



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

BÁRBARA NATIELI SILVA PEREIRA

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E DIVERSIDADE GENÉTICA DE ESPÉCIES DE
DÍPTEROS DE INTERESSE FORENSE**

Recife
2022

BÁRBARA NATIELI SILVA PEREIRA

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E DIVERSIDADE GENÉTICA DE ESPÉCIES DE
DÍPTEROS DE INTERESSE FORENSE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Genética da Universidade Federal de
Pernambuco como requisito parcial para obtenção
do título de Doutora em Genética.
Área de concentração: Evolução.

Orientador: Prof. Dr. Valdir de Queiroz Balbino

Coorientador: Prof. Dr. Walter Fabrício Silva Martins

Recife

2022

Catálogo na Fonte:
Bibliotecária Natália Nascimento, CRB4/1743

Pereira, Bárbara Natieli Silva.

Identificação molecular e diversidade genética de espécies de dípteros com interesse forense. /
Bárbara Natieli Silva Pereira. – 2022.

99 f. : il., fig.; tab.

Orientador: Valdir de Queiroz Balbino.

Coorientador: Walter Fabrício Silva Martins.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Genética, 2022.

Inclui referências.

1. Entomologia forense. 2. *Chrysomya albiceps*. 3. DNA mitocondrial. 4. Taxonomia molecular. I. Balbino, Valdir de Queiroz. (orient.). II. Martins, Walter Fabrício Silva. (Coorient.). III. Título.

BÁRBARA NATIELI SILVA PEREIRA

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E DIVERSIDADE GENÉTICA DE ESPÉCIES DE
DÍPTEROS DE INTERESSE FORENSE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Biociências, como requisito para a obtenção do título de Doutora em Genética. Área de concentração: Evolução.

Aprovado em: 12/05/2022.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Martin Alejandro Montes
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Profa. Dra. Rita de Cássia de Moura
Universidade de Pernambuco

Profa. Dra. Silvia Helena Barem Rabennhorst
Universidade Federal do Ceará

Profº. Dr. Simão Dias de Vasconcelos
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico este trabalho aos insetos que contribuem com a justiça e com a ciência, assim como a todos que foram vítimas de crimes violentos e/ou sofreram com os seus danos, direta ou indiretamente.

AGRADECIMENTOS

Ao término de mais um ciclo acadêmico e com o coração repleto de gratidão e esperança, deixo aqui os meus agradecimentos a todos que fizeram parte desta caminhada.

Ao meu orientador, o Prof. Dr. Valdir Balbino, pela confiança depositada, todos os ensinamentos e paciência durante esses anos de convívio.

À banca examinadora, por todas as contribuições para o aprimoramento da versão final deste trabalho.

A todos que fazem o LABBE-UFPE, em especial a Stênio Foerster, por sua amizade, confiança, debates e perrengues compartilhados; ao Roberto Farias, por todo carinho e leveza que traz à vida de quem está perto dele; e ao grupo de Genética Forense (Abigail Marcelino, Bruno Almeida, Bruno Sampaio, Ellen Oliveira, Jayane Miranda e Theresa Liberal), por todas as discussões, bons momentos vividos, pelo sangue doado e amizade. Vocês são especiais para mim.

Aos amigos que me acompanham desde a UEPB, que confiam em mim mais do que eu mesma: Antônio Felinto, Daniella Régis, Gabriella Brandão, Izabelly Gomes, Mayara JF, Tércio José, Thayná de Senna, Vanessa Ferreira e Walter Martins. Minha vida não seria a mesma sem vocês.

A minha família, em especial aos meus pais (Andréa e Flavio), avó (Corina) e irmãos (Arthur, Bianca e Brenda) por entenderem minha ausência em momentos importantes e por me apoiarem. E as minhas sobrinhas (Lorena e Sarah) por darem sentido a minha vida.

Ao Programa de Pós-graduação em Genética por todo ensinamento e oportunidade de crescimento; e à CAPES, pela concessão da bolsa, a qual foi fundamental para que eu chegasse até aqui.

