos haplótipos é proporcional a frequência dos mesmos. Os números em vermelho indicam os sítios onde ocorreram as mutações.

## Lista de Tabelas

Tabela 1	Levantamento dos califorídeos de importância forense nos municípios pernambucanos de Brejo da Madre de Deus e Tamandaré. FR corresponde às frequências relativas das espécies encontradas.	29
Tabela 2	Levantamento dos califorídeos de importância forense nos municípios pernambucanos de Serra Talhada e Recife. Além do município cearense de Sobral. FR corresponde às frequências relativas das espécies encontradas.	29
Tabela 3	Dados gerais sobre a diversidade genética do marcador COI das populações de <i>C. megacephala</i> dos municípios de Brejo da Madre de Deus, Tamandaré, Recife e Sobral.	35
Tabela 4	Testes de Neutralidade e parâmetros de expansão populacional para cada população de <i>C. megacephala</i> .	37
Tabela 5	Distância genética das 15 espécies de Dípteros baseada no fragmento de 343 pb do gene CYTB. Distância calculada pelo modelo K2P.	48
Tabela 6	Distância genética das 15 espécies de Dípteros baseada no fragmento de 658 pb correspondente ao barcode. Distância calculada pelo modelo K2P.	49
Tabela 7	Especificações dos primers desenvolvidos a partir da análise de entropia.	50
Tabela 8	Dados gerais sobre a diversidade genética dos marcadores COI, ITS2 e CYTB da população de <i>C. megacephala</i> do município de Recife.	53
Tabela 9	Matriz de distância genética para o modelo K2P utilizando o marcador CYTB.	55

## Lista de Abreviaturas

<b>Item</b>	<b>Definição</b>
ATP	Adenosina trifosfato
ATP6	ATP sintetase subunidade 6
ATP8	ATP sintetase subunidade 8
<i>COI</i>	Citocromo oxidase I
<i>COII</i>	Citocromo oxidase II
CR	Região Controle
CYTB	Citocromo oxidase B
FA	Frequência Absoluta
FR	Frequência Relativa
IML	Instituto de Medicina Legal
IPM	Intervalo post-mortem
ITS	Espaçador Transcrito Interno
LABBE	Laboratório de Bioinformática e Biologia Evolutiva
LGMH	Laboratório de Genética Molecular Humana
mtDNA	DNA mitocondrial
NAD1	NADH desidrogenase subunidade I
NAD2	NADH desidrogenase subunidade II
NAD3	NADH desidrogenase subunidade III
NAD4	NADH desidrogenase subunidade IV
NAD4L	NADH desidrogenase subunidade
NAD5	NADH desidrogenase subunidade V

NAD6	NADH desidrogenase subunidade VI
PCR	Reação em cadeia da Polimerase
RAPD	DNA polimórfico amplificado aleatoriamente
RFLP	Polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição
rRNA	RNA ribossomal
tRNA	RNA transportador

## Sumário

<b>Resumo</b>	<i>v</i>
<b>Abstract</b>	<i>vi</i>
<b>Lista de Ilustrações</b>	<i>vii</i>
<b>Lista de Tabelas</b>	<i>ix</i>
<b>Lista de Abreviaturas</b>	<i>x</i>
<b>1. Introdução</b>	1
<b>2. Revisão da Literatura</b>	3
<b>2.1 Entomologia Forense</b>	3
<b>2.2 <i>Chrysomya</i> na região Neotropical</b>	6
<b>2.3 <i>Chrysomya megacephala</i></b>	8
<b>2.4 Aplicações da biologia molecular na Entomologia Forense</b>	10
<b>2.5 Marcadores Mitocondriais</b>	12
<b>2.6 Genômica Mitocondrial de califorídeos</b>	14
<b>2.7 Projeto Barcode</b>	16
<b>2.8 Método de escolha de regiões filogeneticamente informativas</b>	19
<b>3. Objetivos</b>	22
<b>4. Material e Métodos</b>	23
<b>4.1 Calliphoridae</b>	23
<b>4.2 Métodos Moleculares</b>	24

<b>4.3 Bioinformática</b>	<b>25</b>
<b>5. Resultados</b>	<b>28</b>
<b>5.1 Coletas</b>	<b>28</b>
<b>5.2 Análises do gene COI</b>	<b>30</b>
<b>5.3 Análises do gene ITS2</b>	<b>40</b>
<b>5.4 Métodos de seleção de regiões filogeneticamente informativas</b>	<b>43</b>
<b>5.5 Análises do gene CYTB</b>	<b>50</b>
<b>6. Discussão</b>	<b>56</b>
<b>7. Conclusões</b>	<b>64</b>
<b>8. Referências Bibliográficas</b>	<b>65</b>
<b>9. Anexos</b>	<b>75</b>
<b>10. Curriculum lattes</b>	<b>77</b>

## 1. Introdução

Entomologia forense é o ramo da ciência onde a entomologia e o sistema judicial interagem, a fim de elucidar questões litigiosas tais como morte violenta, uso de entorpecentes e inúmeros outros casos que se apresentam à investigação criminal. A análise da sucessão de colonização dos artrópodes em cadáveres permite a associação de cada espécie ou grupo com um estágio de decomposição, uma vez que cada momento da putrefação cadavérica oferece condições e características que atraem um determinado grupo.

Os dípteros são muito bem representados nas primeiras ondas de sucessão, com destaque para as famílias Calliphoridae, Sarcophagidae e Muscidae. Estes dípteros caliptrados também constituem as fontes mais comuns de evidência coletadas durante a investigação criminal dos primeiros grupos de organismos atraídos por um corpo após sua morte. Tanto os califorídeos quanto os muscídeos ovipõem sobre matéria orgânica em decomposição, utilizando este substrato como fonte proteica para si ou para o desenvolvimento das fases imaturas. A atividade destes insetos acelera a putrefação e a desintegração da carcaça.

Os califorídeos são dípteros caliptrados vulgarmente chamados de moscas varejeiras ou de bicheiras. Apresentam distribuição mundial, com a maioria das espécies pertencentes ao Velho Mundo. No Brasil existem pelo menos 17 espécies de interesse forense. Dentre elas destacam-se as do gênero *Chrysomya*, que se encontram adaptadas aos diversos tipos de habitats. Segundo relatos este gênero é oriundo da África e chegou ao Brasil em meados da década de 1970 trazida pelos angolanos refugiados da guerra civil. Dentro deste gênero uma espécie merece atenção por ser dominante em ambientes urbanos,

*Chrysomya megacephala*. Apesar de o gênero ter origem africana, esta espécie em particular é de origem asiática.

O presente trabalho destina-se a avaliar a variabilidade genética de dípteros caliptrados através de marcadores mitocondriais e nucleares.

## **2. Revisão da Literatura**

### **2.1 Entomologia Forense**

Segundo Lord e Stevesson (1986), a entomologia forense se baseia na utilização de artrópodes na solução de crimes, frequentemente aqueles ligados à morte violenta (Hall, 2001). A Entomologia Forense utiliza os insetos encontrados em cadáveres para responder diversas perguntas junto às investigações criminais. Para isso, a correta identificação dos espécimes é fundamental, mas muito complicada de ser realizada em imaturos (Kosmann, 2009).

A análise da sucessão de artrópodes permite a associação de cada espécie ou grupo com um estágio de decomposição, uma vez que cada momento da putrefação cadavérica oferece condições e características que atraem um determinado grupo. Desta forma a sucessão ocorre de acordo com um padrão aparentemente previsível (Oliveira-Costa, 2008). Muitas espécies de artrópodes são atraídas para a carcaça durante o processo de decomposição de um cadáver, contudo nem todas as espécies atraídas correspondem a espécies necrófagas. De tal forma, podemos classificar as espécies que são encontradas na entomofauna em quatro grupos: necrófagas, predadoras ou parasitoides, onívoras e acidentais (Oliveira-Costa, 2008).

As espécies classificadas como necrófagas são aquelas que se alimentam diretamente do substrato em decomposição. Os dípteros e coleópteros são considerados os dois principais grupos de importância forense. A ordem Diptera é muito bem representada nesse padrão de sucessão: Calliphoridae, Sarcophagidae e Muscidae (Figura 1) caracterizam as duas primeiras ondas de

sucessão descritas por Mégnin (1894). Os dípteros atuam preferencialmente nas fases iniciais dos processos de decomposição, atraídos além do odor de putrefação fresca, por estímulos visuais, umidade, pela presença de carnes moles, bem como compostos ricos em amônia e sulfito (Souza, 1994).

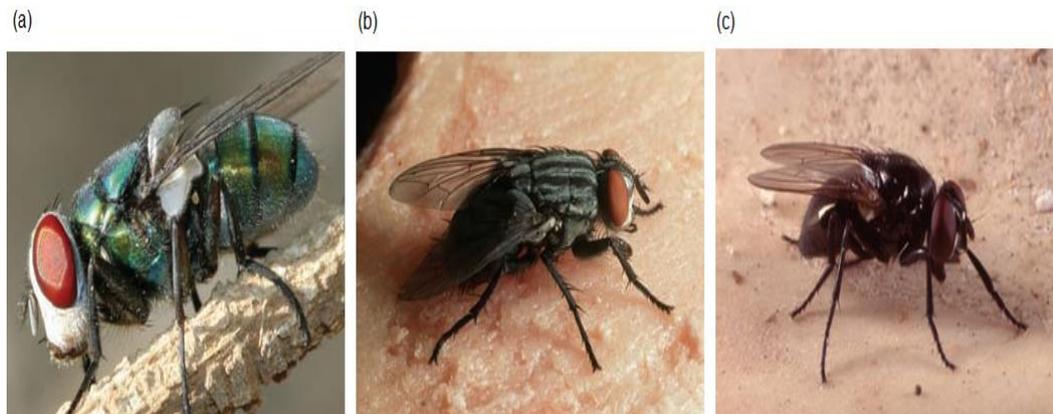


Figura 1: Principais dípteros de importância forense. a) Família Calliphoridae. b) Sarcophagidae. c) Muscidae. (Fonte: Byrd e Castner, 2001).

Estes dípteros caliptrados também constituem as fontes mais comuns de evidência coletadas durante a investigação criminal dos primeiros grupos de organismos atraídos por um corpo após sua morte (Wells e Sperling, 2001; Oliveira-Costa, 2008). Tanto os califorídeos quanto os muscídeos ovipõem sobre matéria orgânica em decomposição, utilizando este substrato como fonte proteica para si ou para o desenvolvimento das fases larvais (Byrd e Castner, 2001). A atividade destes insetos, adultos e larvas, acelera a putrefação e a desintegração da carcaça (Oliveira-Costa, 2008).

Por sua vez, os coleópteros são encontrados nas fases finais do processo de decomposição, atraídos pelos odores decorrentes do processo de fermentação burítica, além do ressecamento do substrato. Existem vários relatos de que coleópteros podem ser encontrados também em fases mais recentes, Cruz e

Vasconcelos (2006) descrevem a presença de Staphylinidae nos primeiros estágios da decomposição, porém, nas fase iniciais os coleópteros tendem a se alimentar dos insetos necrófagos que apareceram para decompor o cadáver, deixando então de atuarem como insetos necrófagos.

As espécies predadoras ou parasitoides encontradas na fauna cadavérica são atraídas pelas espécies que vão colonizar o cadáver, e não pelo substrato em decomposição. Todas as espécies classificadas nesse grupo se alimentam dos ovos, larvas e pupas de outros invertebrados encontrados no substrato cadavérico. Os insetos onívoros são aqueles que podem se alimentar tanto do material em decomposição quanto dos seus colonizadores. É nesse grupo que encontramos os himenópteros. O último dos grupos corresponde a artrópodes que são encontrados de maneira eventual, utilizando a carcaça como uma extensão de seu ambiente, com o intuito de ter abrigo ou alguma proteção, como por exemplo, Lepidópteros e Aracnídeos (Souza, 1994).

Devido a grande diversidade faunística de insetos necrófagos, determinar as espécies encontradas nos cadáveres, é uma etapa crucial neste tipo de investigação, sendo este ponto o primeiro passo para uma análise entomológico-forense, uma vez que o erro nas investigações pode levar à obstrução da justiça (Gerber, 1987). Portanto, a correta identificação da espécie possibilita a estimativa do intervalo pós-morte (IPM - intervalo de tempo entre a exposição do cadáver àquele ambiente e a data em que o mesmo foi encontrado) com um ótimo grau de aproximação, especialmente em cadáveres em estado de decomposição mais avançado (Wells e LaMotte, 2001).

## 2.2 *Chrysomya* na região Neotropical

As espécies do gênero *Chrysomya* são de grande importância médica e sanitária devido a sua ocorrência em lixos, fezes, carcaças e atuam como agentes de miíase em humanos e animais. Até recentemente as moscas *Chrysomya* estavam restritas aos trópicos do Velho Mundo, onde estão entre as moscas varejeiras mais abundantes e importantes economicamente (Baumgatner e Greenberg, 1984).

Atualmente este gênero está bem estabelecido no Novo Mundo através da introdução acidental das espécies *C. megacephala* (Figura 2), *C. albiceps* e *C. putoria*. Os primeiros relatos destas espécies no Brasil foram em duas localidades no Sul do país, por volta do ano de 1975. Este período de introdução coincide com a vinda para o Brasil de angolanos fugidos da guerra civil, muitos dos quais viajaram de navio acompanhados por seus animais domésticos (Guimarães *et al.*, 1978). Desta forma, as moscas do gênero *Chrysomya* se espalharam rapidamente pela América do Sul (Baumgatner e Greenberg, 1984).



Figura 2: Vista dorsal de um espécime de *Chrysomya megacephala*.

As moscas do gênero *Chrysomya* juntamente com outros membros da família Calliphoridae apresentam importância forense potencial, pois elas se alimentam e se reproduzem em cadáveres expostos (Carvalho *et al.*, 2004). A reprodução, dinâmica populacional, variabilidade genética e comportamento das formas introduzidas tem sido alvo de vários estudos (Azeredo-Espin e Lessinger, 2006). Em um estudo realizado por Junqueira *et al.* (2002) foi analisada a utilidade da região controle (CR) do mtDNA como um marcador molecular em análises comparativas temporal e geográficas com amostras brasileiras frescas e preservadas de museus da espécie *C. putoria*. A baixa variabilidade genética detectada para *C. putoria* pode estar relacionada ao *efeito do fundador* decorrente da introdução recente desta mosca no Brasil.

*Chrysomya megacephala* comumente conhecida como a mosca de latrina oriental, é nativa das Regiões Oriental e Australásia (Austrália, Nova Zelândia, Nova Guiné), sendo encontrada também na costa oeste da África, próxima à Cidade do Cabo e a Nigéria, além das Américas Central e do Sul (Azeredo-Espin e Pavan, 1983). Nas últimas décadas esta espécie tem se espalhado pela América do Norte e tornou-se bem estabelecida em Los Angeles (Guimarães e Papavero, 1999).

Por sua vez, *C. albiceps* tem sido registrada na África, sul da Europa, Índia, Arábia e mais recente nas Américas Central e do Sul. As larvas desta espécie e de *C. rufifacies* são comumente conhecidas como vermes peludos por causa das projeções carnudas no seu corpo. Estas espécies estão associadas com miíases na África. A situação taxonômica de *C. albiceps* era dada como incerta, pois era praticamente indistinguível de *C. rufifacies*. Porém, Tantawi e Greenberg (1993)

encontraram algumas características que permitem a diferenciação de ambas às espécies no estágio larval.

*C. rufifacies* é a quarta espécie de *Chrysomya* registrada na região Neotropical, sendo nativa da Australásia e do Pacífico, seu primeiro registro na região Neotropical ocorreu na Costa Rica em 1978, quando foram observadas larvas em cadáveres humanos (Jirón, 1979). Desde então foi registrada a ocorrência desta espécie no México e Estados Unidos (Guimarães e Papavero, 1999). Wells e Sperling (1999) realizaram uma análise baseada no mtDNA, incluindo os genes do citocromo oxidase subunidades I e II para inferência filogenética e divergência genética entre *C. albiceps* e *C. rufifacies*. As amostras foram coletadas de localidades distintas no Novo Mundo, e os resultados foram suficientes para distinguir ambas as espécies que apresentaram um tempo de separação superior a um milhão de anos.

### **2.3 *Chrysomya megacephala***

Dentre os membros do gênero *Chrysomya* destaca-se a espécie *C. megacephala* por apresentar um elevado poder adaptativo, sendo capaz de colonizar diversos ambientes. Seu elevado grau de sinantropismo (Nuorteva, 1963; Iacopini 2006), aliado à presença frequente em substratos em processo de decomposição, tornam essa espécie uma das mais estudadas nas pesquisas de entomologia forense. Essa espécie apresenta ainda importância médico-sanitária uma vez que são também responsáveis por causarem míases e por atuarem como vetores mecânicos de diversos patógenos (D' Almeida e Almeida, 1998; Godoy *et al.*, 1997). Esta espécie possui um ciclo de vida dividido em 4 fases: Ovo, Larva, Pupa e Inseto adulto. A fêmea é comumente realiza a postura de

seus ovos no substrato em decomposição, apresentando uma produção média de duzentos ovos. A larva possui três instares, que possuem duração total de 3 dias, com um período pupal de 3,5 dias.

*Chrysomya megacephala* é natural da Australásia e da Ásia, encontrando-se em franca expansão ao longo do globo, muito em decorrência do fluxo contínuo de animais e pessoas de um continente para o outro. No Continente africano os primeiros relatos da presença de *C. megacephala* ocorreram em Gana e no Senegal (1977), também em 1977, foram encontradas em Capetown (África do Sul), após um levantamento das espécies colonizadoras de carcaças no litoral sul africano (Willians e Villet 2006).

No ano de 1971 a espécie foi depositada no Museu Natal, que posteriormente em 1979 foi identificada por Zumpt, indicando que a espécie teria se dispersado anos antes na África do Sul. Um provável ingresso e dispersão desta espécie pode ter ocorrido graças aos desembarques de pessoas, animais e produtos vindos da República do Maurício (ilha localizada no oceano Índico onde *C. megacephala* é relatada desde 1962) nos portos sul-africanos. Em seguida, esses califórídeos teriam se dispersado rapidamente para o resto do país, já que são capazes de percorrer em menos de uma década mais de 3.000 Km (Willians e Villet, 2006). Os relatos desta espécie no continente europeu são bem recentes, a primeira citação à espécie ocorreu no sudoeste da Espanha em 2001 (Rognes, 2004). Posteriormente, entre 2007 e 2008 Castro e Garcia (2009) identificaram 23 espécimes de *C. megacephala* em Lisboa (Portugal), evidenciando a dispersão de *C. megacephala* através da península ibérica.

Nas Américas, a espécie foi encontrada pela primeira vez no sudeste do Brasil no município de São Paulo. Guimarães *et al.* (1978), informou a introdução

de três espécies do gênero *Chrysomya* no Brasil: *Chrysomya chloropyga*, *Chrysomya albiceps* e *Chrysomya megacephala*, as duas primeiras sendo encontradas nos Estados do Paraná e em São Paulo e a última restrita (na época da publicação) ao Estado de São Paulo. Mesmo apresentando um menor poder de dispersão quando comparada com suas congêneres, *Chrysomya megacephala* apresentou uma maior capacidade adaptativa ao ambiente urbano, concentrando sua população nos Estados de São Paulo e Rio de Janeiro.

#### **2.4 Aplicações da biologia molecular na Entomologia Forense**

A correta identificação das espécies na entomologia forense é o primeiro passo crucial para este tipo de análise. Apenas recentemente a determinação das espécies para esses fins passou a ser realizada rotineiramente através de técnicas de genotipagem (Wells e Stevens, 2008). Espécies cadavéricas relacionadas podem diferir substancialmente nas suas taxas de crescimento (Kamal, 1958), resposta de diapausa (Ash e Greenberg, 1975) ou habitats ecológicos (Kurahashi, 1982). Caracteres anatômicos para o diagnóstico de espécie não são conhecidos para os estágios larvais de muitas espécies de importância forense, além de que as chaves de identificações existentes podem ser incompletas ou difíceis de serem usadas pelos não especialistas.

Devido a dificuldade de identificar as larvas, Sperling *et al.* (1994) foram os pioneiros na ideia de utilizar um teste diagnóstico de espécies baseado na análise de DNA para essa finalidade (Wells e Williams, 2007). Este tipo de abordagem é útil em outras áreas da ciência forense, no qual a identificação de amostras de tecidos auxilia no reforço de leis da conservação e no combate a caça ilegal (Dizon *et al.*, 2000), fraude de alimentos de alto valor (Bottero *et al.*, 2002),

identificação de conteúdos estomacais de cadáveres (Zehner *et al.*, 1998), e situações em que é necessário distinguir humanos de não humanos (Branicki *et al.*, 2003).

Assim como acontece na sistemática molecular da maioria dos animais, o mtDNA desempenha um importante papel no estudo genômico dos insetos (Avisé, 2000). O grande número de cópias, haploidia, e a disponibilidade de *primers* conservados e bem estabelecidos por Simon *et al.* (1994) facilitam a obtenção de dados de sequências de muitas espécies de insetos não estudados anteriormente (Wells e Stevens, 2008). Isto resultou na geração de grande quantidade de dados de sequências mitocondriais (Caterino *et al.*, 2000), e muitos trabalhos sobre insetos forense focaram em algumas porções dos genes que codificam as subunidades I e II da citocromo oxidase - COI e COII (Vincent *et al.*, 2000; Wallman *et al.*, 2005).

A extremidade 5' do gene COI foi proposta como o núcleo do sistema de bioidentificação para animais no projeto DNA barcode (Herbert *et al.*, 2003). Contudo, não existe um acordo sobre um único locus utilizado em análises de DNA capaz de identificar espécies de importância forense, dificultando a confiabilidade em análises baseadas em locus únicos, assim como foi demonstrada em alguns trabalhos (Wells *et al.*, 2007). Outros genes alvos foram sugeridos além de COI e COII, incluindo a técnica do DNA polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD), o gene para o rRNA 28S, as regiões ribossômicas do espaçador transcrito interno (ITS), e o gene que codifica a subunidade 5 da enzima NADH desidrogenase (Wells e Stevens, 2008).

A maioria dos métodos baseados em DNA propostos para identificação de insetos de importância forense tem usado sequenciamento direto ou técnicas de

polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP). Outros métodos de diagnóstico tais como pirosequenciamento, análises de heterodúplex, reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real, ou microarranjos são utilizados em diversos estudos dos mais variados táxons, sendo assim os métodos mais promissores para a entomologia forense (Wells *et al.*, 2007).