*"(...) I know the sun must set to rise, this could be
paradise."* Coldplay

Resumo

Dípteros necrófagos são frequentemente encontrados em locais de crime, podendo auxiliar na investigação criminal. A identificação taxonômica destes espécimes é uma etapa crucial na rotina forense, a qual vem aplicando técnicas de biologia molecular. Utilizar marcadores robustos e conhecer a estrutura genética destas espécies é fundamental para a eficácia das análises. O presente trabalho objetivou comparar dois marcadores moleculares úteis para a técnica *barcode* em dípteros de interesse forense e investigar a diversidade genética da espécie *Chrysomya albiceps*. Dípteros foram coletados nos Institutos de Medicina Legal da Paraíba e Pernambuco, adicionalmente foram utilizadas amostras da coleção entomológica da Universidade de Brasília. As regiões COI e CytB foram sequenciadas, em seguida buscas por sequencias homologas ocorreram no NCBI através de BLASTn e uma análise de distância genética foi executada no software MEGA. A análise de diversidade genética da espécie *C. albiceps* ocorreu utilizando sequencias nucleotídicas do gene COI obtidas no NCBI e analisadas nos softwares Mega, DnaSP e Network. Os resultados da identificação de dípteros mostram que a região do CytB proposta como *barcode* revelou-se mais robusta, apresentado valores de distância genética superiores aos do COI e que, com o COI, a espécie *C. albiceps* apresenta baixa diversidade genética e ausência de haplótipos exclusivos na América do Sul. Desta forma, concluímos que o gene CytB é mais robusto para taxonomia, e que a espécie *C. albiceps* possui pouca diversidade no COI.

Palavras-chave: Entomologia Forense; *Chrysomya albiceps*; DNA mitocondrial; Taxonomia molecular.

ABSTRACT

Necrophagous diptera are often found at crime scenes and their specimens are used as a vestige for various crimes, in all cases the identification correct of collected biological material is a crucial step which has been relying on the help of biology molecular. Using robust molecular markers and knowing the genetic structure of these species is importance for the effectiveness of analysis. Thus, the present work aimed compare two molecular markers useful for barcode technique in dipterans with forensic interest and investigate the genetic diversity of *Chrysomya albiceps*. Diptera were collected at the Institutes of Legal Medicine of Paraíba and Pernambuco. Additionally, samples from the entomological collection of the University of Brasília were used. The COI and CytB regions were amplified and sequenced, searches were performed for homologous sequences in NCBI through BLASTn and a genetic distance analysis was performed in MEGA software. The genetic diversity analysis of *C. albiceps* occurred from nucleotide sequences of COI barcode region obtained in the NCBI and analyzed in software Mega, DnaSP and Network. The results show that CytB region proposed as a barcode proved to be more robust for identification of dipterans and, in COI gene, *C. albiceps* presents low genetic diversity with absence of exclusive haplotypes in South America. Thus, we conclude that CytB is more robust for molecular taxonomy and *C. albiceps* has low diversity in COI gene.

Key words: Forensic Entomology; *Chrysomya albiceps*; mitochondrial DNA; molecular taxonomy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO BIBLIOGRAFICA

Figura 1 -	Número de artigos encontrados através de busca por “ <i>Forensic Entomology Brazil</i> ” nas plataformas Pubmed, SciELO e Science direct.....	18
Figura 2 -	Representação da estrutura do DNA mitocondrial. Fonte: Hao et al. (2017).....	23

ARTIGO I - MOLECULAR IDENTIFICATION OF NECROPHAGOUS DIPTERA WITH A NEW MOLECULAR MARKER MTDNA DEVELOPED THROUGH ENTROPY ANALYSIS

Figure 1 -	Phylogenetic tree showing the grouping of 14 diptera species using a fragment the Cytochrome B gene and the Cytochrome Oxidase I obtained by Neighbor-Joining analysis, using Kimura 2 Parameters methodology with 1000 bootstrap repetitions.....	54
Figure 2 -	Phylogenetic tree obtained by Neighbor-Joining analysis, using the methodology of Kimura 2 Parameters, with nucleotide sequences of the mitochondrial Cytochrome B gene of necrophagous dipteran species.	55
Supplementary figure 1 -	Phylogenetic tree of 15 Diptera species based on the fragment corresponding to (A) barcode region of mitochondrial Cytochrome oxidase I gene (648pb) and (B) 13 mitochondrial genes (11.196pb).....	60
Supplementary figure 2 -	Phylogenetic trees of 15 species of dipterans, generated from the regions chosen in the entropy analysis (A: NADH2, B, NADH3, C: NADH 6, D: CytB) and generated with the obtained by Neighbor-Joining analysis.....	61

ARTIGO II - DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Chrysomya albiceps* UTILIZANDO O GENE
MITOCONDRIAL CITOCROMO OXIDASE I

Figura 1 - Distribuição dos haplótipos referentes a região *barcode* do gene
Citocromo Oxidase I em populações de *Chrysomya albiceps*
oriundas de quatro diferentes
continentes..... 73

LISTA DE TABELAS

ARTIGO I - MOLECULAR IDENTIFICATION OF NECROPHAGOUS DIPTERA WITH A NEW MOLECULAR MARKER MTDNA DEVELOPED THROUGH ENTROPY ANALYSIS

Table 1 -	Description of necrophagous diptera samples used for comparison of barcode COI and CytB molecular markers.....	49
Table 2 -	Specifications of primers developed from entropy analysis and used to amplify a region of the mitochondrial cytochrome B gene of Diptera.....	50
Table 3 -	Matrix of the intra and interspecific genetic distance of 14 diptera species estimated by Kimura 2 Parameters model, using a fragment the Cytochrome B gene and the cytochrome oxidase I. The values in the upper-right correspond to the CytB gene and lower-left to the COI gene.....	51
Table 4 -	Origin, identification, and quantity of maggots collected from decomposed human cadavers from the Forensic Medicine services of the States of Paraíba and Pernambuco.....	52
Table 5 -	Matrix of the intra and interspecific genetic distance estimated by the Kimura 2 Parameters model, using a fragment of the Cytochrome B gene in six species of dipterans collected in the Forensic Medicine Services of the States of Paraíba and Pernambuco.....	53
Supplementary table 1 -	Diptera species used to search for phylogenetic signal through entropy analysis.....	56
Supplementary table 2 -	Genetic distance of 15 dipteran species based on the 343 bp fragment of the mitochondrial Cytochrome B gene. Distance calculated by Kimura 2 Parameters model.....	57
Supplementary	Genetic distance of 15 dipteran species based on the 658 bp fragment of barcode region of mitochondrial Cytochrome	

table 3 -	oxidase I gene. Distance calculated by Kimura 2 Parameters model.....	58
Supplementary table 4 -	Diptera sequence information obtained from genbank and used for the analysis of species grouping and genetic distance.....	59

ARTIGO II - DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Chrysomya albiceps* UTILIZANDO O GENE MITOCONDRIAL CITOCROMO OXIDASE I

Tabela 1 -	Diversidade genética de <i>Chrysomya albiceps</i> oriundas de quatro diferentes continentes a partir da região <i>barcode</i> do gene Citocromo Oxidase I.....	74
Tabela Suplementar 1 -	Origem e referência das sequencias nucleotídicas referentes a região <i>barcode</i> do gene mitocondrial Citocromo Oxidase I da espécie <i>Chrysomya albiceps</i> utilizadas nas análises do referido estudo.....	75
Tabela Suplementar 2 -	Distribuição dos haplótipos encontrados na região <i>barcode</i> do gene mitocondrial Citocromo Oxidase I de populações de <i>Chrysomya albiceps</i> oriundas de quatro continentes.....	77

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Item	Definição
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i> (Ferramenta de Busca de Alinhamento Locais de Bases)
COI	Citocromo Oxidase 1
CytB	Citocromo B
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido Desoxirribonucléico)
IML	Instituto de Medicina Legal
IPM	Intervalo Pós-morte
IPMmax	Intervalo Pós-morte máximo
IPMmin	Intervalo Pós-morte mínimo
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i> (Espaçador Transcrito Interno)
mtDNA	DNA mitocondrial
NCBI	National Center for Biotechnology Information (Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia)
pb	Pares de base
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Reação em cadeia de polimerase)
TBE	Tris-borato-EDTA
ng	Nanograma
STR	<i>Short tandem repeat</i> (Curta repetição em tandem)
μl	Microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 ENTOMOLOGIA FORENSE	17
2.2 Dípteros Necrofagos e Crimes Violentos	19
2.3 Calliphoridae e o gênero <i>Chrysomya</i>	20
2.4 Aplicações do DNA na Entomologia Forense	21
2.5 A Técnica de DNA Barcode	23
2.6 Identificação Molecular de Dípteros Necrofagos	24
3 OBJETIVOS	27
3.1 OBJETIVO GERAL	27
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
4 ARTIGO I – MOLECULAR IDENTIFICATION OF NECROPHAGOUS DIPTERA WITH A NEW MOLECULAR MARKER MTDNA DEVELOPED THROUGH ENTROPY ANALYSIS	28
5 ARTIGO II – DIVERSIDADE GENÉTICA DE <i>CHRYSONYMA ALBICEPS</i> UTILIZANDO O GENE MITOCONDRIAL CITOCROMO OXIDASE I	62
6 DISCUSSÃO GERAL	78
7 CONCLUSÕES	81
REFERÊNCIAS	82
ANEXOS	89
CURRICULUM LATTES REFERENTE AO PERÍODO DO DOUTORADO	90