## 2.5 Marcadores Mitocondriais

Mitocôndrias são organelas celulares que são responsáveis pela produção de adenosina trifosfato (ATP), apoptose e doenças, e possuem no seu interior centenas ou milhares de cópias de um genoma circular haploide de herança materna que é independente do genoma nuclear. Os genes mitocondriais são geralmente escolhidos para estudos evolutivos por serem herdados clonalmente, cópia única, não sofrem recombinação e são abundantes. Desta forma, os genes mitocondriais são menos suscetíveis à homogeneização gênica interespecífica (Wilson *et al.* 1985). O mtDNA tem sido amplamente usado para estudos taxonômicos, genético populacionais e evolutivos tanto em mamíferos como em artrópodes, por causa do fácil isolamento e sequências conservadas que tornam possíveis o uso de *primers* universais (Otranto e Stevens, 2002).

Outra característica que confere vantagem na utilização de marcadores mitocondriais se refere ao seu pequeno tamanho e sua simples estruturação, quando comparado ao genoma nuclear: apresenta somente 37 genes e possui 17 kb, o que corresponde a uma porcentagem ínfima do comprimento total do DNA nuclear em metazoários (Awise, 1991). O mtDNA apresenta ainda estrutura circular fita dupla que é covalentemente fechada, geralmente não sofrem eventos

de macromutações na maioria dos metazoários, e possuem taxas de mutações até 10 vezes maiores do que genes nucleares de cópia única (Brown e Simpson 1982). Essa elevada taxa de mutação acarreta em uma maior chance da geração de marcadores espécie-específica (Harrison, 1989).

Os maiores genomas mitocondriais são produtos de duplicações de porções do mtDNA em vez de variações no conteúdo gênico (Boore, 1999). A primeira espécie de metazoário a ter o genoma mitocondrial completamente sequenciado foi *Homo sapiens sapiens*. O conteúdo gênico do mtDNA foi analisado e apresentou dois RNAs ribossomais (rRNA) 16S e 12S, 22 RNAs transportadores (tRNA) necessários para a tradução das proteínas codificadas pelo mtDNA, e 13 regiões codificantes. Destas 13 regiões, seis foram identificadas como codificantes de enzimas ou componentes envolvidos na fosforilação oxidativa: citocromo b, citocromo c subunidades I-III, ATPase 6 e ATPase 8. Os sete genes restantes codificam subunidades do complexo NADH desidrogenase (ND1-ND6 e ND4L).

Todos os 37 genes que foram encontrados no mtDNA dos animais, apresentaram homólogos no mtDNA de plantas, fungos e protistas (Boore, 1999). O mtDNA também contém uma região única não codificante que é sabida ter elementos de controle para replicação e transcrição. A principal região não codificante do mtDNA nos vertebrados é chamada de região controle ou D-loop. Os invertebrados possuem uma região não codificante similar a dos vertebrados. Por sua vez essa região é chamada de região rica em A+T, devido a sua alta proporção das bases adenina e timina (Benecke e Wells, 2001).

Vários estudos direcionados para o mtDNA de espécies de *Drosophila* mostraram que os mesmos genes estão presentes nos mamíferos, porém seus

arranjos podem diferir (Wolstenholme e Clary, 1985). Muito do conhecimento do genoma mitocondrial de insetos é derivado do mapa gênico de *Drosophila yakuba*, que foi a primeira espécie de invertebrado a ter o mtDNA completamente sequenciado (Clary e Wolstenholme, 1985). Em uma análise de 12 espécies de *Drosophila*, foi encontrado um alto nível de conservação do genoma mitocondrial, sem rearranjos (Montooth *et al.*, 2009).

Os principais trabalhos de biologia molecular utilizando marcadores mitocondriais para família Calliphoridae abordam três áreas de interesse: genética de populações, filogenia e identificação de espécies (Azeredo-Espin e Lessinger, 2006). Análises de variabilidade genética foram realizadas utilizando marcadores como o RFLP do mtDNA para populações de *Cochliomyia hominivorax* (Infante and Azeredo-Espin, 1995), e populações de *C. macellaria* (Valle e Azeredo-Espin, 1995) assim como o PCR-RFLP da região COI-COII do genoma mitocondrial (Lyra *et al.*, 2005), sequências das regiões de controle, COI e COII (Fresia *et al.*, 2011) e RAPD (Infante-Malachias *et al.*, 1999). Sequências da região COI também foram utilizadas para análises de variabilidade genética em populações de *C. megacephala* da Malásia (Vern e Chua, 2010).

## **2.6 Genômica Mitocondrial de califorídeos**

A caracterização de genomas mitocondriais completos é bem estabelecida dentre os vertebrados, mas não tão bem estabelecida entre os invertebrados. Uma das razões para isso é que muitas das espécies de invertebrados são relativamente pequenas, dificultando a obtenção de quantidade suficiente de mtDNA purificado para o sequenciamento por exigir um grande número de indivíduos (Hwang *et al.*, 2001). Porém com o advento de novas tecnologias e

novas técnicas é possível obter a amplificação do genoma mitocondrial completo de um único indivíduo, em poucos fragmentos, a partir de pequenas quantidades de DNA. Tais abordagens permitem a geração de informações sobre o genoma mitocondrial de muitos invertebrados. Por sua vez esses genomas mitocondriais podem ser utilizados em diversos estudos de evolução molecular, genética de populações, filogenia molecular, RFLP e análise de rearranjos gênicos (Nelson et al., 1996; Hwang et al., 2001). Portanto, o estabelecimento de uma metodologia otimizada para a amplificação completa do mtDNA por “long-PCR” de diferentes invertebrados é de extrema importância para o desenvolvimento e aplicação da genômica mitocondrial em estudos genético-evolutivos destes organismos.

A família Calliphoridae é de grande importância por se destacar como representante de espécies-praga e de importância médica, sanitária e forense. Sendo assim, a obtenção de sequências do mtDNA é de fundamental importância para o esclarecimento de relações evolutivas deste grupo, uma vez que as revisões taxonômicas desta família foram feitas basicamente com dados morfológicos (Rognes, 1997) e apresentam algumas divergências de filogenias obtidas com dados moleculares (Wallman *et al.*, 2005).

A disponibilidade de sequências completas do mtDNA de califorídeos permite a análise e comparação dos diferentes genes mitocondriais num contexto evolutivo, visando caracterizar comparativamente estes genomas e contribuindo para a elucidação dos diferentes padrões de organização desta molécula não só na família Calliphoridae como também na ordem Diptera. Da mesma maneira, torna-se possível avaliar reconstruções filogenéticas a partir de genes individuais e do concatenado das sequências nucleotídicas e de aminoácidos, criando

critérios comparativos para utilizar as diferentes partições de dados para reconstruções filogenéticas (Junqueira, 2008).

Com o sequenciamento de genomas mitocondriais de califorídeos, é possível acessar o conteúdo de bases nas diferentes fitas codificadoras, a utilização preferencial de códons, a relação entre transições e transversões, a frequência de aminoácidos, a quantidade de substituições sinônimas e não-sinônimas, criando embasamento para a escolha de sequências para estudos evolutivos. A caracterização molecular dos diferentes genes, associada à utilização de diferentes algoritmos para reconstrução de árvores, pode indicar se todos ou a maioria deles apontam para uma mesma topologia. Deste modo, pode-se inferir se as relações obtidas estão sendo geradas por um sinal filogenético e não por um ruído. A geração de sequências do genoma mitocondrial de espécies de califorídeos ainda pode esclarecer a ocorrência de uma duplicação gênica do tRNA<sup>Ala</sup> encontrada nas espécies *C. putoria*, *C. megacephala* e *C. albiceps* (Lessinger *et al.*, 2004), ajudando no diagnóstico molecular de espécies de importância forense, além de contribuir nos estudos a respeito dos rearranjos e duplicações no mtDNA de insetos.

## **2.7 Projeto Barcode**

No início dos anos 2000 foi desenvolvido um projeto que visava o desenvolvimento de um sistema universal para identificação de todos os seres eucarióticos baseado em uma abordagem molecular padronizada (Miller, 2007). A esta iniciativa foi dado o nome de “Projeto do Código de Barras da Vida” (The Barcode of Life Project – Hebert *et al.* 2003), que foi iniciada em 2003 por pesquisadores da Universidade de Guelph, no Canadá

(<http://www.barcoding.si.edu>) e foi promovido a partir de 2004 através do Consortium for the Barcoding of Life (CBOL).

A padronização do DNA Barcode consiste em uma região de 648pb do gene COI (tendo como referência o genoma mitocondrial de *Mus musculus* Linnaeus, 1758), apresentando as premissas que a variação interespecífica é bem mais elevada que a intraespecífica (esta de até 3%) e que toda espécie deve conter um 'código de barras' único (Hebert *et al.* 2003). Este código de barras é representado por uma sequência bastante curta, quando comparada ao genoma inteiro. Desta forma podendo ser obtida de um modo relativamente rápido e barato. A padronização de técnicas geralmente diminui custos e aumenta a confiabilidade, resultando em maior difusão e uso (Stoeckle *et al.* 2005).

O gene COI foi escolhido devido alguns fatores que contribuíram para sua utilização em tal abordagem. Dentre as vantagens do gene destaca-se o fato do mesmo ser flanqueado por sequências conservadas, o que o torna relativamente fácil de ser isolado e analisado; outra vantagem são os iniciadores universais para este gene que são bem estabelecidos, permitindo a amplificação do mesmo em quase todos os filos animais (Awise, 1991; Simon *et al.* 1994). O gene COI possui um sinal filogenético maior que os demais genes mitocondriais além de possuir maior variação na terceira posição de seus códons, ainda que mudanças nas sequências de aminoácidos ocorram mais lentamente que nos demais genes do mtDNA (Sahls e Nyblom, 2000).

O projeto do código de barras da vida tem como principais finalidades possibilitar a identificação de espécimes em nível específico e facilitar a descoberta de novas espécies. Esta abordagem vem auxiliar a identificação de organismos – sobretudo os crípticos e microscópicos – cujos caracteres

morfológicos diagnósticos sejam inexistentes ou de difícil visualização (Hebert *et al.* 2003). A proposta é de que qualquer pessoa, em qualquer lugar, a qualquer momento, seja apta a identificar rapidamente e com eficiência a espécie de um determinado espécime (Stoeckle *et al.* 2005).

O CBOL é uma iniciativa internacional que busca desenvolver o DNA Barcode como um padrão global em taxonomia, sendo uma colaboração entre museus de história natural, herbários, coleções biológicas e instituições que realizam inventários da biodiversidade. O Consórcio busca promover a rápida compilação de dados de DNA Barcode de alta qualidade em um banco de dados público de sequências de DNA; o desenvolvimento de novos instrumentos e procedimentos que tornem a proposta cada vez mais barata, rápida e com facilidade de transporte; a participação de taxônomos e centros de pesquisas em taxonomia em todas as regiões e países; bem como o uso do DNA Barcode para o benefício da ciência e sociedade (Kosmann, 2009).

Com a grande massa de dados gerados e a necessidade de uma rápida compilação dos dados foi desenvolvida uma ferramenta de bioinformática denominada de Barcode of Life Data Systems (BOLD) que é uma plataforma integradora de todas as fases, desde a coleta do espécime até a validação da sequência do mesmo como dado de barcode (Ratnasingham e Hebert, 2007). O BOLD, além de 'abrigar' as sequências, garante a qualidade das mesmas e realiza a análise dos dados de barcode. A plataforma usa o "*Hidden-Markov Model*" para alinhar um fragmento de DNA ao banco de dados da COI e seleciona a sequência mais similar para identificação (Ratnasingham e Hebert 2007). Ele ainda é um veículo para colaboração entre grupos de pesquisa do mundo todo, uma vez que é totalmente digitalizado (Ratnasingham e Hebert 2007). Apesar da

plataforma armazenar todos os dados do barcode, uma cópia de cada sequência depositada no mesmo e diagnose do espécime são enviados para o *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) ou outros bancos de dados genômicos (DNA Data Bank of Japan – DDBJ, European Molecular Biology Laboratory – EMBL) assim que os dados estejam prontos para publicação (Kosmann, 2009).

Para que as sequências depositadas ganhem o status de barcode, devem ser obedecidos uma série de critérios: nome da espécie; dados do material testemunho (número e instituição de depósito); dados de coleta (nome do coletor, data e local da coleta com coordenadas geográficas); nome do identificador do espécime; sequência da COI com, no mínimo, 500 pb; iniciadores utilizados na reação de PCR; eletroferogramas (Ratnasingham e Hebert, 2007). Os maiores obstáculos encontrados na completa aplicação do DNA Barcode são: grupos com baixa diversidade gênica em suas sequências, resolução de espécies que divergiram recentemente, detecção de híbridos e os pseudogenes nucleares (Stoeckle *et al.*, 2005).

## **2.8 Método de escolha de regiões filogeneticamente informativas**

A maioria das abordagens de inferência filogenética é baseada em um alinhamento de sequências homólogas (por exemplo DNA, RNA ou aminoácidos), o qual pretende destacar as substituições que ocorreram durante o processo evolutivo a partir de uma sequência ancestral comum. A qualidade de um alinhamento múltiplo pode ter um impacto grande sobre a precisão da árvore filogenética inferida, independente da escolha do método utilizado para a filogenia (Ogden and Rosenberg, 2006; Wang *et al.*, 2009).

Apesar das constantes melhorias dos alinhamentos heurísticos de múltiplas sequências (Notredame, 2007), um alinhamento pode conter regiões, ou seja, conjuntos de caracteres contíguos, muitas vezes também chamados de blocos (Talavera and Castresana, 2007), onde a homologia é ambígua. Além disso, regiões muito divergentes (mesmo quando corretamente alinhadas) podem induzir um efeito de saturação mutacional, que é uma importante fonte de viés para muitos métodos de reconstrução filogenética. Nem todos os alinhamentos de sequências homólogas são úteis para a reconstrução filogenética, pois as sequências não devem ser tão semelhantes, que sejam desprovidas de informação filogenética, e também não podem ser muito divergentes, que muitas posições estejam saturadas por várias substituições (Castresana, 2000). A fim de minimizar o viés introduzido por essas zonas de atrito, uma abordagem comum consiste em detectá-las e removê-las do alinhamento múltiplo antes de realizar a análise filogenética (Huerta-Cepas *et al.*, 2008). A remoção de tais regiões permite que as árvores inferidas sejam mais acuradas, quando realizada de modo arbitrário, gera dificuldade para outros pesquisadores reproduzir os mesmos alinhamentos finais (Criscuolo and Gribaldo, 2010).

A utilização de um método computadorizado reduz em certa medida a necessidade de editar manualmente alinhamentos múltiplos, automatiza a análise filogenética de grandes conjuntos de dados viáveis e facilita a reprodução do alinhamento final por outros pesquisadores. Um desses métodos computacionais pode ser encontrado no software GBLOCKS (Castresana, 2000), que baseia-se na seleção de posições homólogas que preenchem um conjunto de requisitos simples, levando em consideração o número de posições conservadas, a

quantidade de gaps e a variabilidade dos sítios que flanqueiam as posições conservadas.

Outro método computacional, encontrado no programa DAMBE (Xia e Xie, 2001), utiliza a metodologia de entropia da informação, desenvolvida por Shannon (1948). Baseia-se na seleção de posições homólogas com a finalidade de se retirar as posições com alto valor de divergência, tornando o alinhamento final mais adequado para a análise filogenética. Quanto mais divergentes forem as sequências, maior será o percentual de posições removido. A entropia é calculada para cada posição utilizando a fórmula que segue abaixo:

$$H_i = - \left( \sum_{j=1}^4 p_j \log_2 p_j \right)$$

onde  $j = 1, 2, 3, 4$ , corresponde aos nucleotídeos A, C, G e T, e  $p_j$  é a proporção de nucleotídeo  $j$  no site  $i$ . O valor de  $H_i$  é dois, quando as frequências dos quatro nucleotídeos em uma posição são iguais, e zero quando o sítio é completamente conservado, com a ocorrência de uma única base.

Esse método já mostrou-se eficiente quando trabalhado com diferentes taxons. Os resultados obtidos por Batista *et al* (2011) para Papilomavírus; Santos (2012) para Arthropoda e Rocha (2013) para Lepidoptera indicam que a abordagem de entropia pode selecionar com sucesso regiões do genoma que são bons marcadores para inferir as relações filogenéticas, usando menos tempo de processamento.

### **3. Objetivos**

#### **Geral**

Avaliar a variabilidade genética de marcadores mitocondriais e nucleares, utilizando como modelo dípteros da família Calliphoridae.

#### **Específicos**

1. Fazer o levantamento das espécies de califorídeos mais abundantes nas localidades estudadas.

2. Avaliar a eficácia do fragmento do gene COI (DNA *Barcode*) nos estudos populacionais de *Chrysomya megacephala*, e inferir sobre o padrão de introdução desta espécie em Pernambuco.

3. Analisar os níveis de divergência genética entre populações naturais de *Chrysomya megacephala* de Recife-PE, Tamandaré-PE, Brejo da Madre de Deus-PE, Serra Talhada-PE e Sobral-CE, tomando como base a análise de polimorfismos do gene COI.

4. Identificar os padrões de estruturação genética das populações de *Chrysomya megacephala* de Recife-PE, Tamandaré-PE, Brejo da Madre de Deus-PE, Serra Talhada-PE e Sobral-CE, mediante o emprego de modelos matemáticos bem estabelecidos na genética de populações.

5. Identificar e analisar regiões filogeneticamente informativas que possam ser adotadas como marcadores para identificação de espécies da família Calliphoridae, além de compará-los com os marcadores descritos na literatura.

## 4. Material e Métodos

### 4.1 Calliphoridae

Os espécimes utilizados neste trabalho foram coletados dos municípios pernambucanos de Recife, Tamandaré, Brejo da Madre de Deus e Serra Talhada, além do município cearense de Sobral. As coletas foram realizadas durante o ano de 2010, tendo como substrato vísceras de *Sus scrofa domesticus*. A isca foi acondicionada no interior da armadilha do tipo Ferreira (1978) modificada (Figura 3). As armadilhas foram deixadas nos pontos de coleta por 72 horas, amarradas em galhos de árvores e mantidas à cerca de 1 metro do chão. Algumas larvas foram coletadas em cadáveres no Instituto de Medicina Legal de Pernambuco (IML), e outras foram gentilmente cedidas e previamente identificadas pelo Dr<sup>o</sup> José Roberto Pujol-Luz da Universidade de Brasília. No intuito de evitar danos à morfologia dos dípteros que poderiam prejudicar a sua posterior identificação, foi utilizado acetato de etila, substância com baixa toxicidade para o homem e efetiva contra os insetos pelo tempo necessário até sua morte. Posteriormente os espécimes foram acondicionados em tubos individuais com álcool a 70%.

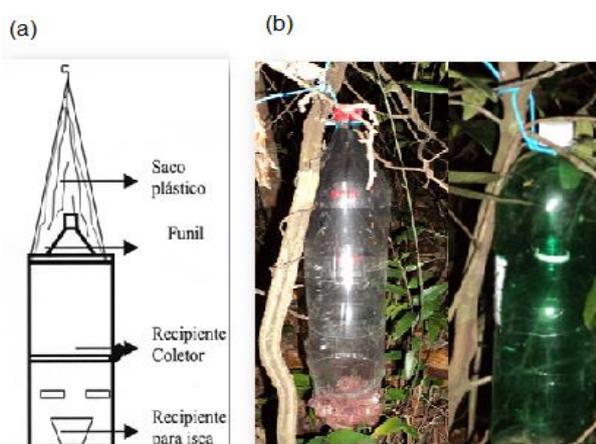


Figura 3: Armadilha utilizada nas coletas. a) Armadilha original proposta por Ferreira (1978). b) Armadilha modificada. Fonte: Ferreira (1978).

Após as coletas dos espécimes adultos, o material foi levado para o Laboratório de Bioinformática e Biologia Evolutiva (LABBE/UFPE), onde os espécimes foram triados em famílias e os califorídeos foram identificados ao nível específico utilizando as chaves taxonômicas propostas por Carvalho e Mello-Patiu (2008) e Mello (2003). Depois de identificados, uma das patas de todos os exemplares foram retiradas e depositadas em microtubos com etanol a 96% para os procedimentos posteriores de biologia molecular. Aos microtubos foram adicionadas etiquetas com a identificação da espécie, o local coletado, a data e o pesquisador que realizou a coleta. As demais amostras biológicas não utilizadas para os procedimentos de biologia molecular encontram-se preservadas em álcool a 70% no freezer a -20°C no Laboratório de Genética Molecular Humana (LGMH/UFPE).

#### **4.2 Métodos Moleculares**

O DNA foi extraído a partir de uma das patas dos adultos e da cápsula cefálica das larvas. Para cada amostra três microtubos foram utilizados, dois com 1,5 ml e outro com 0,5 ml. As patas foram acondicionadas nos tubos de 1,5 ml com 100µl Chelex® (BIORAD) 5%. Com a ajuda de um pistilo foi realizada a maceração de todos os exemplares. Em seguida os microtubos, devidamente etiquetados, foram levados para banho-maria a 56 °C por 1 hora. Posteriormente, todo material foi transferido para o microtubo de 0,5ml (etiquetado com as mesmas referências do respectivo microtubo de 1,5) e levado ao termociclador, onde o material ficou por 30 minutos a uma temperatura de 94 °C. O material foi centrifugado a 13000 rpm por 6 minutos. Por último, o sobrenadante (DNA) foi estocado em microtubo de 1,5 a -20°C. A região de DNA mitocondrial utilizada foi

à porção final da citocromo c oxidase subunidade I (COI), correspondente à região do DNA *Barcode*. A amplificação dessa região foi realizada a partir de um conjunto de *primers* degenerados para Dípteros (Nelson *et al.* 2007). As reações de PCR também foram feitas utilizando-se *primers* (Nelson *et al.*, 2008) para a região nuclear ITS2, além de *primers* desenvolvidos no presente trabalho para amplificar um fragmento do gene mitocondrial citocromo oxidase B (CytB), selecionado a partir do método de entropia.