1 INTRODUÇÃO

A entomologia forense é uma área de estudo que se baseia na utilização de dados biológicos e ecológicos de insetos necrófagos em inquéritos criminais, servindo como importante ferramenta auxiliar nas análises periciais. Com vasta aplicação, os dados gerados a partir do estudo destes organismos podem auxiliar, por exemplo, na investigação do uso de entorpecentes, deslocamento de cadáveres, estimativa do intervalo pós-morte e identificação de vítimas e suspeitos. Para tanto, a correta identificação dos espécimes coletados é uma etapa crucial no processo de investigação, haja vista que é a partir dela que toda a análise transcorrerá.

A identificação morfológica das espécies é geralmente uma etapa tecnicamente complexa de ser realizada, uma vez que as formas imaturas dos espécimes possuem grande similaridade morfológica, dificultando a identificação taxonômica das espécies. Uma alternativa para solucionar este problema é representada pela possibilidade de se utilizar marcadores moleculares que proporcionem a acurada identificação em qualquer estágio de desenvolvimento dos insetos de interesse forense.

Entre os marcadores moleculares utilizados, destacam-se àqueles baseados na análise de segmentos do DNA mitocondrial (mtDNA), sendo que o mais amplamente aplicado está associado a uma porção do gene citocromo oxidase I (COI). O segmento de escolha apresenta 648 pares de bases de extensão e é conhecido como região *barcode*; alternativamente, outras regiões do genoma dos insetos podem ser utilizadas para complementar a identificação de espécimes fornecida pelo COI, destacando-se a região do espaçador interno transcrito 2 (ITS2) do DNA ribossomal, fragmentos de outros genes mitocondriais (e.g. Citocromo Oxidase II [COII] e Citocromo Oxidase B [CytB]), que também são reconhecidos como bons marcadores para identificação de espécies de insetos necrófagos.

Em alguns casos (e.g. tráfico de entorpecentes e potencial deslocamento de cadáveres), além da correta identificação dos indivíduos encontrados, faz-se necessário conhecer a distribuição geográfica das espécies e a sua estruturação genética, a fim de que os dados gerados possam ser úteis no reconhecimento das rotas percorridas. A espécie *Chrysomya albiceps* é comumente a mais encontrada

em cenas de crimes e alguns poucos trabalhos revelam dados sobre sua estrutura genética. Desta forma, o presente trabalho busca fornecer informações de marcadores moleculares úteis na identificação de dípteros necrófagos e analisar sequências mitocondriais da espécie *C. albiceps*, a fim de fornecer dados importantes acerca da sua diversidade genética que possam ser úteis na tomada de decisões em estudos forenses.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ENTOMOLOGIA FORENSE

A entomologia forense é uma ferramenta que se baseia no estudo de insetos e artrópodes para auxiliar nas investigações criminais, sendo subdivida por Lord e Stevenson (1986) em três categorias:

- **Urbana:** trata do estudo de potenciais danos decorrentes da presença de insetos em bens imóveis ou estruturais;
- **Produtos estocados:** refere-se à presença de insetos em alimentos estocados em depósitos ou armazéns;
- **Médico-legal:** relacionada principalmente a crimes com morte violenta, onde há atuação de insetos necrófagos.

Atualmente, o uso dos insetos na biologia forense se tornou mais amplo, o que pode resultar em novas divisões das categorias, na qual poderia ser adicionada a entomogenética forense, termo já utilizando por pesquisadores (Oliveira *et al.*, 2016; Vieira *et al.*, 2017), que se baseia no uso de técnicas de biologia molecular como ferramentas auxiliares na análise de insetos.

Das categorias descritas, a entomologia médico-legal é, de longe, a mais conhecida e amplamente aplicada (Catts e Goff, 1992; Byrd e Castner, 2009; Thyssen *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2019; Wells, 2019; Ries *et al.*, 2021). A primeira aplicação consistente da entomologia forense se deu no século XIX, pelo médico francês Bergeret, ao realizar a estimativa do intervalo pós-morte de um cadáver infantil encontrado em uma casa no ano de 1855; no entanto, apenas em 1894, com a publicação do livro *La faune des cadavres*, de Mégnin, que abordou a sucessão de espécies necrófagas no processo de decomposição humana, este tipo de estudo se tornou mundialmente conhecido (Benecke, 2001).

No Brasil, Roquette Pinto e Oscar Freire foram os pioneiros desta ciência, com trabalhos publicados em 1908 e 1914, respectivamente. Estes autores registraram a entomofauna de espécies necrófagas presentes em cadáveres humanos e de animais em regiões da Mata Atlântica. Devido às diferenças

regionais, ecológicas e ambientais que influenciam na diversidade e no ciclo biológico de espécies, assim como na denominada marcha de decomposição cadavérica, os resultados chamaram a atenção para a importância de estudos de sucessão de artrópodes de interesse local (Pinto, 1908; Freire, 1914; Pujol-Luz *et al.*, 2008).

Estudos de sucessão faunística de artrópodes permitem associar as espécies aos diferentes estágios de decomposição cadavérica, haja vista que cada fase apresenta características específicas que resultam na atração de determinados grupos de organismos que utilizam o cadáver como sítio de oviposição e/ou larviposição, assim como para o desenvolvimento das formas imaturas e adultas dos espécimes (Monteiro-Filho e Penereiro, 1987; Kulshrestha e Satpathy, 2001; Martinez *et al.*, 2007), fazendo com que haja um padrão aparentemente previsível do aparecimento das espécies colonizadoras (Oliveira-Costa, 2011).

Os estudos abordando a entomologia forense no Brasil ainda são escassos; porém, tem sido observado um aumento do volume de publicações publicados na área nos últimos anos (Figura 1). Estes trabalhos contemplam aspectos biológicos, ecológicos, taxonômicos e de sucessão faunística (Thyssen *et al.*, 2005; Rosa *et al.*, 2009; Kosmann *et al.*, 2011; Martins *et al.*, 2013; Vasconcelos *et al.*, 2013; Meira e Barros, 2015; D'Oliveira, 2018).

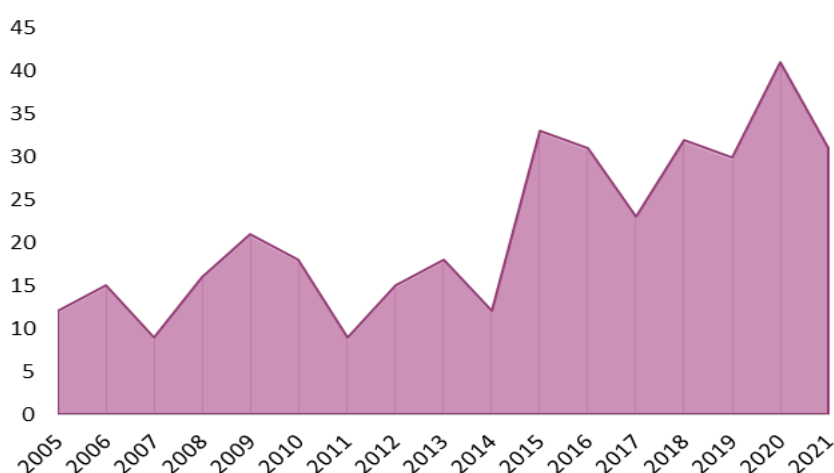


Figura 1: Número de artigos encontrados através de busca por "Forensic Entomology Brazil" nas plataformas Pubmed, SciELO e Science direct.

Estas pesquisas dão suporte às atividades periciais, apesar desta prática ser ainda pouco explorada nos institutos de polícia, havendo peritos que realizam exames entomológicos rotineiros apenas em três estados da federação: Bahia, Rio de Janeiro e Paraíba, sendo que é apenas neste último que se dispõe de um setor oficial de entomologia forense.

2.2 DÍPTEROS NECRÓFAGOS E CRIMES VIOLENTOS

Os insetos necrófagos se comportam como grandes aliados dos profissionais forenses, principalmente no que se refere à elucidação de crimes violentos. A abordagem mais frequentemente utilizada se refere à estimativa do Intervalo Pós-Morte Mínimo (IPMmin), uma vez que dípteros e coleópteros são, grosso modo, os representantes mais encontrados nos cadáveres, servindo, portanto, como eficientes relógios biológicos (Amendt *et al.*, 2004).