As reações de sequenciamento bidirecional foram realizadas com o kit BygDye Terminator v3.1 Matrix Standard (Applied Biosystems) e o sequenciamento foi executado pelo sequenciador automático ABI 3130 (Applied Biosystems). Cada amostra foi sequenciada por duas vezes e a qualidade das reações foi avaliada com o auxílio do programa Pregap4 (STADEN, 1996) com base nos valores de Phred40 (Ewing *et al.*, 1998). As sequências de consenso foram obtidas utilizando o programa Gap4 (STADEN, 1996). As sequências de consenso foram submetidas ao BLASTx (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para confirmação do posicionamento taxonômico das mesmas.

### **4.3 Bioinformática**

As sequências foram alinhadas a partir do algoritmo “Muscle” integrada ao software MEGA v. 5.1. As sequências alinhadas foram importadas para os programa DNAsp v. 5.0 e Arlequin v. 3.11 para as análises de polimorfismo genético através dos índices de divergência genética intra-populacionais e índices de diferenciação genética inter-populacionais.

A existência de seleção ao nível populacional foi testada através dos cálculos do teste D de Tajima e  $F_s$  de Fu a fim de inferir desvios da neutralidade. O teste D de Tajima utiliza a diferença normalizada entre a taxa de mutação populacional (estimada a partir do número de sítios segregantes) e a média do número de diferenças de pares de base entre as sequências, para determinar se alelos com frequência intermediária se encontram mais representados nas populações estudadas, conforme esperado sob efeito da seleção balanceadora (Tajima, 1989).

O teste  $F_s$  de Fu leva em consideração a polaridade das mutações e estima a taxa de mutação populacional baseada nos alelos derivados de mutações únicas (Fu, 1997; Ramos-Onsins and Rojas, 2002). Valores negativos para essas estatísticas podem ser atribuídos à seleção purificadora ou à um evento de expansão populacional recente, enquanto valores positivos são atribuídos à seleção balanceadora.

Para as análises de sinal filogenético foram recuperados do banco de dados do ncbi (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) o genoma mitocondrial de 13 espécies de califorídeos, uma espécie de Sarcophagidae e uma espécie da família Tachinidae utilizada como grupo externo. As espécies utilizadas para construir o conjunto de dados local foram: *Calliphora vicina*, *Chrysomya albiceps*, *C. bezziana*, *C. megacephala*, *C. putoria*, *C. rufifacies*, *C. saffranaea*, *Cochliomyia hominivorax*, *Hemipyrellia ligurriens*, *Lucilia cuprina*, *L. porphyrina*, *L. sericata*, *Protophormia terraenova*, *Rutilia goerlingiana*, *Sarcophaga impatiens*.

Com o objetivo de se encontrar as regiões mais informativas para a análise filogenética e identificação das espécies de califorídeos, as sequências nucleotídicas foram submetidas à análise de entropia através do programa

DAMBE (Xia e Xie, 2001), visando à avaliação da variabilidade e complexidade de cada sítio. Foi utilizado um tamanho de janela igual a 100 com o objetivo de diminuir o ruído do gráfico.

Todos os sítios com baixa complexidade, ou seja, com valores de entropia baixos foram selecionados para a construção da filogenia. Para efeito de comparação foi construída uma árvore filogenética com o algoritmo *Neighbor joining* utilizando-se todos os genes mitocondriais das espécies citadas anteriormente. Esta árvore serviu de parâmetro para comparações topológicas com as demais árvores geradas para as regiões selecionadas pelo método de entropia.

O gráfico resultante da análise de entropia dos genomas de Diptera foi utilizado para determinar as regiões mais conservadas e, por isso, possíveis regiões para a definição de iniciadores degenerados para a amplificação dos genomas por PCR. Possíveis iniciadores foram manualmente definidos a partir do alinhamento das regiões com menor valor de entropia. Cada par de iniciadores foi avaliado, com o auxílio da ferramenta on-line OligoAnalyzer v. 3.1 (<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>), de forma a identificar a formação de possíveis grampos e de outras características indesejáveis em um par de iniciadores funcional. Os iniciadores foram definidos de forma a não produzir amplicons maiores que 1200pb. Em uma tentativa de que com uma redução de custos o resultado fosse tão satisfatório como o do genoma mitocondrial completo.

## 5. Resultados

### 5.1 Coletas

A identificação dos exemplares apontou uma elevada representatividade de duas espécies do gênero *Chrysomya*: *C. megacephala* e *C. albiceps*, essas espécies típicas de ambiente urbano, corresponderam a 72,3 % dos espécimes coletados em Brejo da Madre de Deus e 97% no município de Tamandaré (Tabela 1). Nas coletas realizadas em Recife a frequência dessas duas espécies chegou a 52,8%, já em Serra Talhada o número de espécimes coletadas das espécies referidas equivaleram a 94,4% de todas as espécies coletadas. Na coleta realizada no município cearense de Sobral todas as espécimes coletadas corresponderam a essas duas espécies (Tabela 2). Isoladamente *C. megacephala* correspondeu a 26,5 % em Brejo da M. de Deus e 83,2% em Tamandaré. Em Recife e Serra Talhada esta mesma espécie apresentou valores percentuais de 33,9% e 84,7%, respectivamente. No município de Sobral, *C. megacephala* isoladamente atingiu o valor 76,7% das espécies coletadas. A maior representatividade dessa espécie foi o fator preponderante para que ela fosse escolhida para os estudos de biologia molecular.

As outras espécies encontradas nos municípios de Brejo da Madre de Deus foram: *C. putoria*, *Cochliomyia macellaria* e *Cochliomyia hominivorax*, *Chloroprocta idioidea*, *Phaenicia eximia*, *P. cuprina*. Em Tamandaré as outras espécies encontradas foram: *C. putoria*, *Ch.idioidea*, *Co. macellaria* e *Co. hominivorax*, entretanto apresentavam uma frequência muito baixa, representando apenas 2,9% do total (Figura 4). As demais espécies coletadas em Recife foram: *C. putoria*, *Chloroprocta idioidea*, *Hemilucilia segmentaria*, *H. semidiaphana* e *Mesembrinella bicolor*. Estas duas últimas representaram 17,5%

e 20,1%, respectivamente, do total coletado e situaram-se como a quarta e segunda espécie mais representada em Recife. As coletas realizadas em Sobral obtivemos apenas as espécies *C. megacephala* e *C. albiceps*.

**Tabela 1: Levantamento dos califorídeos de importância forense nos municípios pernambucanos de Brejo da Madre de Deus e Tamandaré. FR corresponde às frequências relativas das espécies encontradas.**

ESPÉCIES	Brejo da M. de Deus	FR	Tamandaré	FR	Total	FR
<i>Crhysomya megacephala</i>	143	26,5	723	83,2	866	61,5
<i>C. albiceps</i>	247	45,8	120	13,8	367	26,1
<i>C. putoria</i>	16	3,0	3	0,3	19	1,3
<i>Chloroprocta idioidea</i>	3	0,6	3	0,3	6	0,4
<i>Cochliomyia macelaria</i>	75	13,9	12	1,4	87	6,2
<i>Co.hominivorax</i>	52	9,6	8	0,9	60	4,3
<i>Phaenicia eximia</i>	2	0,4	0	0,0	2	0,1
<i>P. cuprina</i>	1	0,2	0	0,0	1	0,1
<b>Total</b>	<b>539</b>	<b>100</b>	<b>869</b>	<b>100</b>	<b>1408</b>	<b>100,0</b>

**Tabela 2: Levantamento dos califorídeos de importância forense nos municípios pernambucanos de Serra Talhada e Recife. Além do município cearense de Sobral. FR corresponde às frequências relativas das espécies encontradas.**

ESPÉCIES	Recife	FR	Serra Talhada	FR	Sobral	FR	Total
<i>C. megacephala</i>	120	33,9	61	84,7	76	76,77	257
<i>C. albiceps</i>	67	18,9	7	9,7	23	23,23	97
<i>C. putoria</i>	5	1,4	0	0,0	0	0,0	5
<i>Ch. idioidea</i>	1	0,3	0	0,0	0	0,0	1
<i>Hemilucilia segmentaria</i>	28	7,9	0	0,0	0	0,0	28
<i>H. semidiaphana</i>	62	17,5	0	0,0	0	0,0	62
<i>P. eximia</i>	0	0,0	4	5,6	0	0,0	4
<i>Mesembrinella bicolor</i>	71	20,1	0	0,0	0	0,0	71
<b>Total</b>	<b>354</b>	<b>100</b>	<b>72</b>	<b>100</b>	<b>99</b>	<b>100</b>	<b>525</b>

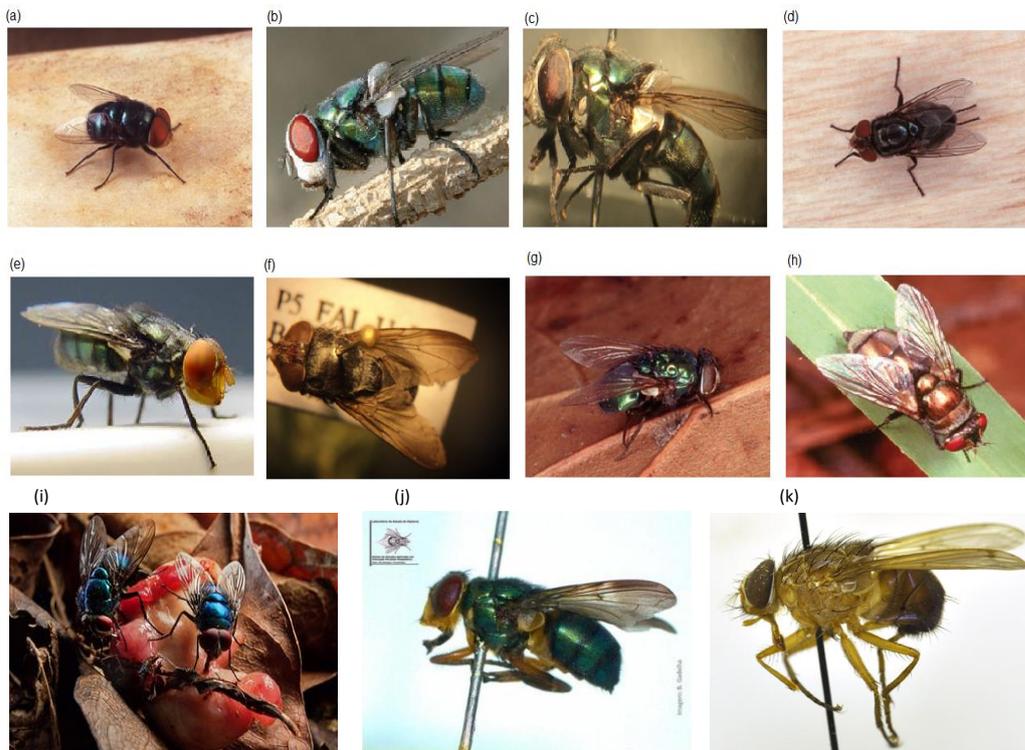


Figura 4: Espécies encontradas nos municípios de Brejo da M. de Deus, Tamandaré, Recife, Serra Talhada e Sobral. a) *C. megacephala*. b) *C. albiceps*. c) *C. putoria*. d) *Co. macellaria*. e) *Co. hominivorax* f) *Ch. ideoidea*. g) *P. eximia* h) *P. cuprina*. i) *H. segmentaria*. j) *H. semidiaphana*. k) *M. bicolor*.

## 5.2 Análises do gene COI

Como resultado do sequenciamento das amostras de adultos coletados da espécie *C. megacephala* foram produzidas 124 sequências nucleotídicas de um fragmento do gene da subunidade I da citocromo oxidase (Figura 5). As sequências obtidas mostraram a seguinte distribuição em relação as localidades: Recife com 28, Tamandaré com 21, Brejo da Madre de Deus com 29, Serra Talhada com 27 e Sobral com 19. Os cromatogramas das sequências apresentaram picos bem definidos e valores de confiança (Phred) iguais ou

superiores a 40 (Figura 6). O comprimento total do amplificado foi de 587 nucleotídeos. Todas as sequências apresentaram 100% de similaridade com sequências do gene *COI* de *Chrysomya megacephala* depositadas no Genbank, indicando que os amplificados pertencem ao gene em questão.

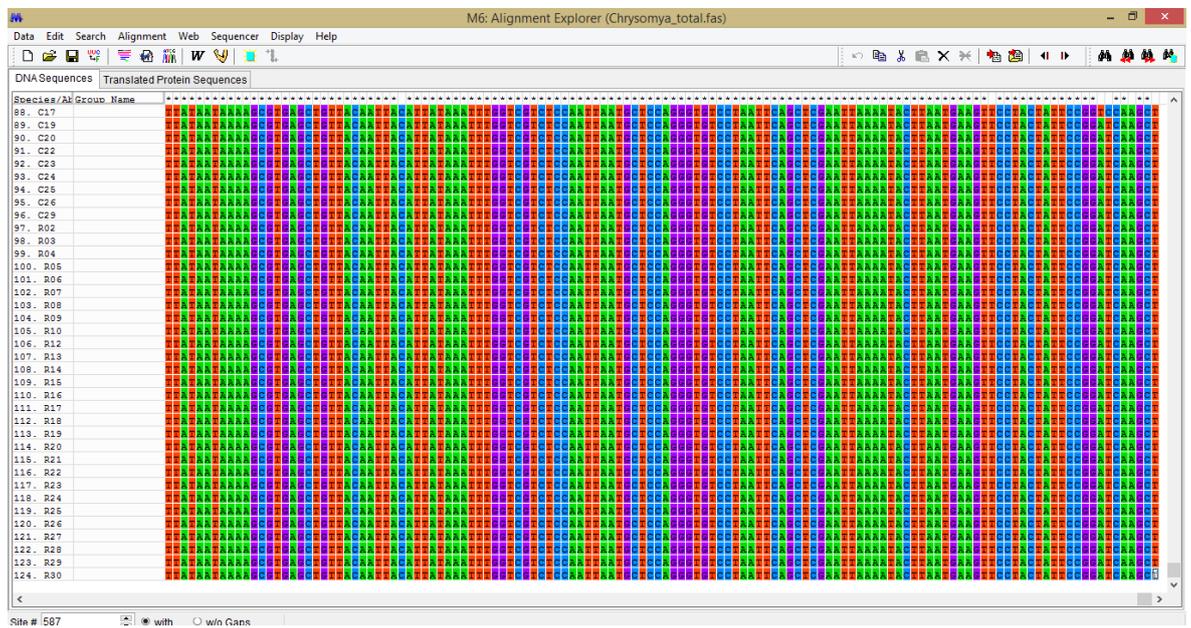


Figura 5: Sequências nucleotídicas do gene *COI* de *C. megacephala* das populações de Recife, Tamandaré, Brejo da Madre de Deus, Serra Talhada e Sobral.

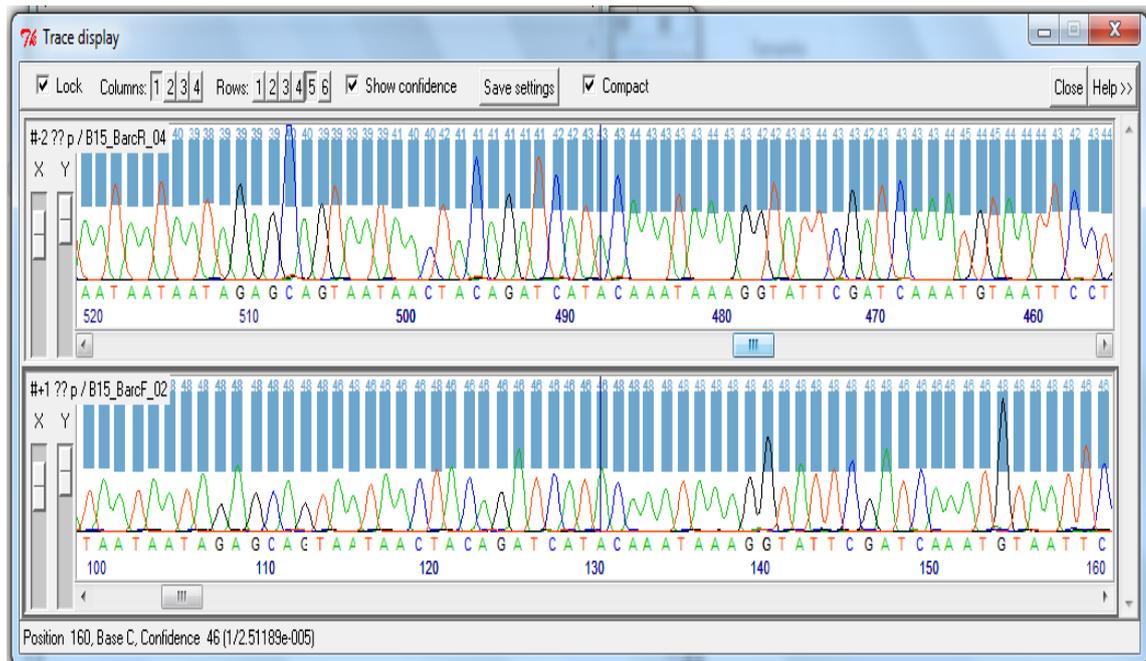


Figura 6: Elaboração da sequência consenso formada pelos *primer forward* e reverso utilizando o Staden 1.6.

As sequências da população de Tamandaré apresentaram apenas dois sítios polimórficos, nas posições 490 e 566, constituindo assim apenas três haplótipos (Tabela 3). Os sítios polimórficos ocorreram apenas em uma sequência cada, tornando a frequência elevada de apenas um haplótipo e consequentemente um valor baixo da diversidade haplotípica ( $h = 0,186$ ). Em decorrência do baixo número de sítios polimórficos, a diversidade nucleotídica também apresentou um valor baixo: 0,00032. O número médio de diferenças nucleotídicas foi de apenas 0,19, enquanto que a taxa de mutação populacional por sítio (Theta-W) foi de 0,00095. Os tipos de mutações observadas nesta população foram transições entre pirimidinas nos dois sítios. Porém no sítio 490 o nucleotídeo mais frequente foi a citosina e na posição 566 o nucleotídeo mais comum foi a timina.

Na população de Brejo da Madre de Deus foi observado apenas um sítio polimórfico na posição 490. Esta variação também só ocorreu em apenas uma sequência e foi do tipo transição entre pirimidinas com o nucleotídeo mais comum sendo a citosina, o mesmo padrão observado na população de Tamandaré. Como só foi observado um sítio polimórfico, o número de haplótipos distintos nesta população foi igual a dois. A diversidade haplotípica foi de 0,069, valor inferior ao encontrado na população de Tamandaré. A diversidade nucleotídica também foi inferior à de Tamandaré, apresentando o valor de 0,00012. O número médio de diferenças nucleotídicas foi de 0,069. A taxa de mutação populacional foi 0,00043. Todos os valores supracitados foram baixos quando analisados sob a perspectiva da diversidade genética.

Na população de Recife as sequências quando alinhadas apresentaram apenas um sítio polimórfico na posição 428, em apenas uma das sequências. Desta forma o conjunto de dados para o gene COI dos indivíduos coletados em Recife apresentaram apenas dois haplótipos. A mutação de ocorrência única nesta população é caracterizada como uma transição entre purinas, com apenas uma das sequências apresentando a guanina. O estimador da diversidade haplotípica apontou 0,071 como valor, ainda assim considerado um índice baixíssimo. A diversidade nucleotídica dessa população também apresentou-se com pouquíssima diversidade genética tendo como valor 0,00012. Concordando com os baixos valores de diversidade genética estimados, a taxa de mutação desta população foi 0,00044, mais uma vez indicando um perfil genético conservado entre os indivíduos da mesma população.

As sequências da população de Sobral apresentaram três sítios variáveis nas posições 580, 581 e 584. As mutações nos sítios 580 e 581 ocorreram uma

única vez e na mesma sequência, a mutação no sítio 584 ocorreu em outra sequência porém de ocorrência única também. Desta forma a população de Sobral foi constituída por apenas 3 haplótipos. A mutação no sítio 580 é do tipo transversão com a timina presente em apenas uma sequência e a adenina presente nas demais. As mutações dos sítos 581 e 584 são do tipo transição, na primeira ocorreu uma troca entre citosina e timina e na segunda a troca ocorreu entre bases púricas. Dentre as populações amostradas esta foi a que apresentou o maior índice de diversidade haplotípica 0,205; ainda sendo considerado uma população geneticamente homogênea. Com a pouca quantidade de sítos polimórficos a diversidade nucleotídica foi 0,00054, um valor muito baixo ainda que maior do que o das outras populações analisadas. Conseqüentemente, a taxa de mutação populacional também apresentou-se baixa 0,00146. A população de Serra Talhada não apresentou nenhum sítio polimórfico, não sendo possível estimar nenhum índice de diversidade genética.

Quando as cinco populações foram unidas e tratadas como população única obtivemos índices de polimorfismo genético com valores inferiores aos das populações de Tamandaré e Sobral. A diversidade haplotípica nesta condição foi 0,095, já a diversidade nucleotídica foi 0,00019 e o número médio de diferenças nucleotídicas foi 0,113. Porém a população total apresentou alguns índices maiores que as demais populações. A maior porcentagem de variação foi encontrada na população total, assim como o maior número de haplótipos e a taxa de mutação populacional. O índice de fixação de polimorfismo  $F_{st}$  que serve para quantificar o nível de diferenciação genética entre duas populações, foi estimado para todas as populações aos pares. Todos os  $F_{st}$  pareados obtidos apresentaram valores negativos, porém é válido ressaltar que não existe

diferença genética negativa, portanto convencionou-se colocar o limite inferior deste índice como zero. Tal resultado está de acordo com o baixo nível de polimorfismo genético encontrado nas duas populações, o que evidencia o elevado grau de homogeneidade populacional entre todas as localidades quando comparadas entre si.