Muitos autores defendem que a entomologia forense é útil na determinação do IPMmin, mas não o é na do intervalo pós-morte (IPM) ou na definição do intervalo pós-morte máximo (IPMmax). A justificativa para tal consideração residiria ao fato de que o período de atividade do inseto no cadáver não se inicia necessariamente no momento exato da morte, uma vez que a sua manipulação se desse de modo a dificultar o acesso dos insetos (Amendt *et al.*, 2007; Villet *et al.*, 2010, Tuccia *et al.*, 2018). Wells (2019) defende que a estimativa utilizando métodos entomológicos pode ser realizada com a presença, ou não, dos insetos e vai além do IPMmin, tendo demonstrado esta condição ao descrever um caso elucidado com a entomologia forense, apresentando ausência de insetos no cadáver.

Os grupos de espécies de insetos associados a cadáveres são encontrados em momentos distintos. Os autores dividem estas fases de diversas formas. De acordo com Bornemissza (1957), a decomposição pode ser subdividida em cinco períodos: decomposição inicial; putrefação; putrefação escura; fermentação; e fase seca. Segundo o autor, a presença de dípteros seria observada principalmente nas três primeiras fases, com destaque para os membros da família Calliphoridae.

Os dípteros localizam o cadáver através do odor exalado e podem realizar a oviposição ou larviposição minutos após a morte (Amendt *et al.*, 2011),

preferencialmente nos orifícios naturais (e.g. ânus, boca, nariz e vagina) e lesões causadas por armas brancas ou disparos de arma de fogo. Os coleópteros, por sua vez, surgem geralmente nas fases finais da decomposição (fermentação e fase seca), quando o material orgânico se encontra ressecado e em menor quantidade, permanecendo no cadáver até que a matéria orgânica seja completamente extinta.

O IPM pode ser calculado através do Grau Dia Acumulado (GDA) ou do padrão de sucessão das espécies no cadáver (Amendt *et al.*, 2007). Para tanto, faz-se necessária a observação de dados biológicos e ecológicos da espécie, estágio de decomposição cadavérica, dados climáticos e de condições ambientais locais, assim como a realização da identificação dos espécimes associados (Pinto, 1908; Catts e Goff, 1992; Turchetto e Vanin, 2004; Byrd e Castner, 2009).

Pesquisadores de diversos países relatam a utilização exitosa dos insetos na estimativa do IPM (Greenberg, 1985; Introna *et al.*, 1998; Pujol-Luz *et al.*, 2006; Sukontason *et al.*, 2007, Wang *et al.*, 2019); no entanto, as aplicações no âmbito criminal são diversas e abrangem causa da morte, deslocamento de cadáveres e identificação de vítimas e suspeitos através de análise do conteúdo estomacal dos espécimes encontrados (Nuorteva, 1977; Zehner *et al.*, 1998; Wells *et al.*, 2001, Curic *et al.*, 2014).

Bugelli *et al.* (2017) utilizaram dípteros que se alimentavam de três corpos em um caso de filicídio-suicídio para realizar investigações toxicológicas, prática conhecida como entomotoxicologia. Os resultados das análises dos tecidos larvais e de humanos foram confrontados e ambos se mostraram positivos para três substâncias (diazepam, nordiazepam e oxazepam), enquanto as amostras dos corpos apresentaram resultado negativo, revelando que os dípteros podem servir como fontes confiáveis de informação nas análises toxicológicas em casos de corpos carbonizados.

2.3 CALLIPHORIDAE E O GÊNERO *CHRYSOMYA*

Calliphoridae é uma família de moscas calíptradas, com coloração metálica, geralmente verde e azulada, composta por 150 gêneros e mais de 1.600 espécies dispersas em todas as regiões biogeográficas (Kosmann *et al.*, 2013; Carvalho *et*

al., 2021).

O gênero *Chrysomya*, originário do Velho Mundo, era até o início da década de 1970 restrito a África, Ásia e sul da Europa. Em meados da década de 1970, este gênero foi registrado na América do Sul, a partir do reconhecimento da presença de três espécies (*C. albiceps*; *C. chloropyga*; e *C. megacephala*) provavelmente introduzidas acidentalmente através de navios com refugiados africanos que chegavam aos Estados de São Paulo e Paraná à época (Guimaraes et al., 1978). Por possuir rápida dispersão e adaptação, as espécies rapidamente se expandiram geograficamente e já foram registradas em diversos países do continente (Prado e Guimarães, 1982).

Estas espécies possuem importância médica, veterinária e forense, pois podem transportar patógenos, causar miíases em seres humanos e animais, e, por serem atraídas pelo odor, podem estar rapidamente presente em cenas de crime com presença de cadáveres (Amendt et al., 2011; Oliveira-Costa, 2011).

Atualmente *C. albiceps* é uma das espécies mais encontradas colonizando cadáveres humanos (Cainé et al., 2009). As moscas desta espécie usam o cadáver para realizar a oviposição, enquanto as suas larvas o utilizam como fonte proteica, colaborando na degradação da massa cadavérica em decomposição (Martinez et al., 2007).

Devido a sua constante frequência em locais de crime, *C. albiceps* passou a apresentar grande importância forense. A correta identificação dos espécimes encontrados em cenas de crime é de suma importância para o bom andamento das atividades periciais. Quando adultos, a identificação ocorre principalmente através de chaves taxonômicas; nos espécimes imaturos, esta atividade é de difícil realização, uma vez que as larvas possuem características morfológicas semelhantes e o número de chaves taxonômicas descritas ainda é bastante limitado (Kavitha et al., 2013; Oliveira-Costa et al., 2014), fazendo necessária a criação dos espécimes até a fase adulta ou o uso da identificação molecular.

2.4 APLICAÇÕES DO DNA NA ENTOMOLOGIA FORENSE

Métodos moleculares têm sido frequentemente utilizados para auxiliar na análise dos vestígios entomológicos, principalmente no que se refere à

identificação de espécies, tanto de insetos encontrados no cadáver e/ou locais de crime (Cainé *et al.*, 2009), quanto na identificação do conteúdo estomacal presente nestes insetos, que pode ser útil na identificação humana ou não-humana (Li *et al.*, 2011). O isolamento e caracterização do DNA presente em insetos hematófagos ou necrófagos apresenta protocolos que datam da década de 1990, a exemplo do *Southern blotting* utilizado por Coulson *et al.*, (1990) para realizar o *fingerprint* humano a partir do sangue encontrado no sistema digestório de espécies de mosquitos.

As técnicas baseadas no DNA avançaram e com a popularização e relativa acessibilidade, alguns métodos (e.g. sequenciamento de nucleotídeos e genotipagem) proporcionaram aplicação e uso mais amplos. Os resultados obtidos podem auxiliar na análise de deslocamento de cadáveres através do estudo da estruturação genética de espécies de insetos necrófagos, não aplicado na rotina forense, mas conceitualmente demonstrado por meio de pesquisas, como por exemplo com espécies de Chrysomyinae por Hall *et al.* (2001) e Desmyter e Gosselin (2009), na identificação de vítimas e suspeitos em crimes que vão do homicídio aos sexuais, assim como na estimativa do IPM, através da identificação molecular dos espécimes de insetos encontrados (Li *et al.*, 2011, Rolo *et al.*, 2013; Njau *et al.*, 2015, Park *et al.*, 2018).

Trabalhando com uma simulação de agressão sexual seguida de morte, Clery (2001) adicionou sêmen humano na dieta de dípteros larvais e, após 145 horas de exposição, conseguiu isolar perfis de marcadores microssatélites do cromossomo Y através da análise do conteúdo estomacal dos espécimes. Coulson *et al.* (1990) mostraram a possibilidade de se isolar DNA humano presente em mosquitos da família Culicidae que haviam realizado hematofagia há 15h. Esses trabalhos mostram o potencial da entomologia forense na investigação de suspeitos e vítimas de crime sexual, seguido ou não de homicídio.

A possibilidade de se obter mtDNA humano presente no conteúdo estomacal de larvas necrófagas, auxiliando na identificação da matrilinearidade de vítimas e suspeitos, foi relatada por Wells *et al.* (2001). Linville *et al.* (2004) revelaram a viabilidade da amplificação de locos microssatélites autossômicos e de mtDNA de espécimes larvais estocados durante seis meses, dado importante para auxiliar em casos em que há ausência física do cadáver ou quando há contestação dos

dados de identificação.