**Tabela 3: Dados gerais sobre a diversidade genética do marcador COI das populações de *C. megacephala* dos municípios de Brejo da Madre de Deus, Tamandaré, Recife e Sobral.**

	Brejo da M. de Deus	Tamandaré	Recife	Sobral	Total
<b>Número de sequências</b>	29	21	28	19	124
<b>Diversidade Nucleotídica, Pi</b>	0,00012	0,00032	0,00012	0,00054	0,00019
<b>Porcentagem de Variação</b>	0,17%	0,34%	0,17%	0,51%	1%
<b>Número de Haplótipos</b>	2	3	2	3	6
<b>Diversidade Haplótipica, Hd</b>	0,069	0,186	0,071	0,205	0,095
<b>Média de diferença de nucleotídeos, k</b>	0,069	0,190	0,071	0,316	0,113
<b>Theta-W, por sítio</b>	0,00043	0,00095	0,00044	0,00146	0,00190

O teste de Tajima apresentou valores negativos para quase todas as populações com exceção de Serra Talhada. Porém apenas as populações de Sobral e Tamandaré que apresentaram significância deste teste, refletindo o desvio significativo do modelo neutro (Tabela 4). Apesar deste tipo de teste ser um dos mais bem sucedidos para esse tipo de análise, contudo desvios significantes do modelo de equilíbrio neutro, isoladamente, não fornecem evidências

suficientes contra a neutralidade seletiva. Desta forma, não podemos afirmar que o gene em questão está sobre efeito de alguma pressão seletiva.

O teste  $F_s$  de  $F_u$  foi negativo e significativo para todas as populações exceto Serra Talhada, rejeitando o equilíbrio mutação-deriva e favorecendo a interpretação de expansão recente. Os índices *raggedness* calculados para todas as amostras não foram significantes, sendo assim não rejeitaram a hipótese de expansão populacional recente. O teste da soma dos desvios dos quadrados (SSD) também não foi significativo para as populações de Recife, Tamandaré, Brejo da Madre de Deus e Sobral. O padrão observado pela distribuição de *mismatch* nestas populações (Figura 7) resultaram em curvas unimodais com a média das diferenças muito próximas de zero.

A baixa quantidade de haplótipos foi visualizada através da rede de haplótipos (Figura 8) que demonstra a relação entre eles perfazendo no total seis haplótipos distintos. O haplótipo de maior frequência representado na figura como haplótipo 2, esteve presente em 118 indivíduos, destes 19 indivíduos de Tamandaré, 28 de Brejo da Madre de Deus, 27 de Recife, 27 de Serra Talhada e 17 de Sobral. O segundo haplótipo mais frequente é representado como haplótipo 1 e esteve presente em dois indivíduos, cada um representante de uma população diferente, são elas Tamandaré e Brejo da Madre de Deus.

Os demais haplótipos 3, 4, 5 e 6 obtiveram ocorrência única, sendo considerados haplótipos exclusivos. O haplótipo 3 foi observado na população de Tamandaré, os haplótipos 4 e 5 foram encontrados na população de Sobral e o haplótipo 6 ocorreu exclusivamente na população de Recife. A população de Serra Talhada por não apresentar nenhum sítio polimórfico, não obteve nenhum haplótipo exclusivo, com todos os indivíduos apresentando o haplótipo 2. A média

de diferenças entre os haplótipos foi considerada baixa, quando comparado o haplótipo 2 com os outros haplótipos a diferença foi de apenas de apenas um sítio variável. A exceção foi a comparação entre o haplótipo 2 e o haplótipo 5 com dois sítios variáveis. Os demais haplótipos quando comparados com o haplótipo 5 demonstraram três sítios variáveis, e quando comparados entre si apresentaram dois sítios variáveis.

**Tabela 4: Testes de Neutralidade e parâmetros de expansão populacional para cada população de *C. megacephala*.**

	Brejo da M. de Deus	Tamandaré	Recife	Serra Talhada	Sobral
<b>Teste D de Tajima</b>	-1,14923	-1,51414	-1,15142	0,00000	-1,71880
<b>P-valor</b>	0,141	0,038	0,13200	1,00000	0,02200
<b>Teste F de Fu</b>	-1,18346	-1,91967	-1,15451	0,00000	-1,08494
<b>P-valor</b>	0,003	0,001	0,004	1,000	0,048
<b>SSD</b>	0,00001	0,00133	0,00002	0,00000	0,00811
<b>P-valor</b>	0,41000	0,19000	0,23000	0,00000	0,28000
<b>Raggedness index</b>	0,43218	0,74792	0,73980	0,00000	0,49307
<b>P-valor</b>	0,70000	0,85000	0,80000	0,00000	0,64000

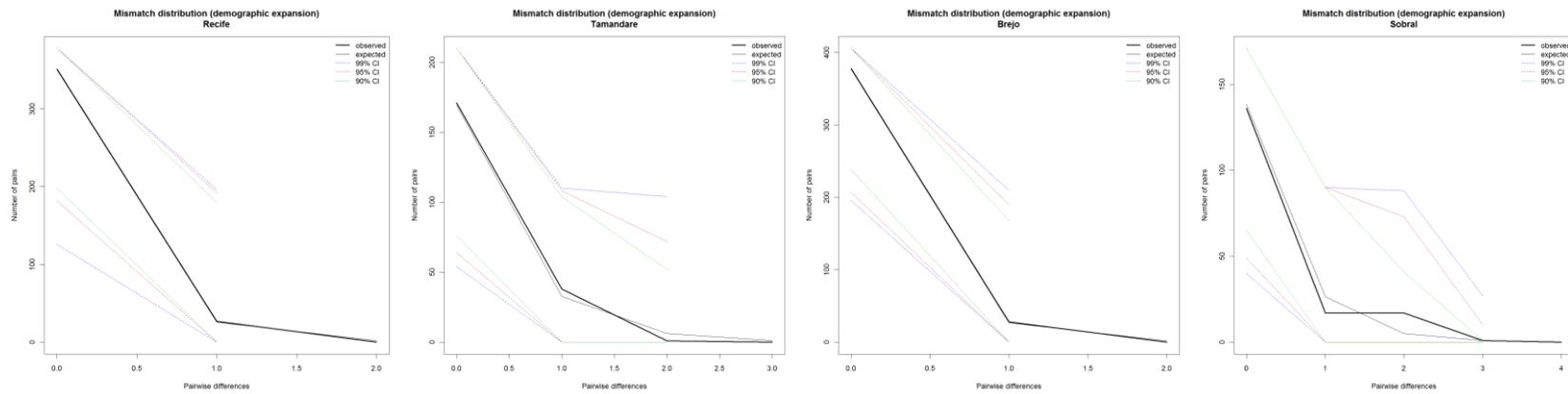
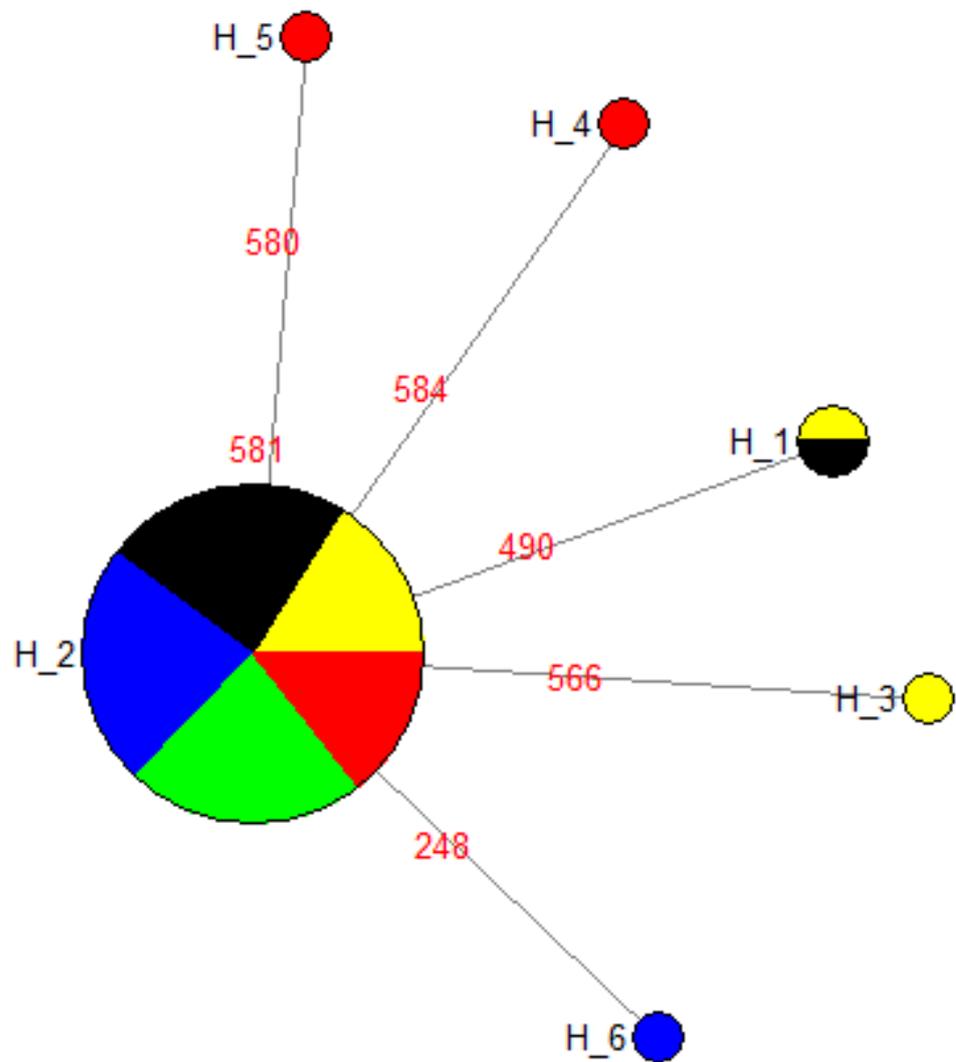


Figura 7: Gráfico da distribuição das frequências do número de diferenças pareadas (*Mismatch distribution*) das amostras de *C. megacephala* das populações de Recife, Tamandaré, Brejo da Madre de Deus e Sobral.



- Tamandaré
- Brejo da Madre de Deus
- Recife
- Serra Talhada
- Sobral

Figura 8: Rede de haplótipos mostrando as inter-relações existentes entre os haplótipos de *C. megacephala* das populações de Recife, Tamandaré, Brejo da Madre de Deus, Serra Talhada e Sobral. A circunferência dos haplótipos é proporcional a frequência dos mesmos. Os números em vermelho indicam os sítios onde ocorreram as mutações.

### 5.3 Análises do gene ITS2

Como resultado do sequenciamento do gene nuclear ITS2 foram geradas seqüências com 278 pb dos indivíduos pertencentes a população de Recife (Figura 9). Quando alinhadas e comparadas entre si as seqüências apresentaram apenas três sítios variáveis, demonstrando que assim como o gene COI o gene de ITS2 também apresenta um baixo grau de polimorfismo genético. Os sítios variáveis encontrados foram situados nas posições 259, 260 e 269. O primeiro sítio polimórfico apresentou a variação do tipo transversão envolvendo timina e guanina, com a guanina presente em apenas uma das seqüências. O sítio de número 260 apresentou uma mutação do tipo transição entre purinas e a base nitrogenada mais comum foi a adenina, por sua vez a guanina esteve presente em quatro indivíduos. O terceiro sítio polimórfico apresentou uma mutação do tipo transversão entre adenina e citosina, com a citosina sendo exibida em apenas uma seqüência desta população.

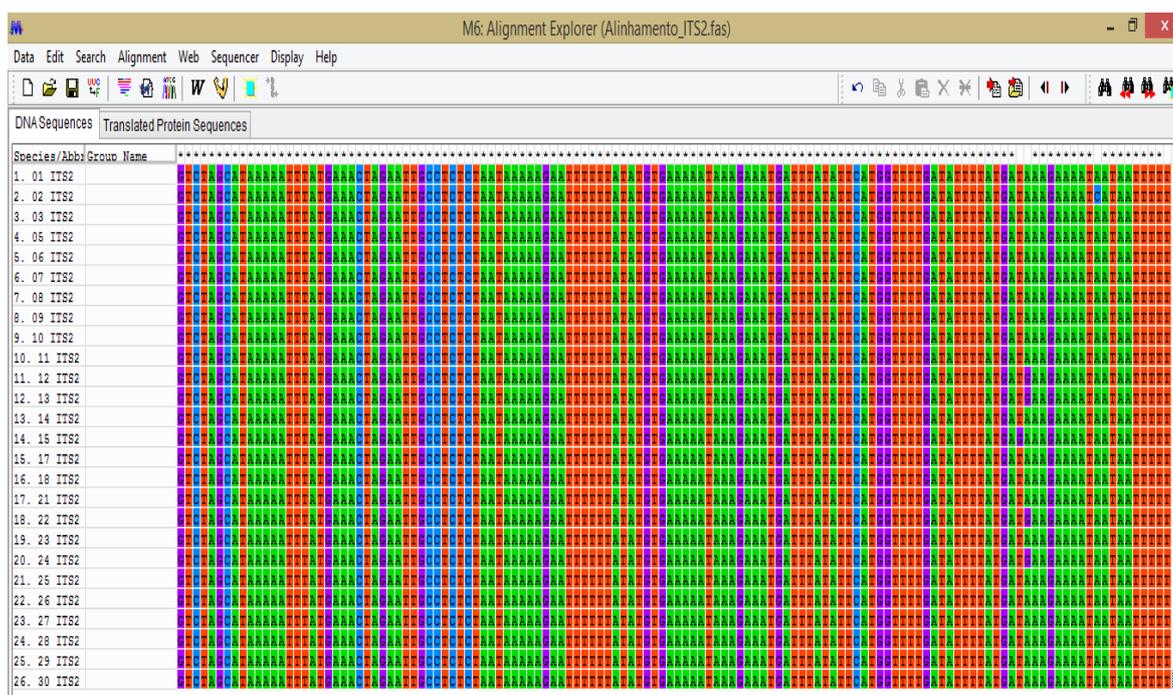


Figura 9: Sequências nucleotídicas do gene ITS2 de *C. megacephala* da população de Recife.

As análises intrapopulacionais realizadas com este marcador genético indicaram que os três sítios variáveis construíram ao todo quatro haplótipos. Os índices de variabilidade genética para este marcador apontaram valores relativamente superiores aos apresentados pelo gene COI, mas mesmo assim são consideradas estimativas de baixa variabilidade. A diversidade nucleotídica foi 0,00153, a diversidade haplotípica 0,397 e a média de diferenças nucleotídica foi 0,425. A taxa de mutação populacional com o valor 0,00283 também ratifica assim como as estimativas anteriores que o marcador genético não apresenta uma variabilidade significativa para a população estudada.

As análises para verificar a neutralidade seletiva foram realizados com o Teste D de Tajima e  $F_s$  de Fu. O teste D de Tajima apontou um valor negativo de -1,12856, porém não significativo. Por sua vez, o  $F_s$  de Fu também indicou um valor negativo de -1,70094 e significativo. Os resultados das duas análises não rejeitam a hipótese do marcador evoluir sobre pressão seletiva neutra. O resultado obtido do teste  $F_s$  de Fu pode ter sido significativo por causa de uma expansão demográfica recente e não necessariamente por causa de alguma pressão seletiva. A fim de verificar uma possível expansão demográfica recente, realizamos uma análise de *mismatch* e de acordo com distribuição das diferenças nucleotídicas entre as sequências pudemos observar que o índice da soma dos desvios dos quadrados (SSD) foi de 0,00646 e não significativo, assim como o índice de irregularidade que foi 0,17210 e não significativo. A distribuição de *mismatch* nesta população (Figura 10) que resultou em curva unimodal com a média das diferenças muito próxima de zero, juntamente com as análises de irregularidade e SSD sugerem que não podemos rejeitar a hipótese de um evento de expansão demográfica que tenha ocorrido recentemente.

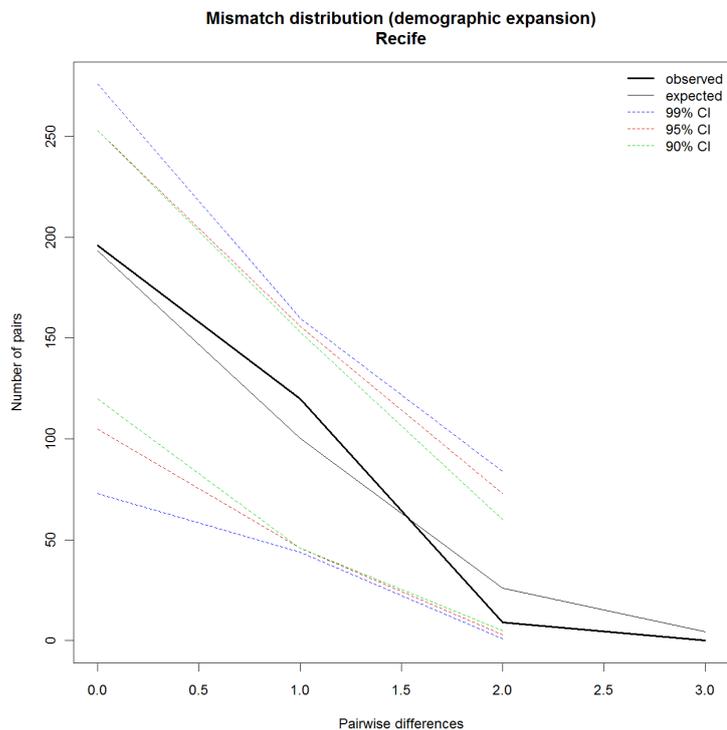


Figura 10: Gráfico da distribuição das frequências do número de diferenças pareadas (*Mismatch distribution*) das amostras de *C. megalcephala* da população de Recife.

Através da análise de Network foi possível visualizar a relação entre os haplótipos da população de Recife (Figura 11). O haplótipo mais frequente foi denominado de haplótipo 1 e esteve presente em 20 indivíduos. O segundo haplótipo mais frequente esteve presente em quatro indivíduos e o mesmo foi chamado de haplótipo 3, os haplótipos 2 e 4 só foram observados em um indivíduo cada. Os haplótipos apresentaram uma pequena diferença nucleotídica quando comparados entre si. Todos os haplótipos diferiram em apenas um nucleotídeo do haplótipo mais frequente. Ao comparar os demais haplótipos entre si, foi observado que todos diferem em dois nucleotídeos.

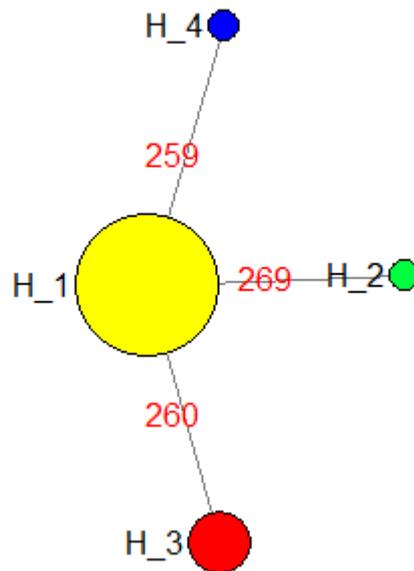


Figura 11: Rede de haplótipos mostrando as inter-relações existentes entre os haplótipos do gene ITS2 de *C. megacephala* da população de Recife. A circunferência dos haplótipos é proporcional a frequência dos mesmos. Os números em vermelho indicam os sítios onde ocorreram as mutações.

#### 5.4 Métodos de seleção de regiões filogeneticamente informativas

A fim de desenvolver novos marcadores para taxonomia molecular da família Calliphoridae foram utilizados no presente estudo sequências completas de genes codificadores de proteínas mitocondriais pertencentes a 13 espécies de califorídeos, uma espécie de Sarcophagidae e uma espécie da família Tachinidae. Os genes em questão foram NADH desidrogenase subunidade I (NAD1), NADH desidrogenase subunidade II (NAD2), NADH desidrogenase subunidade III (NAD3), NADH desidrogenase subunidade IV (NAD4), NADH desidrogenase subunidade IV L (NAD4L), NADH desidrogenase subunidade V (NAD5), NADH desidrogenase subunidade VI (NADH desidrogenase subunidade VI), COI,

Citocromo oxidase II (COII), Citocromo oxidase III (COIII), Citocromo oxidase B (CYTB), ATP sintetase subunidade 6 (ATP6) e ATP sintetase subunidade 8 (ATP8).

Todos os genes alinhados foram avaliados segundo o método de entropia (Shannon, 1948). Foi possível analisar 11.196 pb de cada organismo e destes foram selecionadas 1.266 pb distribuídos em quatro regiões com baixa entropia, sugerindo que essas regiões sejam úteis para discriminação de espécies da família Calliphoridae. A primeira correspondeu a um fragmento de 198 pb do gene ND2, o segundo fragmento apresentou 352 pb do gene ND3. O terceiro segmento encontrado apresentou 379 pb e está presente no gene ND6. O quarto fragmento selecionado foi de um trecho com 343 pb contidos no gene CYTB.

Posteriormente cada fragmento foi analisado isoladamente através de métodos de construção de árvore filogenética e matriz de distância. Como o presente estudo não tem finalidades de revisão filogenética da família Calliphoridae, e sim desenvolver ferramentas que possam ser úteis para a identificação específica dentro desta família, utilizamos algoritmos simples baseados em métodos de distância, por requerer menor custo computacional. O método de construção de árvores filogenéticas utilizado foi o *neighbor-joining* e como modelo de substituição nucleotídica utilizamos o Kimura 2 parâmetros (K2P) que é o mesmo empregado na metodologia do barcode.

As árvores geradas serviram de guia para escolha dos fragmentos selecionados de acordo com o método de entropia. Para cada fragmento isoladamente foi gerada uma árvore (Anexo), e de acordo com a topologia pudemos compará-las com a árvore modelo gerada com todos os 13 genes

mitocondriais concatenados (Figura 12). Dentre todas as árvores geradas aquela obtida a partir do fragmento do gene NAD6 (Figura 13) foi a que apresentou topologia similar a árvore modelo. A topologia desta árvore foi muito similar ao da árvore obtida através do fragmento utilizado no método do barcode (Figura 14).

Porém as matrizes de distância indicaram resultados diferentes. Segundo o método proposto do Hebert (2003), as sequências de espécies distintas amplificadas a partir dos *primers* universais do barcode devem apresentar uma distância genética superior a 3%, quando comparadas numa matriz de distância calculada a partir do modelo K2P. Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que a matriz de distância genética obtida através do fragmento do gene CYTB (Tabela 5) apresentou leve superioridade aos valores de distância gerados a partir do fragmento correspondente ao barcode (Tabela 6). Desta forma, o fragmento de CYTB selecionado através do método de entropia demonstra ser mais apropriado para identificação molecular de espécies da família Calliphoridae que o próprio segmento correspondente ao barcode.

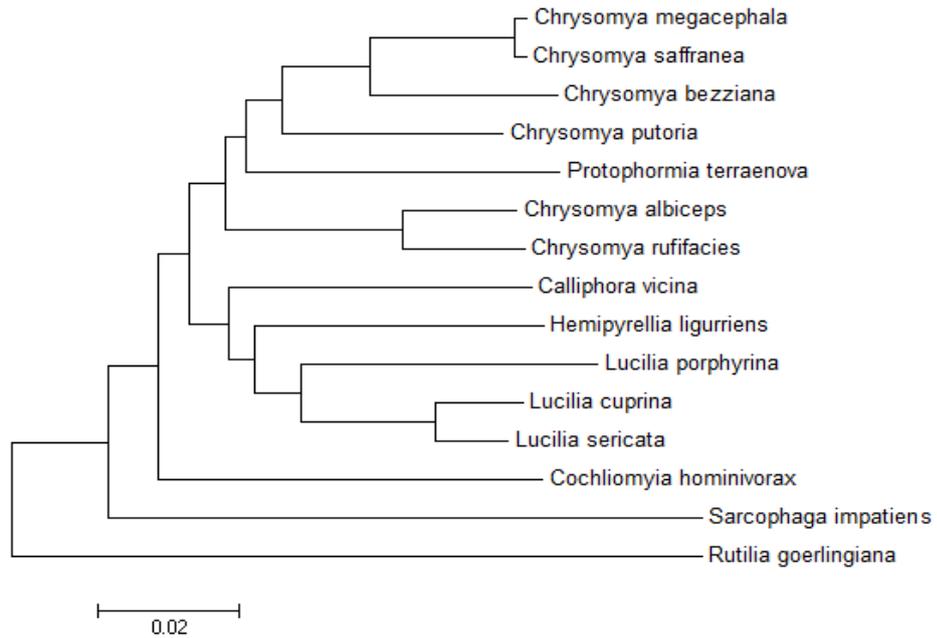


Figura 12: Árvore filogenética das 15 espécies de Dípteros baseada nos 13 genes mitocondriais (11.196 pb). Topologia determinada por *Neighbor-Joining*.

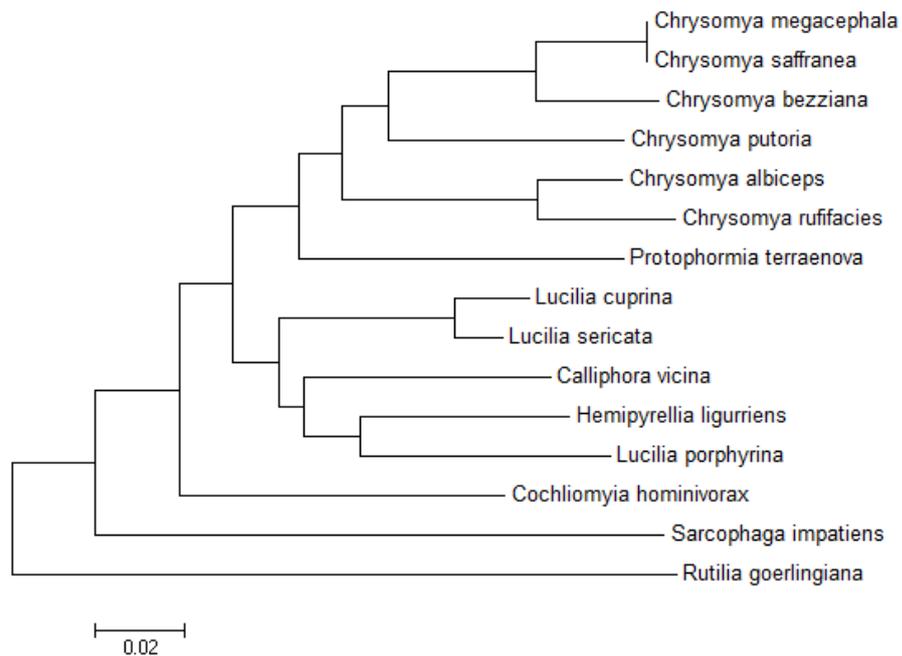


Figura 13: Árvore filogenética das 15 espécies de Dípteros baseada no fragmento de 379 pb do gene NAD6. Topologia determinada por *Neighbor-Joining*.

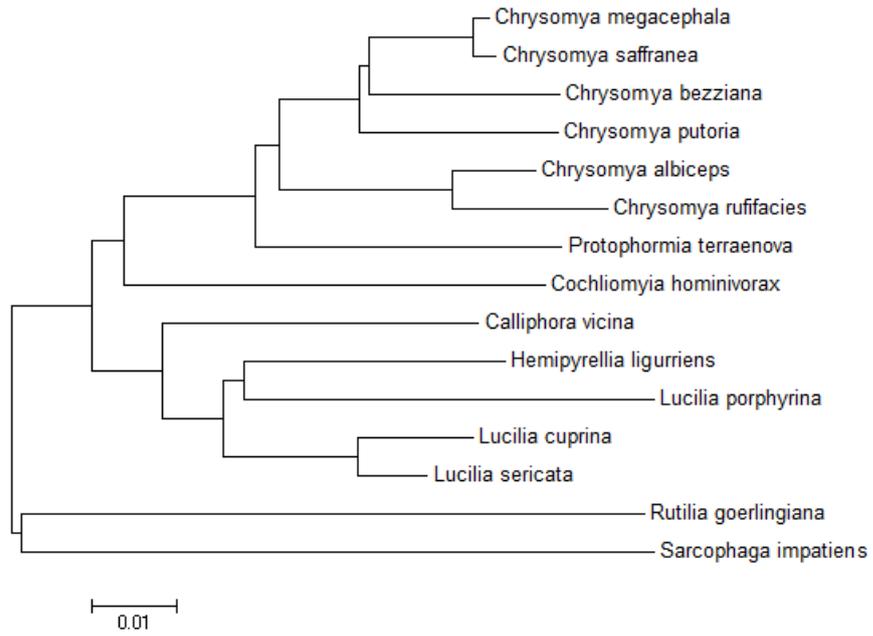


Figura 14: Árvore filogenética das 15 espécies de Dípteros baseada no fragmento correspondente ao barcode. Topologia determinada por *Neighbor-Joining*.

Tabela 5: Distância genética das 15 espécies de Dípteros baseada no fragmento de 343 pb do gene CYTB. Distância calculada pelo modelo

K2P.

Espécies	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
<i>Calliphora vicina</i>														
<i>Chrysomya albiceps</i>	0,120													
<i>Chrysomya bezziana</i>	0,128	0,114												
<i>Chrysomya megacephala</i>	0,110	0,124	0,081											
<i>Chrysomya putoria</i>	0,100	0,110	0,111	0,114										
<i>Chrysomya rufifacies</i>	0,113	0,042	0,124	0,147	0,103									
<i>Chrysomya saffrana</i>	0,114	0,128	0,084	0,009	0,111	0,150								
<i>Cochliomyia hominivorax</i>	0,128	0,138	0,152	0,171	0,135	0,124	0,175							
<i>Hemipyrellia ligurriens</i>	0,087	0,093	0,141	0,159	0,117	0,100	0,163	0,145						
<i>Lucilia cuprina</i>	0,117	0,110	0,130	0,160	0,138	0,124	0,164	0,134	0,080					
<i>Lucilia porphyrina</i>	0,131	0,149	0,170	0,149	0,145	0,149	0,149	0,142	0,131	0,128				
<i>Lucilia sericata</i>	0,131	0,130	0,127	0,142	0,117	0,131	0,145	0,134	0,093	0,046	0,107			
<i>Protophormia terraenova</i>	0,121	0,106	0,142	0,124	0,134	0,131	0,131	0,174	0,138	0,163	0,186	0,152		
<i>Ruttilia goerlingiana</i>	0,163	0,188	0,194	0,182	0,178	0,192	0,186	0,200	0,178	0,200	0,212	0,205	0,197	
<i>Sarcophaga impatiens</i>	0,153	0,193	0,221	0,182	0,164	0,182	0,182	0,149	0,173	0,152	0,156	0,134	0,183	0,216

Tabela 6: Distância genética das 15 espécies de Dípteros baseada no fragmento de 658 pb correspondente ao barcode. Distância calculada pelo modelo K2P.

Espécies	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
<i>Calliphora vicina</i>														
<i>Chrysomya albiceps</i>	0,097													
<i>Chrysomya bezziana</i>	0,103	0,064												
<i>Chrysomya megacephala</i>	0,091	0,050	0,036											
<i>Chrysomya putoria</i>	0,094	0,057	0,046	0,041										
<i>Chrysomya rufifacies</i>	0,108	0,028	0,083	0,069	0,069									
<i>Chrysomya saffrana</i>	0,089	0,055	0,038	0,005	0,039	0,074								
<i>Cochliomyia hominivorax</i>	0,096	0,105	0,110	0,098	0,101	0,106	0,096							
<i>Hemipyrellia ligurriens</i>	0,080	0,101	0,089	0,087	0,105	0,112	0,092	0,101						
<i>Lucilia cuprina</i>	0,070	0,110	0,101	0,101	0,120	0,111	0,103	0,099	0,063					
<i>Lucilia porphyrina</i>	0,095	0,122	0,119	0,112	0,115	0,126	0,113	0,123	0,079	0,082				
<i>Lucilia sericata</i>	0,067	0,111	0,101	0,092	0,102	0,119	0,090	0,090	0,055	0,022	0,074			
<i>Protophormia terraenova</i>	0,101	0,072	0,071	0,055	0,072	0,079	0,057	0,098	0,096	0,106	0,117	0,099		
<i>Ruttilia goeringiana</i>	0,126	0,120	0,133	0,119	0,130	0,122	0,117	0,137	0,133	0,126	0,163	0,126	0,135	
<i>Sarcophaga impatiens</i>	0,137	0,139	0,142	0,146	0,148	0,133	0,148	0,140	0,131	0,131	0,135	0,128	0,154	0,148

## 5.5 Análises do gene CYTB

A partir das análises de entropia foi possível selecionar quatro regiões informativas para identificação molecular de califorídeos, e posteriormente análises de distância genética com as possíveis regiões, tornou possível eleger uma das regiões para análises mais aprofundadas. A região em questão foi um fragmento de 343 pb inseridos no gene mitocondrial CYTB. Com o intuito de avaliar a eficiência do fragmento escolhido, foi desenvolvido um par de *primers* Tag-CYTB (Tabela 7). Com a finalidade de amplificar todo o fragmento selecionado, o *primer* foi desenvolvido para ancorar a vários nucleotídeos tanto a montante como a jusante do trecho escolhido. Desta maneira, o *primer* TAG-CYTB amplifica um fragmento de 611 pb, bem maior que o fragmento escolhido que possui apenas 343 pb.

**Tabela 7: Especificações dos primers desenvolvidos a partir da análise de entropia.**

<i>Primer F</i>	CAAATRTCWTTYTGAGGAGC
Posição de início no gene	936
Comprimento	20 pb
Conteúdo GC	40%
Temperatura Melting	49 °C
Hairpin (Tm)	-0.1 °C
Hairpin ( $\Delta G$ )	0.98 kcal/mol
<i>Primer R</i>	GCTCCAATTCATGTYARTA
Posição de início no gene	1547
Comprimento	19 pb
Conteúdo GC	36.8 %
Temperatura Melting	47.1 °C
Hairpin (Tm)	23.1 °C
Hairpin ( $\Delta G$ )	0.13 kcal/mol

Os primers foram testados inicialmente com a população de *C. megacephala* de Recife, visando avaliar a potencialidade deste marcador para estudos genético populacionais. Os amplificadores deram origem a sequências com valores de Phred superior a 40 (Figura 15). No total foram obtidas 23 sequências com 574 pb cada. Nesta população foram detectados sete sítios polimórficos, o maior encontrado neste estudo. Os sítios polimórficos foram encontrados nas posições 61, 62, 384, 386, 387, 442 e 446. Destes, apenas o sítio 61 apresentou uma variação parcimoniosa informativa, com quatro indivíduos apresentando a guanina e os demais apresentando timina na mesma posição. Caracterizando essa mutação como transverso.

Através dessa variação genética foi possível estimar a presença de oito mutações dentro dos sítios segregantes. Em um único sítio segregante ocorreram duas mutações singletos. A população de Recife ao ser analisada com este marcador apresentou seis haplótipos e diversidade haplotípica de 0,514. Um valor moderadamente baixo, mas considerado superior aos outros marcadores utilizados para esta mesma população (Tabela 8). Outros índices de variabilidade genética intrapopulacional foram avaliados, como a diversidade nucleotídica que apresentou o valor 0,00158. A taxa de mutação populacional foi 0,00378 e o número médio de diferenças nucleotídicas foi 0,00378. Todos esses valores apresentaram-se de baixa valia para estudos de genética de populações, apesar de terem sido maiores que dos demais marcadores empregados neste trabalho.

As análises de neutralidade seletiva foram realizadas através dos testes D de Tajima e  $F_s$  de Fu, e apresentaram como resultados os valores -1,65263 e -2,34050, respectivamente. Ambos foram significativos, o que poderia indicar uma pressão seletiva ou expansão demográfica recente. Como o marcador utilizado é

de uma região codificadora mitocondrial, seria mais parcimonioso aceitar que a população está passando por um evento de expansão demográfica. Para verificar o provável evento de expansão foi realizada a análise de *mismatch*, de acordo com o gráfico da distribuição das diferenças nucleotídicas (Figura 16) não pudemos descartar a hipótese de expansão recente, pois o mesmo apresenta uma distribuição unimodal com média das diferenças mais frequentes próximas de zero. Para confirmar o gráfico, os valores SSD e do índice de irregularidade foram 0,00128 e 0,07497, respectivamente. Esses valores baixos não obtiveram significância estatística suficiente para rejeitar a hipótese de expansão.

A relação entre os haplótipos pode ser vista na figura 17. Nela podemos observar a existência de um haplótipo com alta frequência, o qual denominamos haplótipo 1, este haplótipo esteve presente em 16 indivíduos. O haplótipo 2 foi observado em três indivíduos, já os demais haplótipos estiveram presentes em apenas um indivíduo. As diferenças nucleotídicas entre o haplótipo 1 e 2 foi de apenas um sítio polimórfico, assim como a diferença entre os haplótipos 1 e 3. Já as diferenças entre os haplótipos 1 e 5 foi de dois sítios, da mesma forma que os haplótipos 1 e 6, 2 e 3, e 2 e 4. Por fim, o haplótipo 1 quando comparado ao 4 apresentou uma variação de três sítios polimórficos. As maiores diferenças nucleotídicas foram encontradas nas comparações feitas entre os haplótipos 4 e 5, e 4 e 6. Em ambas comparações foram observados cinco sítios polimórficos.

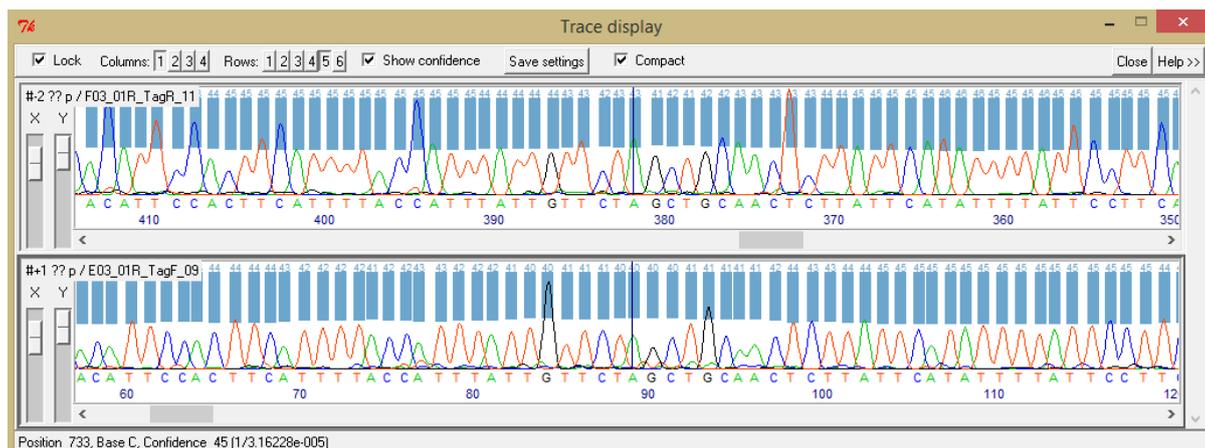


Figura 15: Elaboração da sequência consenso formada pelos *primers* Tag-CYTB *forward* e reverso utilizando o *Staden* 1.6.

**Tabela 8: Dados gerais sobre a diversidade genética dos marcadores COI, ITS2 e CYTB da população de *C. megacephala* do município de Recife.**

	COI	ITS2	CYTB
<b>Número de sequências</b>	28	26	23
<b>Diversidade Nucleotídica, Pi</b>	0,00012	0,00153	0,00158
<b>Porcentagem de Variação</b>	0,17%	1,08%	1,22%
<b>Número de Haplótipos</b>	2	4	6
<b>Diversidade Haplótipica, Hd</b>	0,071	0,397	0,514
<b>Média de diferença de nucleotídeos, k</b>	0,071	0,425	0,905
<b>Theta-W, por sítio</b>	0,00044	0,00283	0,00378

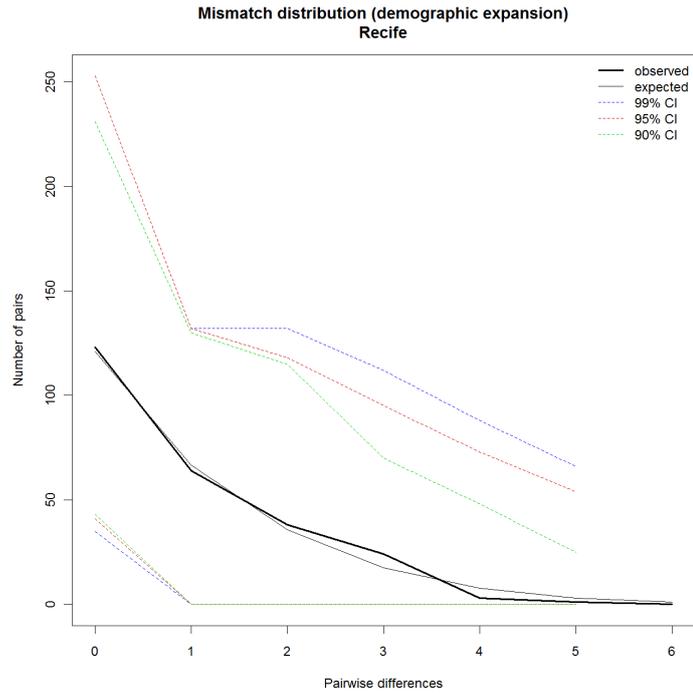


Figura 16: Gráfico da distribuição das frequências do número de diferenças pareadas (*Mismatch distribution*) do gene *CYTB* das amostras de *C. megacephala* da população de Recife.

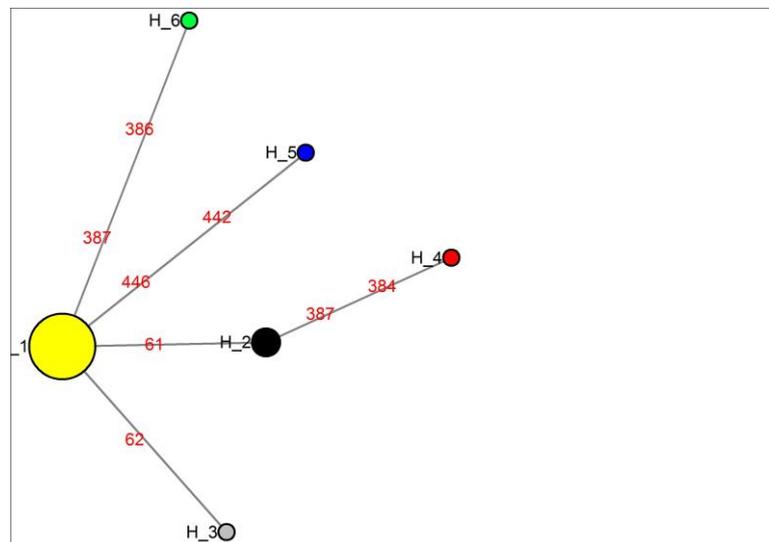


Figura 17: Rede de haplótipos mostrando as inter-relações existentes entre os haplótipos do gene *CYTB* de *C. megacephala* da população de Recife. A circunferência dos haplótipos é proporcional a frequência dos mesmos. Os números em vermelho indicam os sítios onde ocorreram as mutações.

Para testar a eficácia do marcador aqui selecionado em estudos de identificação molecular, amplificamos e sequenciamos algumas amostras de larvas previamente identificadas das espécies *C. megacephala*, *Lucilia cuprina* e *L. eximia*. As amostras geraram cromatogramas com valores de Phred acima de 30. As sequências obtidas continham mais de 550 pb. Posteriormente as sequências foram alinhadas e padronizadas de acordo com o mesmo tamanho do fragmento selecionado com o método de entropia. Após esse tratamento as sequências ficaram com o tamanho de 343 pb correspondente a um trecho do gene CYTB. A partir desse conjunto de dados foi gerada uma matriz de distância genética utilizando-se o modelo K2P (Tabela 9).

Os resultados obtidos foram confiáveis e demonstraram distância genética acima dos 3% como previstos no trabalho de Herbert *et al.* (2003). A menor distância entre as espécies foi de 13,5% entre as espécies congêneras *L. eximia* e *L. cuprina*, e a maior diferença foi relatada entre *C. megacephala* e *L. cuprina* com 15,6% de distanciamento genético. As distâncias entre indivíduos da mesma espécie foram inferiores ao limite dos 3% confirmando que o marcador desenvolvido torna-se bastante promissor para diagnosticar espécimes não identificados através da taxonomia clássica e outros estudos desse nível.

**Tabela 9: Matriz de distância genética para o modelo K2P utilizando o marcador CYTB.**

<b>Espécies</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
<b><i>Chrysomya megacephala</i></b>				
<b><i>Chrysomya megacephala 2</i></b>	0,000			
<b><i>Lucilia cuprina</i></b>	0,156	0,156		
<b><i>Lucilia eximia</i></b>	0,145	0,145	0,135	
<b><i>Lucilia eximia 2</i></b>	0,145	0,145	0,135	0,000

## 6. Discussão

Os estudos ecológicos apontaram para uma maior representatividade das espécies *C. megacephala* e *C. albiceps* nas cinco localidades estudadas, fato este que se encontra em concordância com outros estudos sobre a fauna urbana de Calliphoridae no território brasileiro. Seolin-Dias *et al.* (2009) encontraram uma frequência de mais de 95% dessas duas espécies em coletas realizadas no município de Presidente Prudente, São Paulo. A elevada frequência dessas espécies em ambientes urbanos também foi observada por Biavati *et al.* (2010) em Brasília, Distrito Federal, e por Souza and Linhares (1997) e Marchiori *et al.* (2000) em Goiás.

*C. megacephala* e *C. albiceps* apresentam um padrão alimentar do tipo generalista, conferindo-lhes um maior poder de adaptação a diversos ambientes. Descritas pela primeira vez por Guimarães *et al.* (1979), estas espécies rapidamente se dispersaram por todo o território brasileiro. Considera-se que *C. albiceps* possui uma capacidade de se deslocar 2,25 Km por dia, enquanto que *C. megacephala* se desloca de maneira mais lenta, conseguindo se dispersar a uma taxa de 3.000 Km por década (Williams e Villet, 2006). O rápido deslocamento, associado com a capacidade de se adaptar a diferentes ecótopos, pode ser considerado como alguns dos mais importantes fatores para a abundância dessas duas espécies em território brasileiro.

Outra característica que favorece a predominância dessas espécies diz respeito à capacidade de predação interespecífica da larva de *C. albiceps* (em terceiro instar). Parte dos recursos alimentares explorados por moscas-varejeiras

são de natureza efêmera, tais como substrato em decomposição e fezes, criando assim uma constante situação de escassez alimentar. A carência de alimento produz uma elevada competição entre as espécies. Nesse sentido, espécies capazes de se alimentar de seus competidores apresentam grande vantagem adaptativa. Entre as espécies que sofrem maior predação pode-se destacar *Cochliomyia macellaria* espécie nativa do continente americano. A predação intraguilda de *C. albiceps* compromete o equilíbrio entre as espécies invasoras e nativas do continente, forçando o deslocamento dessas últimas. Esse fato pode explicar a baixa frequência de indivíduos das espécies *Co. macellaria* e *Co. hominivorax* coexistindo nas duas localidades avaliadas no presente estudo. Seolin-Dias *et al.* (2009) e Marchiori *et al.* (2000) também apontam uma baixa representação dessas espécies.

Como resultado das análises genéticas realizadas neste trabalho observamos a inexistência de estruturação genética detectável entre as populações de *C. megacephala* nos municípios analisados. Contudo, apesar da inexistência de barreiras geográficas significantes que poderiam isolar as populações estudadas e a ausência de estruturação genética detectável, estes resultados não podem ser considerados conclusivos, e sim sugestivos. Essa ausência de estruturação observada é passível de diferentes interpretações. Uma delas seria a conclusão mais tradicional nesse tipo de estudo, segundo a qual as populações estariam proximamente ligadas, existindo fluxo gênico entre elas.

Este padrão sugere que a baixa variabilidade genética encontrada em *C. megacephala* nos municípios de Recife, Tamandaré, Brejo da Madre de Deus e Sobral, seja resultado da ocorrência de um evento populacional, possivelmente um efeito do fundador devido a colonização recente, ou até mesmo um evento de

seleção, no qual a diversidade foi bastante reduzida resultando em pouquíssimos haplótipos.

Além desta interpretação outros fatores podem estar associados com o padrão observado. Como no caso das populações de *C. putoria* em estudo realizado por Junqueira *et al.* (2002), que sugeriu a ocorrência de um evento do tipo bottleneck, o qual aconteceu recentemente juntamente à introdução deste gênero no Brasil. Eventos evolutivos do tipo bottlenecks populacionais resultam na perda da variabilidade genética (Franks *et al.*, 2011). A baixa variabilidade genética e a ausência de estruturação genética acarretaram na formação de poucos haplótipos, e os mesmos foram compartilhados por ambas as populações. Este resultado retoma as hipóteses de fluxo gênico entre as populações ou retenção de polimorfismo ancestral devido à recente introdução deste gênero no Brasil.

Os dados associados ao passado demográfico obtidos neste trabalho evidenciam uma expansão demográfica recente. Esta informação está de acordo com a recente introdução dessa espécie no continente americano (Guimarães *et al.*, 1979). Sendo assim, a baixa diferenciação genética entre as populações estudadas poderia ser explicada também pelo pouco tempo de isolamento das mesmas, seguida da baixa variabilidade genética ocasionada por bottlenecks, tornando assim as populações quase homogêneas. O mesmo padrão tem sido relatado na literatura da entomologia forense, no qual várias espécies de Calliphoridae vivem em populações uniformes (Wells e Stevens, 2008). Por outro lado, a falta de estruturação pode ser consequência da escolha de um marcador que não apresenta sensibilidade suficiente para a detecção de eventos de fragmentação recente (Zagonel, 2009). Levando em consideração as análises do

gene COI para todas as cinco populações e as análises para a população de Recife utilizando o gene ITS2, podemos considerar que ambos marcadores não apresentam valores significativos para estudos populacionais de *C. megacephala*. As poucas pesquisas genéticas à níveis regionais que foram feitas sobre os califorídeos não sugeriram a existência de barreiras ao fluxo gênico sobre distâncias de milhares de quilômetros (Wagner, 2000). Contudo, a grande maioria dos estudos foram baseados em mtDNA, que são muito conservados para detectar qualquer tipo de isolamento histórico extremo.

Ainda que o fragmento de COI (DNA Barcode) utilizado neste estudo seja de grande utilidade na identificação de espécies, ainda mais que foi desenvolvido para esse propósito pelo Consortium for the Barcoding of Life (Stoeckle *et al* 2005; Kosmann, 2009), este marcador não foi eficiente para detectar a diferenciação genética intraespecífica de populações introduzidas recentemente. Segundo Stoeckle *et al.* (2005), o marcador do DNA Barcode apresenta limitações ao ser aplicado em organismos que exibem uma baixa diversidade gênica em suas sequências, como é o caso de *C. megacephala*, dificultando assim na identificação de espécies que divergiram recentemente e na detecção de híbridos.

Alguns estudos utilizando o marcador COI foram realizados com espécimes de *C. megacephala* para avaliar o nível de polimorfismo genético (Nelson *et al.*, 2012). No estudo realizado por Hwa Tan *et al.* (2009), foi avaliado o polimorfismo genético de espécimes de *C. megacephala* da Malásia através de um fragmento de COI contendo 1533pb, neste estudo a porcentagem de variação nas sequências nucleotídicas foi equivalente ao nível daquela encontrada nas nossas populações locais. Enquanto que no trabalho de Hwa Tan *et al.* (2009) a

porcentagem de variação observada foi de 0,33%, os valores observados deste índice no nosso estudo variaram entre 0% e 0,51%, para o mesmo marcador.

Apesar das amostras utilizadas por Hwa Tan *et al.* (2009) serem oriundas da Ásia, que é a provável origem geográfica de *C. megacephala*, elas não apresentaram um nível de polimorfismo genético diferente do polimorfismo observado nas nossas amostras. Em contrapartida, o estudo realizado por Torres e Azeredo-Espin (2009) com espécimes de *Cochliomyia hominivorax* em que foram utilizados marcadores microssatélites, as análises de populações de 10 localidades distribuídas em quatro ilhas caribenhas revelaram uma variabilidade genética moderada dentro das populações. Um alto nível de diferenciação populacional também foi encontrado entre populações comparadas dentro da mesma ilha. Esta observação reflete em populações altamente estruturadas resultante da ausência de fluxo gênico. No mesmo estudo ficou evidenciado que as populações de *C. hominivorax* podem ter um crescimento demográfico muito rápido, após contrações populacionais. Contudo, esse rápido crescimento demográfico não está associado a eventos de fluxo gênico ao contrário do que encontramos nas populações de *Chrysomya megacephala*, no qual seu crescimento populacional é correlacionado com fortes migrações.

Outro estudo com populações naturais da Ásia foi realizado por Vern e Chua (2010), que analisaram um fragmento com 1216pb do gene COI de 32 espécimes de *C. megacephala* de diferentes regiões da Malásia. Neste estudo foram observados 14 sítios variáveis com uma porcentagem de variação de 1,1%. Valor muito superior ao encontrado no nosso estudo utilizando o fragmento de COI. Porém quando comparamos esses dados com os nossos resultados obtidos com

os marcadores ITS2 e CYTB, observamos que o índice de variação foi bastante próximo.

Além da maior porcentagem de variação, Vern e Chua (2010) também encontraram uma separação entre as amostras de diferentes regiões. A separação foi obtida através de análises filogenéticas com os métodos de *Neighbour-joining* e Máxima parcimônia, com a classificação das sequências em três grandes clados. Contudo, os autores concordaram que a variabilidade genética encontrada no gene COI ainda sim é muito baixa, e sugeriram a utilização de outros marcadores tais como genes codificadores de proteínas nucleares para fornecer um melhor suporte nas análises de genética de populações desta espécie.

Ready *et al.* (2009) analisaram o contexto filogeográfico de populações de *Chrysomya bezziana* no oriente médio através de marcadores mitocondriais e nucleares. Os resultados preliminares deste estudo indicaram que os genes nucleares do fator de alongamento 1- $\alpha$  e o gene *white* possuem uma taxa de variação similar ao padrão observado no gene CYTB. Ainda neste estudo foram analisados dois fragmentos dentro do gene CYTB que apresentaram uma quantidade de haplótipos variando entre cinco e oito. Essa quantidade de haplótipos foi similar a quantidade encontrada na população de *C. megacephala* de Recife quando analisada com um marcador do gene CYTB.

Nos estudos de identificação molecular os resultados obtidos com o fragmento selecionado pelo método de entropia demonstraram serem melhores que os resultados obtidos através do gene COI descrito na literatura. Harvey *et al.* (2003) analisaram um fragmento com 1167 pb para identificar califorídeos. E seus resultados conseguiram separar as espécies com uma boa distância genética,

porém ao comparar seus dados com os nossos podemos observar que a separação por distância genética é mais robusta com o nosso fragmento que possui apenas 343 pb do gene CYTB. Nas análises *in silico* a distância genética entre as espécies de *Chrysomya megacephala* e *C. rufifacies* foi de 14,7% enquanto no estudo de Harvey *et al.* (2003) foi de apenas 7,3%. A distância genética entre as espécies *C. megacephala* e *L. cuprina* *in silico* correspondeu a 16%, e *in vitro* essa diferença foi de 15,6%, já os resultados de Harvey *et al.* (2003) demonstraram um valor bem inferior de 8,5%.

Kosmann (2009) avaliou o fragmento genético correspondente ao barcode em amostras de califorídeos, dentre essas análises ficou evidente que o método foi incapaz de distinguir exemplares das espécies *L. cuprina* e *L. sericata*, pois a distância genética entre as mesmas foi de apenas 1%, valor abaixo do limite dos 3% conforme premissa do método. Nas nossas análises *in silico* com o gene CYTB a distância genética para os mesmos organismos e utilizando o mesmo modelo de substituição nucleotídica foi de 4,6%, acima do valor limítrofe para separar duas espécies. Ainda em comparação com esse estudo a distância genética entre as espécies *L. cuprina* e *L. eximia* variou entre 7,5% e 8,4%, valores que sustentam a separação destas espécies. Contudo, os resultados das nossas análises *in vitro* demonstraram para esta mesma comparação uma distância genética bastante superior com 13,5% de diferença entre elas.

Outro estudo de identificação de califorídeos através de técnicas moleculares foi desenvolvido por Zaidi *et al.* (2011), no trabalho em questão foram utilizadas amostras oriundas da China e Paquistão sequenciadas com os *primers* do barcode. Todas as comparações desenvolvidas no presente trabalho apresentaram valores de distância genética superiores aos valores encontrados

por Zaidi *et al.* (2011) utilizando o fragmento do barcode. Algumas diferenças requerem maior atenção, assim como a distância entre *C. megacephala* e *L. porphyrina*, que variou entre 9,8 e 9,9% no estudo feito com as amostras da Ásia. No nosso método *in silico* a mesma comparação apresentou a distância genética de 14,9%. Outra comparação que merece atenção foi entre *C. megacephala* e *L. sericata*, no estudo desenvolvido por Zaidi *et al.* (2011) esta diferença variou entre 9,1 e 9,2%, no presente estudo essa mesma distância genética foi de 14,2%.

Outra diferença significativa entre as metodologias foi entre as espécies *C. megacephala* e *C. rufifacies*, enquanto que no estudo desenvolvido por Zaidi *et al.* (2011) a distância variou entre 6,5 e 6,8%, no nosso estudo esta diferença genética foi de 14,7%. É válido ressaltar que todas as distâncias genéticas do fragmento selecionado através do método de entropia entre as espécies relatadas no presente estudo, foram maiores que todas as distâncias genéticas para o gene COI ou segmento do barcode relatados na literatura e que foram citados neste trabalho.

## 7. Conclusões

As espécies *C. megacephala* e *C. albiceps* são as representantes da família Calliphoridae mais adaptadas ao ambiente antropizado.

As populações de *C. megacephala* do Nordeste do Brasil apresentam baixa variabilidade genética para o gene COI.

O marcador mitocondrial COI não é útil para estudos de genética em populações de *C. megacephala* do Brasil.

Não é possível detectar estruturação genética das populações de *C. megacephala* através dos marcador COI.

A ausência de estruturação populacional e a baixa diversidade genética nas populações de *C. megacephala* no Estado de Pernambuco decorrem de um provável efeito do fundador, que pode ser associado a introdução recente.

A utilização da entropia de Shannon se mostra altamente eficiente na seleção de regiões filogeneticamente informativas.

O fragmento amplificado pelo *primer* TAG-CytB demonstrou ser mais eficiente que o barcode para identificação molecular de califorídeos.

## 8. Referências Bibliográficas

- Araki AS, Vigoder FM, Bauzer LGSR, Ferreira GEM, Souza, NA, Araújo IB, Hamilton JGC, Brazil RP and Peixoto AA (2009) Molecular and Behavioral Differentiation among Brazilian Populations of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). Plos Neglected Tropical Diseases, v. 3, p. e365.
- Ash N and Greenberg B (1975) Developmental temperature responses of the sibling species: *Phaenicia sericata* and *Phaenicia pallescens*. Ann. Entomol. Soc. Am. 68:197.
- Avise JC (1991) Ten unorthodox perspectives on evolution prompted by comparative population genetics findings on mitochondrial DNA. Annual Review of Genetics 25: 45-69.
- Avise J (2000) Phylogeography: The History and Formation of Species. Cambridge, MA: Harvard Univ. Press. 447 pp.
- Azeredo-Espin AML and Lessinger AC (2006) Genetic approaches for studying myiasis-causing flies: molecular markers and mitochondrial genomics Genetica 126:111–131.
- Azeredo-Espin AML and Pavan C (1983) Karyotypes and possible regions of origin Three Species Of Calliphoridae (Diptera) Recently Introduced in Brazil. Rev. Brasil. Genet. VI,4,619-638.
- Batista MV, Ferreira TA, Freitas AC and Balbino VQ (2011) An entropy-based approach for the identification of phylogenetically informative genomic regions of Papillomavirus. Infection, Genetics and Evolution 11: 2026-2033.
- Baumgartner DL and Greenberg B (1984) The genus *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) in the New World. J. Med. Entomol. 21: 105–113.
- Beneke M and Wells JD (2001) Forensic Entomology the utility of Arthropods in legal investigations. Florida, USA CRC Press LLC.
- Biavati GM, Santana FHA and Pujol-luz JR (2010). A Checklist of Calliphoridae Blowflies (Insecta, Diptera) Associated with a Pig Carrion in Central Brazil. J Forensic Sci. 1:1-4.

- Boore JL (1999) Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Research* 27(8): 1767-1780.
- Bottero MT, Civera T, Anastasio A, Turi RM and Rosati S (2002) Identification of cow's milk in "buffalo" cheese by duplex polymerase chain reaction. *J. Food Prot.* 65:362–66.
- Branicki W, Kupiec T and Pawlowski R (2003) Validation of cytochrome b sequence analysis as a method of species identification. *J. Forensic Sci.* 48:83–87.
- Brown GC and Simpson MV (1982) Novel features of animal mtDNA evolution as shown by sequences of two rat cytochrome oxidase subunit II genes. *Proceedings of the National Academy of Science of USA* 79: 3246-3250.
- Byrd JH and Castner JL (2001) Insects of forensic importance, p. 43 - 80. In: Byrd, J.H. & J.L. Castner (eds). *Forensic Entomology: The Utility of Arthropods in Legal Investigations*. Boca Raton. CRC Press LLC. 418p.
- Carvalho CJB and Mello-Patiu CA (2008) Key to the adults of the most common forensic species of Diptera in South America. *Rev Bras Entomol* 52: 390-406.
- Carvalho LML, Thyssen PJ, Goff ML and Linhares AX (2004) Observation on the succession in an area of southeastern Brasil. In: *Forensic Entomology Special Issue: The Guest Editor Aggrawal's Internet J. Forensic Med. Toxicol.*
- Castresana J (2000) Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Mol Biol Evol.* 17:540-552.
- Castro CP and Garcia MD (2009) First record of *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) (Diptera, Calliphoridae) from Portugal. *Graellsia* 65(1): 75-77.
- Caterino MS, Cho S and Sperling FAH (2000) The current state of insect molecular systematics: a thriving tower of Babel. *Annu. Rev. Entomol.* 45:1–54.
- Clary DO and Wolstenholme DR (1985) The mitochondrial DNA molecule of *Drosophila yakuba*: Nucleotide sequence, gene organization and genetic code. *Journal of Molecular Evolution* 22: 252-271.
- Criscuolo A and Gribaldo S (2010) BMGE (Block Mapping and Gathering with Entropy): a new software for selection of phylogenetic informative regions from multiple sequence alignments. *BMC Evol. Biol.* 10, 210.

- Cruz TM and Vasconcelos SD (2006) Entomofauna de solo associada à decomposição de carcaça suína em um fragmento de Mata Atlântica de Pernambuco, Brasil. *Biociências* 14: 193-201.
- D'Almeida JM and Almeida JR (1998) Nichos Tróficos Em Dípteros Caliptrados, No Rio De Janeiro-RJ. *Rev Brasil Biol*, 58(4): 563-570.
- Dizon A, Baker CS, Cipriano F, Lento G, Palsboll P and Reeves R, (2000) Molecular genetic identification of whales, dolphins, and porpoises. *Proc. Workshop Forensic Use Mol. Tech. Identify Wildl. Prod. Marketpl.* La Jolla, CA, 14–16 June 1999. U.S. Dept. Commer., NOAA Tech. Memo., NOAA-TM-NMFS-SWFSC-286. 65 pp.
- Ewing B, Hillier L, Wendl M and Green P (1998) Basecalling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res* 8:175-185.
- Ferreira MJM (1978) Sinantropia de dípteros muscóides de Curitiba, Paraná. I. Calliphoridae. *Rev. Bras. Biol.*, 38: 445-454.
- Franks SJ, Pratt PD and Tsutsui ND (2011) The genetic consequences of a demographic bottleneck in an introduced biological control insect. *Conserv Genet* , 12:201–211.
- Fresia P, Lyra MLL, Coronado A and Azeredo-Espin AML (2011) Genetic Structure and Demographic History of Screwworm Across Its Current Geographic Range. *Journal of Medical Entomology*, v. 48: 280-290.
- FuYX (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147: 915-925.
- Gerber P (1987) Playing dice with expert evidence: the lessons to emerge from Regina v. Chamberlain. *Medical Journal of Australia* 174: 243-247.
- Godoy WAC, Von Zuben CJ, Reis SF and Von Zuben FJ (1997) The spatial dynamics of native and introduced blowflies (Dipt., Calliphoridae). *J Appl Ent* 121:305-309.
- Guimarães JH and Papavero N (1999) Myiasis in man and animals in the neotropical region. Editora Plêiade, São Paulo.
- Guimarães JH, Prado AP and Linhares AX (1978) Three newly introduced blowfly species in Southern Brazil (Diptera: Calliphoridae). *Rev Bras Entomol* 22: 53-60.

- Guimarães JH, Prado AP and Buralli GM (1979) Dispersal and distribution of three newly introduced species of *Chrysomya* Robineau-Desvoidy in Brazil (Diptera, Calliphoridae). *Rev Bras Entomol* 23: 245-255.
- Hall RD (2001) Perceptions and status of forensic entomology, p. 1 - 18. In: Byrd, J.H. and J.L. Castner (eds). *Forensic Entomology: The Utility of Arthropods in Legal Investigations*. Boca Raton. CRC Press LLC.418p.
- Hall JC (2003) Genetics and molecular biology of rhythms in *Drosophila* and other insects. *Adv. Genet.* 48: 1–280.
- Harrison RG (1989) Animal mtDNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. *Trends Ecology and Evolution* 4: 6-11.
- Harvey ML , Mansell MW, M. H. Villet MH and Dadour IR (2003) Molecular identification of some forensically important blowflies of southern Africa and Australia. *Medical and Veterinary Entomology* 17: 363–369.
- Herbert PDN, Cywinska A, Ball SL and Waard J.R (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London Proc Biol Sci.* 270: 313-321.
- Huerta-Cepas J, Bueno A, Dopazo J and Gabaldón T (2008) PhylomeDB: a database for genome-wide collections of gene phylogenies. *Nucleic Acids Res.* 36:D491-D496.
- Hwa-Tan S, Aris EM, Surin J, Omar B, Kurahashi H and Mohammed Z (2009) Sequence variation in the Cytochrome oxidase subunit I and II genes of two comonly found blow fly species *Chrysomya megacephala* (fabricius) and *Chrysomya rufifacies* (Macquart) (Diptera: Caliphoridae) in Malasya. *Trop Biomed.* 26(2): 173-181.
- Hwang UW, Park CJ, Yong TS and Kim W. (2001) One-step PCR amplification of complete arthropod mitochondrial genomes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 19: 345-352.
- Iacopini, TC (2006) Binomia de Dípetos das Famílias Calliphoridae e Sarcophagidae de Interesse Forense Associado a Carcaças de Suínos no Município de Patrocínio-MG. Universidade do Cerrado-Patrocínio. 59p.
- Infante ME and Azeredo-Espin AML (1995) Genetic variability in mitochondrial DNA of screwworm, *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae), from Brazil. *Biochemical Genetics*, 33: 737-756.

- Infante-Malachias MEV, Yotoko KS and Azeredo-Espin AML (1999) Random Amplified Polymorphic DNA of screwworm fly populations (Diptera: Calliphoridae), from South-east of Brazil and North of Argentina. *Genome* 42: 772–779.
- Jirón LF (1979) Sobre moscas califôridas de Costa Rica (Diptera: Cyclorrhapha) *Brenesia*. 16: 221–223.
- Junqueira AC, Lessinger AC and Azeredo-Espin AML (2002) Methods for the recovery of mitochondrial DNA sequences from museum specimens of myiasis-causing flies. *Med. Vet. Entomol.* 16: 39–45.
- Junqueira ACM (2008) Evolução Molecular do Genoma Mitocondrial da família Calliphoridae (Diptera: Brachycera). Tese (doutorado em genética e biologia molecular) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- Kamal AS (1958) Comparative study of thirteen species of sarcosaprophagous Calliphoridae and Sarcophagidae (Diptera). 1. Bionomics. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 51: 261–70.
- Kosmann C (2009) Código de barras (DNA barcode) de dípteros de interesse forense. Dissertação (mestrado em ciências biológicas) – Setor de ciências biológicas Biologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- Kurahashi H (1982) Probable origin of a synanthropic fly, *Chrysomya megacephala*, in New Guinea (Diptera: Calliphoridae). *Mongr. Biol.* 42: 689–98.
- Lessinger AC, Junqueira ACM, Conte FF and Azeredo-Espin AML (2004) Analysis of a conserved duplicated tRNA gene in the mitochondrial genome of blowflies. *Gene*. 339: 1-6.
- Lord WD and Stevesson JR. (1986) Directory of forensic Entomologists. *Def. PestMgmt. Info.Anal. Center* (eds), Washington: Walter Reed Army Medical Center.
- Lyra ML, Fresia P, Gama S, Cristina J, Klaczko LB and Azeredo-Espin AML (2005) Analysis of mitochondrial DNA variability and genetic structure in populations of New World screwworm flies (Diptera: Calliphoridae) from Uruguay. *Journal of Medical Entomology*, 42: 589-595.
- Marchiori CH, Castro MEV, Paiva TCG, Teixeira FF and Silva CG(2000) Dípteros muscóides de importância médica e veterinária e seus parasitóides em Goiás. *Arq Bras Med Vet Zootecnia* 52: 350–3.

- Mégnin P (1894) La Faune des cadavres. Paris: Encyclopédie Scientifique des Aide- Memoire.
- Mello R P (2003). Chave para identificação das formas adultas das espécies da família Calliphoridae (Diptera, Brachycera, Cyclorrapha) Encontradas no Brasil. Entomol Vect 10 (2): 255-268.
- Miller SE (2007) DNA barcoding and the Renaissance of taxonomy. Proceedings of the Natural Academy of Science of USA 104: 4775-4776.
- Montooth KL, Dawn N, Hofman JW and Randa DM (2009) Comparative genomics of *Drosophila* mtDNA: Novel features of conservation and change across functional domains and lineages. Journal of Molecular Evolution 69: 94-114.
- Nelson LA, Wallman JF and Downton M (2007) Using COI barcodes to identify forensically and medically important blowflies. Medical and Veterinary Entomology 21: 44-52.
- Nelson LA, Wallman JF and Downton M (2008) Identification of forensically important *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) species using the second ribosomal internal transcribed spacer (ITS2). Forensic Sci. Int. 177, 238–247.
- Nelson LA *et al.* (2012). Beyond barcoding: A mitochondrial genomics approach to molecular phylogenetics and diagnostics of blowflies (Diptera: Calliphoridae). Gene 511 131–142.
- Nelson WS, Prodöhl PA and Avise JC (1996) Development and application of long-PCR for the assay of full-length animal mitochondrial DNA. Molecular Ecology, 5: 807-810.
- Notredame C (2007) Recent evolutions of multiple sequence alignment algorithms. PLoS Comput Biol. 3:e123.
- Nuorteva P (1963), Sinanthropy of blowflies (Dipt. Calliphoridae) in Finland. Ann Entomol Fenn 29: 1-49.
- Ogden TH and Rosenberg MS (2006) Multiple sequence alignment accuracy and phylogenetic inference. Syst Biol. 55:314-328.
- Oliveira-Costa J (2008) A entomologia forense e suas aplicações, p. 39. In: Oliveira-Costa, J. (ed). Entomologia Forense: Quando os insetos são vestígios. Campinas. Millennium Editora. xix + 420p.
- Otranto D and Stevens JR (2002) Molecular approaches to the study of myiasis-causing larvae. International Journal for Parasitology 32 : 1345-1360.

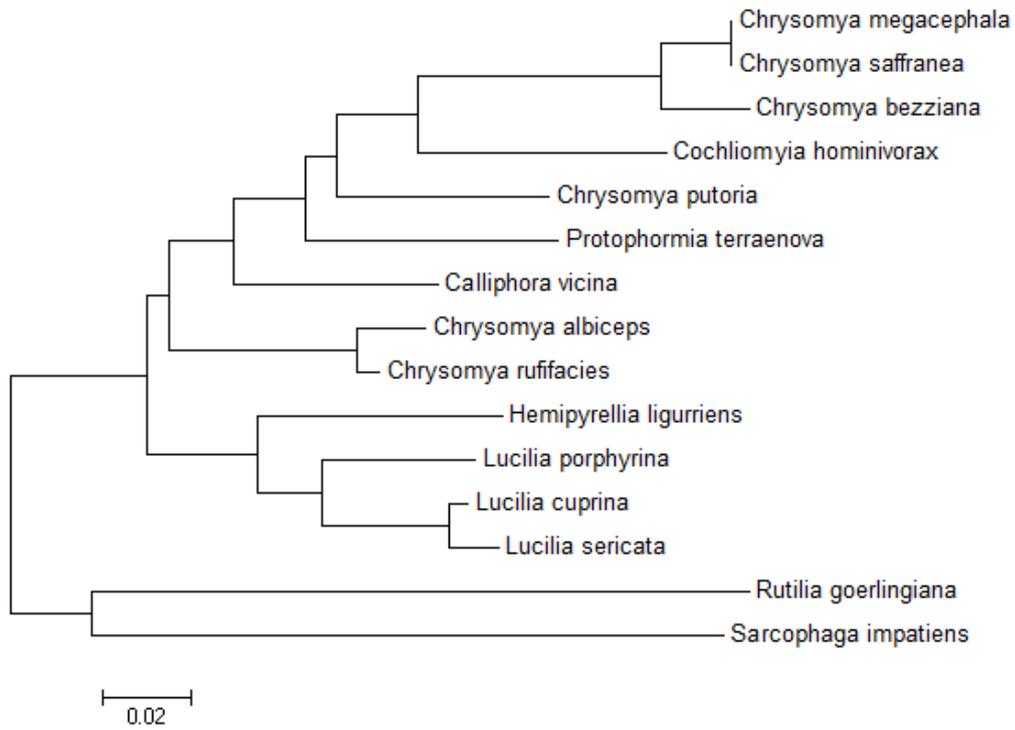
- Ramos-Onsins and Rojas J (2002) Statistical properties of new neutrality test against population growth. *Mol. Biol. Evol.* 19: 2092-2100.
- Ratnasingham S and Hebert PDN (2007) BOLD: The Barcode of Life Data System ([www.barcodinglife.org](http://www.barcodinglife.org)). *Molecular Ecology Notes* 7: 355-364.
- Ready PD, Testa JM, Wardhana AH, Al-Izzi M, Khalaj M and Hall MJR (2009) Phylogeography and recent emergence of the Old World screwworm fly, *Chrysomya bezziana*, based on mitochondrial and nuclear gene sequences. *Medical and Veterinary Entomology* 23: 43–50.
- Rocha PKL (2013) Qual região do DNA mitocondrial reflete a história evolutiva da ordem Lepidoptera?. Dissertação (Mestrado em Genética). Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- Rodrigues RA, Azeredo-Espin AML and Torres TT (2009) Microsatellite markers for population genetic studies of the blowfly *Chrysomya putoria* (Diptera: Calliphoridae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* (Impresso), v. 104, p. 1047-1050.
- Rognes K (1997) The Calliphoridae (Blowflies) (Diptera: Oestroidea) are Not a Monophyletic Group. *Cladistics*, 13:27-66.
- Rognes K (2004). *Fauna Europaea: Diptera, Calliphoridae*. *Fauna Europaea* version 1.1.
- Sahls G and Nyblom K (2000) Phylogenetic analysis of the genus *Cheilosia* (Diptera, Syrphidae) using mitochondrial COI sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 15: 235-241.
- Santos MAO (2012) Reconstrução Filogenética do Filo Arthropoda Baseada no Genoma Mitocondrial. Dissertação (Mestrado em Genética) – Universidade de Federal de Pernambuco, Recife.
- Seolin-Dias L, Santarém VA, Almeida MSR, Medina AO and Silva AV(2009). Biodiversidade de moscas Calliphoridae no lixão urbano de presidente prudente, São Paulo, Brasil. *Arq Inst Biol* 76:659-663.
- Shannon C (1948) A mathematical theory of communication. *Bell System Tech J.* 27:379-423, 623-656.
- Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H and Flook P (1994) Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction *primers*. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 87:651–70.

- Souza AM (1994) Sucessão entomológica na decomposição de carcaça animal, com ênfase nas famílias Calliphoridae e Sarcophagidae (Diptera). (dissertation de mestrado) Universidade estadual de Campinas, Campinas.
- Souza AM and Linhares AX (1997) Diptera and Coleoptera of potential forensic importance in southeastern Brazil: relative abundance and seasonality. *Med Vet Entomol* 11(1). p. 8-12.
- Sperling FAH, Anderson GS and Hickey DA (1994) A DNA-based approach to the identification of insect species used for postmortem interval estimation. *J. Forensic Sci.* 39:418–27. Erratum. 2000. *J. Forensic Sci.* 45:1358–59.
- Stoeckle M, Waggoner PE and Ausubel JH (2005) Barcoding Life, Illustrated. Goals, Rationale, Results. ppt v1.3. [http://phe.rockefeller.edu/PDF\\_FILES/BLIllustrated26jan04print%20v1-3.pdf](http://phe.rockefeller.edu/PDF_FILES/BLIllustrated26jan04print%20v1-3.pdf) (January 02, 2013).
- Tajima F (1989) Statistical method for testing neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123: 585-595.
- Talavera G and Castresana J (2007) Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. *Syst Biol.* 56:564-577.
- Tantawi TI and Greenberg B (1993) *Chrysomya albiceps* and *C. rufifacies* (Diptera: Calliphoridae): contribution to an ongoing taxonomic problem. *J. Med. Entomol.* 30: 646–648.
- Torres TT and Azeredo-Espin AML (2008) Characterization of polymorphic microsatellite markers for the blowfly *Chrysomya albiceps* (Diptera: Calliphoridae). *Molecular Ecology Resources*, v. 8, p. 208-210, 2008.
- Torres TT and Azeredo-Espin AML (2009) Population genetics of New World screwworm from the Caribbean: insights from microsatellite data. *Medical and Veterinary Entomology* 23: 23–31.
- Valle JS and Azeredo-Espin AMLA (1995) Mitochondrial DNA variation in two Brazilian populations of *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae). *Genetics and Molecular Biology (Impresso)*, v. 18, n.4, p. 521-526.
- Vern CY and Chua TH (2010) Genetic Variation In *Chrysomya Megacephala* In Malaysia Using cytochrome Oxidase I Gene (Diptera: Calliphoridae) disponível em: <http://goo.gl/9fQOC> (December 23, 2012).

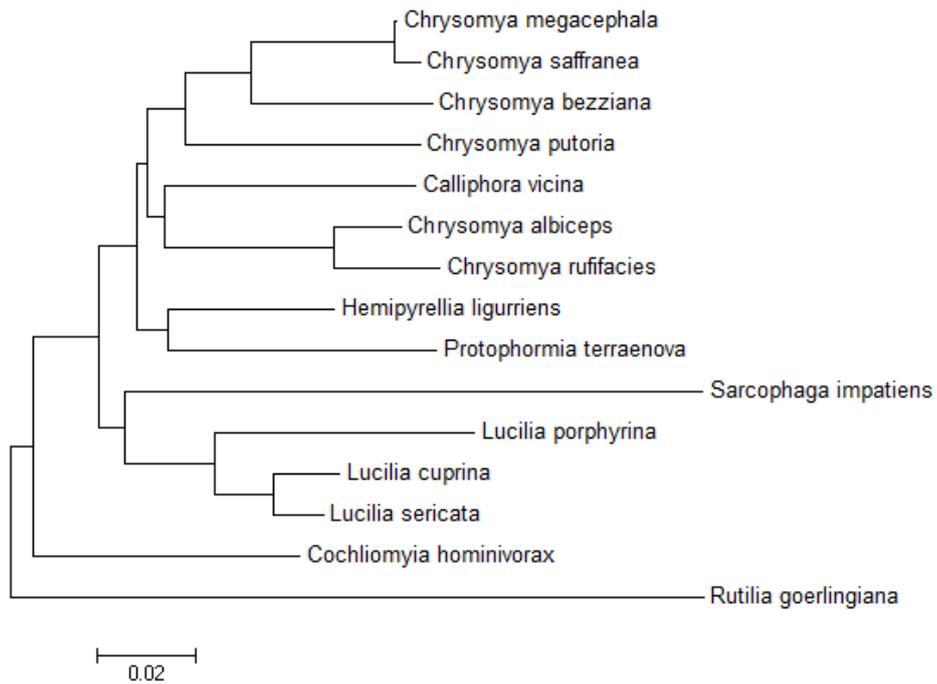
- Vincent S, Vian JM and Carlotti MP (2000) Partial sequencing of the cytochrome oxidase b subunit gene I: a tool for the identification of the European species of blow flies for postmortem interval estimation. *J. Forensic Sci.* 45:820–23. Erratum. 2000. *J. Forensic Sci.* 45:1358–59.
- Wagner DH (2000) Investigation of molecular population genetic substructure in forensically important flies. MS thesis. Birmingham: Univ. Alabama. 32 pp.
- Wallman JF, Leys L and Hogendoorn K (2005) Molecular systematics of Australian carrion-breeding blowflies (Diptera: Calliphoridae) based on mitochondrial DNA. *Invertebrate Systematics*, 19: 1-15.
- Wang L-S, Leebens-Mack J, Wall PK, Beckmann K, de Pamphilis CW and Warnow T (2009) The impact of multiple protein sequence alignment on phylogenetic estimation. *IEEE/ACM Trans Comput Biol Bioinf.*
- Wells JD and Sperling FAH (1999) Molecular phylogeny of *Chrysomya albiceps* and *C. rufifacies* (Diptera: Calliphoridae). *J. Med. Entomol.* 36: 222–226.
- Wells JD and LaMotte LR (2001) Estimating the postmortem interval. In: *Forensic entomology – the utility of arthropods in legal investigations*. Byrd, J.H. & Castner, J.L. (editors). Boca Raton: CRC Press, pp.263-285.
- Wells JD, Wall R and Stevens JR (2007) Phylogenetic analysis of forensically important *Lucilia* flies based on cytochrome oxidase 1: a cautionary tale for forensic species determination. *Int. J. Leg. Med.* 121:229–3319:1–15.
- Wells JD and Williams DW (2007) Validation of a DNA-based method for identifying Chrysomyinae (Diptera: Calliphoridae) used in death investigation. *Int. J. Leg. Med.* 121:1–8.
- Wells JD and Stevens JR (2008). Application of DNA-based methods in forensic entomology. *Annu Rev Entomol* 53: 103-120.
- Williams KA and Villet MH (2006) A new and earlier record of *Chrysomya megacephala* in South Africa, with notes on another exotic species, *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae). *African Invertebrates*. 47:347–350.
- Wilson AC, Cann SM, George M, Gyllenstein UB, Helmbjochowsky KM, Higuchi RG, Palumbi SR, Prager LM, Sage RD and Stoneking M (1985) Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biological Journal of the Linnean Society* 26: 375-400.
- Wolstenholme DR and Clary DO (1985) Sequence evolution of *Drosophila* mitochondrial DNA. *Genetics* 109: 725-744.

- Xia X and Xie Z (2001) DAMBE: data analysis and molecular biology and evolution. J Hered 92:371-373.
- Zagonel LB (2009) Avaliação do impacto das barragens na variabilidade e estruturação genética de *Pimelodus maculatus* LACEPÈDE, 1803 (SILURIFORMES, PIMELODIDAE) do Rio São Francisco. Dissertação (mestrado)- Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.
- Zaidi F, Wei S-j, Shi M and Chen X-x (2011) Utility of multi-gene loci for forensic species diagnosis of blowflies. Journal of Insect Science 11:59.
- Zehner R, Zimmermann S and Mebs D (1998) RFLP and sequence analysis of the cytochrome b gene of selected animals and man: methodology and forensic application. Int. J. Leg. Med. 111:323–27.

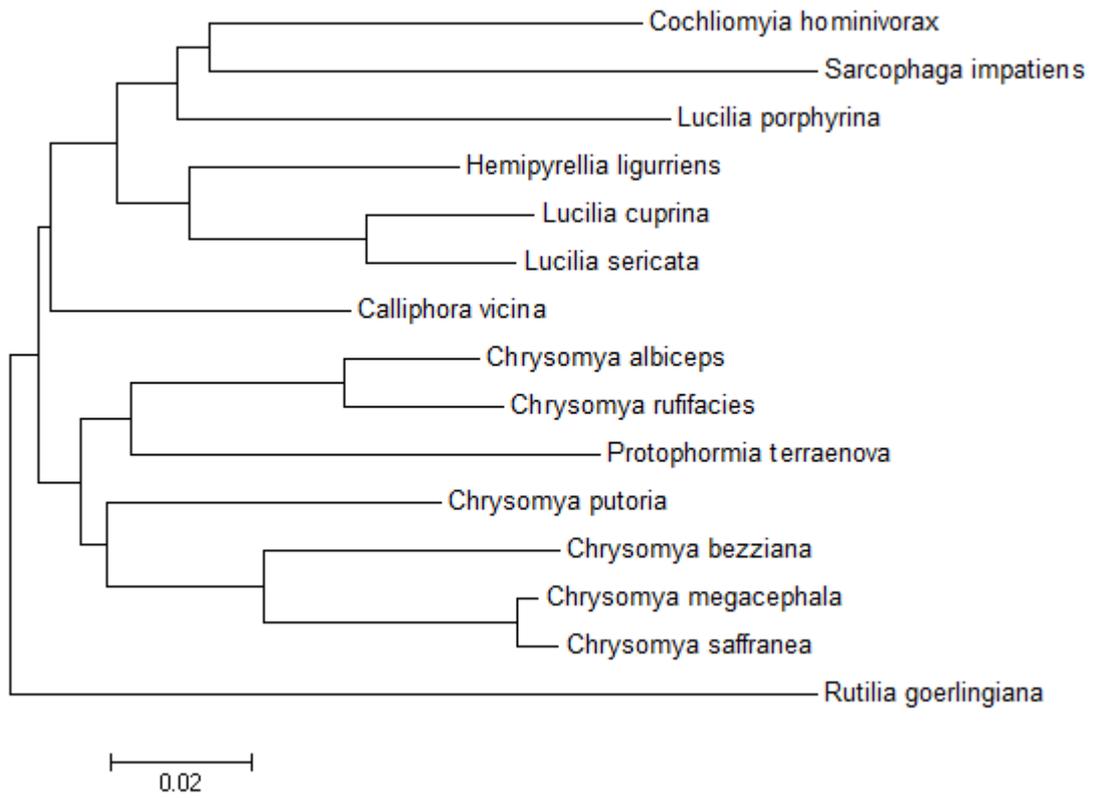
## 9. Anexos



Anexo 1: Árvore filogenética das 15 espécies de Dípteros baseada em fragmento de 198 pb do gene NAD2. Topologia determinada por *Neighbor-Joining*.



Anexo 2: Árvore filogenética das 15 espécies de Dípteros baseada em fragmento de 352 pb do gene NAD3. Topologia determinada por *Neighbor-Joining*.



Anexo 3: Árvore filogenética das 15 espécies de Dípteros baseada em fragmento de 343 pb do gene CYTB. Topologia determinada por *Neighbor-Joining*.

## 10. Curriculum lattes

### Dados pessoais

**Nome** Carlos Alberto Santiago Figueirêdo Júnior  
**Filiação** Carlos Alberto Santiago Figueirêdo e Gilvanete Gonçalves Figueirêdo  
**Nascimento** 10/05/1984 - Recife/PE - Brasil  
**Carteira de Identidade** 5601545 sds - PE - 20/06/2009  
**CPF** 013.303.694-40

---

### Formação acadêmica/titulação

- 2010** Doutorado em Genética.  
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil  
Título: Avaliação de DNA barcode e análises de polimorfismo dos genes mitocondriais e ribossomais de dípteros de importância forense.  
Orientador: Valdir de Queiroz Balbino
- 2008 - 2010** Mestrado em Genética.  
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil  
Título: Análise do polimorfismo do gene que codifica a proteína salivar SP15 em três populações do Oriente Médio de *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae), vetor da *Leishmania major.*, Ano de obtenção: 2010  
Orientador: Valdir de Queiroz Balbino  
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- 2003 - 2007** Graduação em Licenciatura Plena em Ciências Biológicas.  
Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, Recife, Brasil  
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

---

### Formação complementar

- 2012 - 2012** V Entomol.  
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, CPQAM, Brasil
- 2010 - 2010** III Curso de Genética e Bio. Mol. de Inse. Vetor.  
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
- 2010 - 2010** Identificação de Insetos Necrófagos.  
Universidade de Brasília, UNB, Brasília, Brasil
- 2007 - 2007** Bioinformática aplicada à Genética.  
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
- 2006 - 2006** Sensibilização e informação em biossegurança.  
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, CPQAM, Brasil
- 2005 - 2005** Etnoecologia.  
Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, Recife, Brasil
- 2005 - 2005** Bioindicadores Aquáticos.  
Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, Recife, Brasil

## Atuação profissional

### 1. Faculdade IBGM - IBGM

---

#### Vínculo institucional

2013 - Atual Vínculo: Celetista , Enquadramento funcional: Professor, Regime: Parcial

### 2. Faculdade de Saúde de Paulista - FASUP

---

#### Vínculo institucional

2013 - Atual Vínculo: Celetista , Enquadramento funcional: Professor, Regime: Parcial

### 3. Faculdade Escritor Osman da Costa Lins - FACOL

---

#### Vínculo institucional

2014 - Atual Vínculo: Outros , Enquadramento funcional: Professor, Regime: Parcial

### 4. Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

---

#### Vínculo institucional

2010 - 2010 Vínculo: Colaborador , Enquadramento funcional: Professor Assistente Voluntário , Carga horária: 6, Regime: Parcial  
2010 - Atual Vínculo: Aluno de Pós-graduação , Enquadramento funcional: Doutorando , Carga horária: 40, Regime: Integral  
2009 - 2009 Vínculo: Colaborador , Enquadramento funcional: Professor Assistente Voluntário , Carga horária: 3, Regime: Parcial  
2008 - 2010 Vínculo: Aluno de Pós-graduação , Enquadramento funcional: Mestrando , Carga horária: 40, Regime: Integral  
2008 - 2008 Vínculo: Colaborador , Enquadramento funcional: Professor Assistente Voluntário , Carga horária: 6, Regime: Parcial  
2007 - 2007 Vínculo: Colaborador , Enquadramento funcional: Estagiário , Carga horária: 20, Regime: Parcial

### 5. Escola Técnica Irmã Dulce - EID

---

#### Vínculo institucional

2012 - Atual Vínculo: Professor , Enquadramento funcional: Professor, Regime: Parcial

### 6. Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães - CPQAM\*

---

#### Vínculo institucional

2006 - 2008 Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Estagiário , Carga horária: 20, Regime: Dedicção exclusiva

---

## Atividades

**08/2006 - 07/2008** Estágio, Fiocruz, Cpqam

Estágio:  
*Genética de Microrganismo*

## 7. Prefeitura Municipal de Recife - PM/Recife

---

### Vínculo institucional

**2005 - 2006** Vínculo: Estagiário , Enquadramento funcional: Professor de ciências e biologia , Carga horária: 20, Regime: Parcial

## 8. Secretaria de Educação e Desporto de Olinda - SEDO

---

### Vínculo institucional

**2005 - 2007** Vínculo: Estagiário , Enquadramento funcional: Professor de ciências , Carga horária: 20, Regime: Parcial

## 9. Centro Educacional Ana Nery - CEAN

---

### Vínculo institucional

**2004 - 2004** Vínculo: Estagiário , Enquadramento funcional: Professor de Ciências , Carga horária: 12, Regime: Parcial

---

## Projetos

Projetos de pesquisa  
**2010 - 2012** Uso de ferramentas de Biologia Molecular no estudo dos padrões de transmissão vetorial da leishmaniose visceral canina em uma área de transmissão ativa no Sertão do Estado de Pernambuco, Brasil

Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (1); Mestrado acadêmico (4); Doutorado (3);

Integrantes: Carlos Alberto Santiago Figueirêdo Júnior; Tereza Cristina Leal Balbino; Valdir de Queiroz Balbino (Responsável); Marcus Batista; César Costa Júnior; Tiago Levi; Nádia Consuelo Aragão; Lidiane Gomes; Moisés Thiago Freitas; Marco Antonio Oliveira dos Santos; Pierre Teodósio Félix

Financiador(es): Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco-FACEPE

**2009 - 2009** Variabilidade genética de genes que codificam proteínas salivares de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae), vetor da *Leishmania infantum* chagasi

Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Mestrado acadêmico (2);

Integrantes: Carlos Alberto Santiago Figueirêdo Júnior; Valdir de Queiroz Balbino (Responsável); Marcus Batista

Financiador(es): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq

**2008 - 2008** Genética de populações de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae), vetor da *Leishmania infantum* chagasi na Região Neotropical

Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa  
Alunos envolvidos: Mestrado acadêmico (2);  
Integrantes: Carlos Alberto Santiago Figueirêdo Júnior; Valdir de Queiroz Balbino (Responsável);  
Marcus Batista  
Financiador(es): Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco-  
FACEPE

---

## Prêmios e títulos

**2008** Menção honrosa pela participação no prêmio de pós-graduação, Sociedade Brasileira de Genética

## Produção

---

### Produção bibliográfica

#### Artigos completos publicados em periódicos

1. ARAGAO, N. C., MULLER, G. A., BALBINO, V. Q., COSTA JUNIOR, CRL, **FIGUEIRÊDO JÚNIOR, C. A. S.**, ALENCAR, J., MARCONDES, C. B.

A list of species of mosquitoes of the Brazilian state of Pernambuco, with first report of *Haemagogus janthinomys* (Diptera: Culicidae), vector of yellow fever, and other 14 species (Diptera: Culicidae).. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical (Impresso)*. , v.43, p.458 - 459, 2010.

#### Artigos aceitos para publicação

1. COSTA JUNIOR, CRL, FREITAS, M. T. S., **FIGUEIRÊDO JÚNIOR, C. A. S.**, ARAGAO, N. C., SILVA, L. G., MARCONDES, C. B., DIAS-NETO, R. V., LEAL-BALBINO, T. C., SOUZA, M. B., RAMALHO-ORTIGAO, M., BALBINO, V. Q.

Genetic structuring and fixed polymorphisms in the gene period among natural populations of *Lutzomyia longipalpis* in Brazil. *Parasites & Vectors*. , 2015.

#### Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. Santos HMB, LIMA, TLD, **FIGUEIRÊDO JÚNIOR, C. A. S.**, KOSMANN, C., PUJOL-LUZ, J. R., BALBINO, V. Q.

Utilização de *Chrysomya megacephala* como potencial bioindicador de ambiente antropizado In: Congresso de Ecologia do Brasil, 2011, São Lourenço - MG.

**X Congresso de Ecologia do Brasil**. , 2011.

2. TENORIO, KER, OLIVEIRA, A. P. A., **FIGUEIRÊDO JÚNIOR, C. A. S.**, BATISTA, MVA., LIMA, TLD, BALBINO, V. Q.

Análise do Genoma Mitocondrial de Duas Espécies de Flebotomíneos Epidemiologicamente Importantes (DIPTERA: PSYCHODIDAE). In: 54º Congresso Brasileiro de Genética, 2008, Salvador.

**Congresso Brasileiro de Genética**. , 2008.

3. **FIGUEIRÊDO JÚNIOR, C. A. S.**, Alecrim, FM, BATISTA, MVA., CARDOSO, MV, COSTA JUNIOR, CRL, LU, W., LIMA, TLD, OLIVEIRA, AP., TENORIO, KER, BALBINO, V. Q., ALMEIDA, Alzira Maria Paiva de

Avaliação da Sintenia e dos Padrões de Utilização de Códon Sinônimos dos Genes da Ilha de

Alta Patogenicidade de *Yersinia Pestis* In: 54º Congresso Brasileiro de Genética, 2008, Salvador.  
**Congresso Brasileiro de Genética.** , 2008.

4. COSTA JUNIOR, CRL, **FIGUEIRÊDO JÚNIOR, C. A. S.**, LIMA, TLD, OLIVEIRA, A. P. A., TENORIO, KER, COUTINHO-ABREU, I. V., RAMALHO-ORTIGAO, M., BALBINO, V. Q.

Avaliação dos marcadores genéticos cacophony and period no desenvolvimento de topologias aplicada a filogeografia de *Lutzomyia longipalpis*. In: 54º Congresso Brasileiro de Genética, 2008, Salvador.

**Congresso Brasileiro de Genética.** , 2008.

5. Alecrim, FM, BATISTA, MVA., CARDOSO, MV, COSTA JUNIOR, CRL, LU, W., **FIGUEIRÊDO JÚNIOR, C. A. S.**, LIMA, TLD, OLIVEIRA, AP., PEREIRA, L., PITA, WB., TENORIO, KER, BALBINO, V. Q., PEREIRA, GA., MORAIS JUNIOR, M. A.

Bioinformatics analysis determined for design primers to the mitochondrial genome of the yeast *dekkera bruxellensis* In: 54º Congresso Brasileiro de Genética, 2008, Salvador.

**Congresso Brasileiro de Genética.** , 2008.

6. Cunha, WL., Alecrim, FM, BATISTA, MVA., CARDOSO, MV, COSTA JUNIOR, CRL, **FIGUEIRÊDO JÚNIOR, C. A. S.**, OLIVEIRA, AP., TENORIO, KER, BALBINO, V. Q.

Desenho e avaliação de primers degenerados para o gene da tripsina de *Colossoma macropomum* (tambaqui) In: 54º Congresso Brasileiro de Genética, 2008, Salvador.

**Congresso Brasileiro de Genética.** , 2008.

7. BATISTA, MVA., Alecrim, FM, CARDOSO, MV, COSTA JUNIOR, CRL, LU, W., **FIGUEIRÊDO JÚNIOR, C. A. S.**, LIMA, TLD, OLIVEIRA, AP., TENORIO, KER, BALBINO, V. Q.

Establishment and evaluation of degenerate and type-specific primers for detection and typing of bovine papillomavirus (bpv) In: 54º Congresso Brasileiro de Genética, 2008, Salvador.

**Congresso Brasileiro de Genética.** , 2008.

8. OLIVEIRA, A. P. A., COUTINHO-ABREU, I. V., SONODA, I. V., TENORIO, KER, **FIGUEIRÊDO JÚNIOR, C. A. S.**, BALBINO, V. Q., RAMALHO-ORTIGAO, M.

*Lutzomyia longipalpis* s.l. in Brazil and the impact of the Sao Francisco River in the speciation of this sand fly vector. In: 54º Congresso Brasileiro de Genética, 2008, Salvador.

**Congresso Brasileiro de Genética.** , 2008.

9. CARDOSO, MV, Alecrim, FM, BATISTA, MVA., COSTA JUNIOR, CRL, Cunha, WL., **FIGUEIRÊDO JÚNIOR, C. A. S.**, TENORIO, KER, BALBINO, V. Q., MORAIS JUNIOR, M. A.

Otimização da Extração de DNA Mitochondrial de *Dekkera bruxellensis*. In: 54º Congresso Brasileiro de Genética, 2008, Salvador.

**Congresso Brasileiro de Genética.** , 2008.

10. **FIGUEIRÊDO JÚNIOR, C. A. S.**, BALBINO, Tereza Cristina Leal, BALBINO, V. Q., ALMEIDA, Alzira Maria Paiva de

Padrões de utilização de códons sinônimos na ilha de alta patogenicidade de *Yersinia pestis* In: 12ª Jornada de Iniciação Científica de CPqAM, 2008, Recife.

**12ª Jornada de Iniciação Científica de CPqAM.** , 2008.

11. **FIGUEIRÊDO JÚNIOR, C. A. S.**

Tipagem de cepas brasileiras de *Yersinia pestis* através da amplificação por PCR dos "variable-number tandem repeats" (VNTR) In: 11ª Jornada de Iniciação Científica do CPqAM, 2007, Recife.

**11ª Jornada de Iniciação Científica do CPqAM.** , 2007.

12. **FIGUEIRÊDO JÚNIOR, C. A. S.**, ARAUJO, M. R., Santos, S, OLIVEIRA, M. B. M., BALBINO, Tereza Cristina Leal, LEAL, Nilma Cintra, ALMEIDA, Alzira Maria Paiva de

Tipagem de cepas de *Yersinia pestis* do estado do Ceará, Brasil através da amplificação por PCR de seis VNTRs In: 53º Congresso Brasileiro de Genética, 2007, Águas de Lindóia.

**Congresso Brasileiro de Genética.** , 2007.

**Apresentação de trabalho e palestra**

1. **FIGUEIRÊDO JÚNIOR, C. A. S.**  
**Uso de Marcadores Moleculares na Entomologia Forense**, 2011. (Conferência ou palestra, Apresentação de Trabalho)

## **Produção técnica**

### **Demais produções técnicas**

1. **FIGUEIRÊDO JÚNIOR, C. A. S.**  
**V Curso de Bioinformática**, 2013. (Extensão, Curso de curta duração ministrado)
2. **FIGUEIRÊDO JÚNIOR, C. A. S.**  
**V Curso de Bioinformática**, 2013. (Extensão, Curso de curta duração ministrado)
3. BALBINO, V. Q., BRANDAO FILHO, S. P., **FIGUEIRÊDO JÚNIOR, C. A. S.**, BATISTA, MVA., CARDOSO, MV, SANTOS, M. A. O., COSTA JUNIOR, CRL  
**III Curso de Bioinformática: Turma I**, 2012. (Extensão, Curso de curta duração ministrado)
4. BALBINO, V. Q., **FIGUEIRÊDO JÚNIOR, C. A. S.**, BATISTA, MVA., CARDOSO, MV, SANTOS, M. A. O., COSTA JUNIOR, CRL  
**III Curso de Bioinformática: Turma I**, 2012. (Extensão, Curso de curta duração ministrado)
5. BALBINO, V. Q., BRANDAO FILHO, S. P., **FIGUEIRÊDO JÚNIOR, C. A. S.**, BATISTA, MVA., CARDOSO, MV, SANTOS, M. A. O., COSTA JUNIOR, CRL  
**III Curso de Bioinformática: Turma II**, 2012. (Extensão, Curso de curta duração ministrado)
6. BALBINO, V. Q., **FIGUEIRÊDO JÚNIOR, C. A. S.**, BATISTA, MVA., CARDOSO, MV, SANTOS, M. A. O., COSTA JUNIOR, CRL  
**III Curso de Bioinformática: Turma II**, 2012. (Extensão, Curso de curta duração ministrado)
7. BALBINO, V. Q., BRANDAO FILHO, S. P., **FIGUEIRÊDO JÚNIOR, C. A. S.**, BATISTA, MVA., CARDOSO, MV, COSTA JUNIOR, CRL  
**IV Curso de Bioinformática**, 2012. (Extensão, Curso de curta duração ministrado)
8. BALBINO, V. Q., **FIGUEIRÊDO JÚNIOR, C. A. S.**, BATISTA, MVA., CARDOSO, MV, COSTA JUNIOR, CRL  
**IV Curso de Bioinformática**, 2012. (Extensão, Curso de curta duração ministrado)

## **Educação e Popularização de C&T**

### **Curso de curta duração ministrado**

1. **FIGUEIRÊDO JÚNIOR, C. A. S.**  
**V Curso de Bioinformática**, 2013. (Extensão, Curso de curta duração ministrado)
2. **FIGUEIRÊDO JÚNIOR, C. A. S.**  
**V Curso de Bioinformática**, 2013. (Extensão, Curso de curta duração ministrado)
3. BALBINO, V. Q., BRANDAO FILHO, S. P., **FIGUEIRÊDO JÚNIOR, C. A. S.**, BATISTA, MVA., CARDOSO, MV, SANTOS, M. A. O., COSTA JUNIOR, CRL  
**III Curso de Bioinformática: Turma I**, 2012. (Extensão, Curso de curta duração ministrado)
4. BALBINO, V. Q., **FIGUEIRÊDO JÚNIOR, C. A. S.**, BATISTA, MVA., CARDOSO, MV, SANTOS, M. A. O., COSTA JUNIOR, CRL  
**III Curso de Bioinformática: Turma I**, 2012. (Extensão, Curso de curta duração ministrado)
5. BALBINO, V. Q., BRANDAO FILHO, S. P., **FIGUEIRÊDO JÚNIOR, C. A. S.**, BATISTA, MVA.,

CARDOSO, MV, SANTOS, M. A. O., COSTA JUNIOR, CRL

**III Curso de Bioinformática: Turma II, 2012.** (Extensão, Curso de curta duração ministrado)

6. BALBINO, V. Q., **FIGUEIRÊDO JÚNIOR, C. A. S.**, BATISTA, MVA., CARDOSO, MV, SANTOS, M. A. O., COSTA JUNIOR, CRL

**III Curso de Bioinformática: Turma II, 2012.** (Extensão, Curso de curta duração ministrado)

7. BALBINO, V. Q., BRANDAO FILHO, S. P., **FIGUEIRÊDO JÚNIOR, C. A. S.**, BATISTA, MVA., CARDOSO, MV, COSTA JUNIOR, CRL

**IV Curso de Bioinformática, 2012.** (Extensão, Curso de curta duração ministrado)

8. BALBINO, V. Q., **FIGUEIRÊDO JÚNIOR, C. A. S.**, BATISTA, MVA., CARDOSO, MV, COSTA JUNIOR, CRL

**IV Curso de Bioinformática, 2012.** (Extensão, Curso de curta duração ministrado)

### **Demais produções técnicas**

1. **FIGUEIRÊDO JÚNIOR, C. A. S.**

**V Curso de Bioinformática, 2013.** (Extensão, Curso de curta duração ministrado)

2. **FIGUEIRÊDO JÚNIOR, C. A. S.**

**V Curso de Bioinformática, 2013.** (Extensão, Curso de curta duração ministrado)

3. BALBINO, V. Q., BRANDAO FILHO, S. P., **FIGUEIRÊDO JÚNIOR, C. A. S.**, BATISTA, MVA., CARDOSO, MV, SANTOS, M. A. O., COSTA JUNIOR, CRL

**III Curso de Bioinformática: Turma I, 2012.** (Extensão, Curso de curta duração ministrado)

4. BALBINO, V. Q., **FIGUEIRÊDO JÚNIOR, C. A. S.**, BATISTA, MVA., CARDOSO, MV, SANTOS, M. A. O., COSTA JUNIOR, CRL

**III Curso de Bioinformática: Turma I, 2012.** (Extensão, Curso de curta duração ministrado)

5. BALBINO, V. Q., BRANDAO FILHO, S. P., **FIGUEIRÊDO JÚNIOR, C. A. S.**, BATISTA, MVA., CARDOSO, MV, SANTOS, M. A. O., COSTA JUNIOR, CRL

**III Curso de Bioinformática: Turma II, 2012.** (Extensão, Curso de curta duração ministrado)

6. BALBINO, V. Q., **FIGUEIRÊDO JÚNIOR, C. A. S.**, BATISTA, MVA., CARDOSO, MV, SANTOS, M. A. O., COSTA JUNIOR, CRL

**III Curso de Bioinformática: Turma II, 2012.** (Extensão, Curso de curta duração ministrado)

7. BALBINO, V. Q., BRANDAO FILHO, S. P., **FIGUEIRÊDO JÚNIOR, C. A. S.**, BATISTA, MVA., CARDOSO, MV, COSTA JUNIOR, CRL

**IV Curso de Bioinformática, 2012.** (Extensão, Curso de curta duração ministrado)

8. BALBINO, V. Q., **FIGUEIRÊDO JÚNIOR, C. A. S.**, BATISTA, MVA., CARDOSO, MV, COSTA JUNIOR, CRL

**IV Curso de Bioinformática, 2012.** (Extensão, Curso de curta duração ministrado)

### **Orientações e Supervisões**

#### **Orientações e supervisões**

##### **Orientações e supervisões concluídas**

##### **Trabalhos de conclusão de curso de graduação**

1. Raíssa Nogueira Ferraz. **B-Talassemia: Revisão Bibliográfica**. 2011. Curso (Biomedicina) - Faculdade Maurício de Nassau - Recife

2. Moisés Thiago de Souza Freitas. **Diferenciação Genética entre duas populações simpátricas de Lutzomyia longipalpis (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) do município de Sobral (CE) Brasil**. 2011. Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pernambuco

## Eventos

### Eventos

#### Participação em eventos

1. Apresentação Oral no(a) **Curso de Extensão, Bioinformática: Ferramentas e Aplicações**, 2011. (Oficina)  
Genética de Populações e Filogenia Molecular.

2. Apresentação Oral no(a) **Curso de Extensão, Bioinformática: Ferramentas e Aplicações**, 2011. (Oficina)  
Genética de Populações e Filogenia Molecular.

3. Apresentação Oral no(a) **II Curso de Bioinformática: Análise de dados moleculares**, 2011. (Oficina)  
Uso da bioinformática em estudos de genética de populações.

4. **IV Workshop de Genética e Biologia Molecular de Insetos Vetores de Doenças Tropicais**, 2010. (Outra)

5. **I Workshop pernambucano de bioinformática**, 2010. (Outra)

6. **I Simpósio Brasileiro Sobre o Status Taxonômico da Lutzomyia longipalpis na Região Neotropical**, 2008. (Simpósio)

7. **II Simpósio de Genética Recife**, 2008. (Simpósio)

8. **III Workshop de Genética e Biologia Molecular de Insetos Vetores de Doenças Tropicais**, 2008. (Outra)

9. **ERAM**, 2005. (Encontro)

10. **V Semana de Biologia UFRPE**, 2005. (Encontro)

11. **Workshop Desastre Ambientais**, 2005. (Outra)

#### Organização de evento

1. **FIGUEIRÊDO JÚNIOR, C. A. S., BALBINO, V. Q., BATISTA, MVA., COSTA JUNIOR, CRL, FELIX, P. T., LIMA, TLD, SANTOS, M. A. O.**  
**Bioinformática: Ferramentas e Aplicações**, 2011. (Outro, Organização de evento)

2. **FIGUEIRÊDO JÚNIOR, C. A. S.**, BALBINO, V. Q., BATISTA, MVA., COSTA JUNIOR, CRL, FELIX, P. T., LIMA, TLD, SANTOS, M. A. O.

**Bioinformática: Ferramentas e Aplicações**, 2011. (Outro, Organização de evento)

3. **FIGUEIRÊDO JÚNIOR, C. A. S.**, BATISTA, MVA., CARDOSO, MV, COSTA JUNIOR, CRL, SANTOS, M. A. O., LIMA, TLD, BRANDAO FILHO, S. P., BALBINO, V. Q.

**II Curso de Bioinformática: Análise de dados moleculares**, 2011. (Outro, Organização de evento)

## **Bancas**

### **Bancas**

**Participação em banca de trabalhos de conclusão**

#### **Graduação**

1. BALBINO, V. Q., CARVALHO, M. W. P., **FIGUEIRÊDO JÚNIOR, C. A. S.**

Participação em banca de Filipe Aragão de Carvalho. **Análise Genética das Famílias da USF Emocy Krause do distrito sanitário IV de Recife em relação à ocorrência de Diabetes mellitus tipo 2**, 2012

(Biomedicina) Universidade Federal de Pernambuco

2. **FIGUEIRÊDO JÚNIOR, C. A. S.**, CAVALLI, R.

Participação em banca de Maíra de Arruda Lima. **Investigação sobre a suposta ocorrência da espécie de cavalo marinho (*Hippocampus erectus*), em Pernambuco**, 2011

(Bacharelado em Engenharia de Pesca) Universidade Federal Rural de Pernambuco