Na estimativa do IPM, a identificação molecular de espécies auxilia em diversos casos, como por exemplo em situações em que os insetos completos estão ausentes, havendo a presença apenas de fragmentos dos espécimes, ou quando a identificação taxonômica não é conclusiva, em decorrência da semelhança morfológica entre os espécimes (Liu *et al.*, 2013).

2.5 A TÉCNICA DE DNA *BARCODE*

DNA *barcode* pode ser traduzido livremente como o código de barras do DNA, tendo este termo surgido com o *The Barcode of Life Project* (Projeto do Código de Barras da Vida, em tradução livre), projeto idealizado por pesquisadores da Universidade de Guelph (Canadá), que tinha como objetivo encontrar uma região do DNA que fosse capaz de identificar qualquer espécie animal (Hebert *et al.*, 2003).

O DNA mitocondrial foi escolhido como potencial marcador universal por apresentar características que conferem maiores possibilidades de determinação de padrões filogenéticos e de detecção de variações intra- e interespecíficas (Harrison, 1989), a exemplo da herança uniparental (materna), estrutura genômica simples, com apenas 37 genes dispostos de forma circular (Figura 2), e taxa de mutação até 10 vezes maior do que a do DNA nuclear (Brown *et al.*, 1979; Avise, 1991).

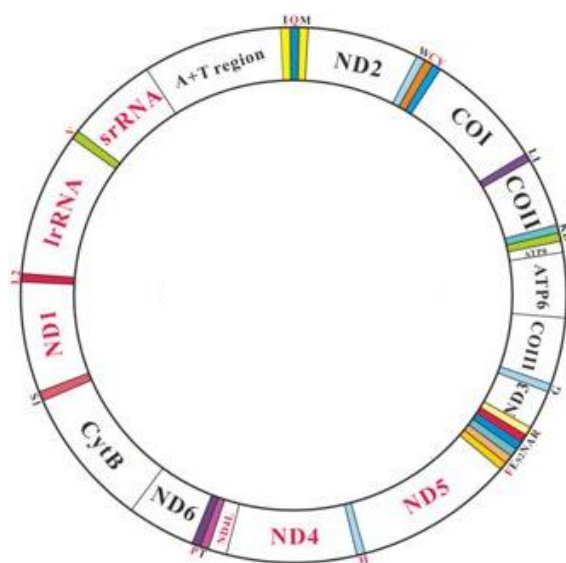


Figura 2: Representação da estrutura do DNA mitocondrial. Fonte: Hao *et al.* (2017).

Dos 13 genes codificadores de proteínas do mtDNA, o gene mitocondrial citocromo oxidase I (COI) foi eleito como o mais indicado para corresponder à região *barcode*, representada por um fragmento de 648 pb. A escolha deste segmento se baseou no fato de já existirem *primers* robustos que recuperam a extremidade 5' do COI de várias espécies animais, alto sinal filogenético e padrão de evolução que permite discriminar espécies próximas e grupos filogeográficos (Hebert *et al.*, 2003).

A técnica do DNA *barcode* consiste num sistema simples, baseado na amplificação e sequenciamento da região-alvo. Após a obtenção das sequências, efetua-se uma busca por segmentos homólogos em bancos de dados públicos de sequências nucleotídicas. A variação intraespecífica deve ser de até 3%, enquanto a interespecífica deve ser superior a este valor.

A facilidade e bons resultados obtidos estimularam a utilização da região *barcode* nos estudos de identificação molecular, resultando em um expressivo aumento no número de sequências depositadas nos bancos de sequências nucleotídicas (Schoch *et al.*, 2020). Este método vem sendo amplamente utilizado em diversas áreas, auxiliando na identificação de espécies crípticas (de Carlos *et al.*, 2020), reconhecimento de novas espécies (Lopes-Andrade e Grebennikov, 2015), rastreio de venda ilegal de animais silvestres (Coghlan *et al.*, 2012; Feitosa *et al.*, 2018), venda adulterada de pescados (Chiao-Hao *et al.*, 2016, Calegari *et al.*, 2020), entre outras aplicações (GilArriortua *et al.*, 2015).

2.6 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE DÍPTEROS NECRÓFAGOS

A correta identificação dos espécimes encontrados nos locais de crime é uma etapa imprescindível nas investigações criminais, considerando-se que esta é diretamente relacionada com a acurácia do cálculo da determinação do intervalo pós morte (Oliveira-Costa, 2011).

Os dípteros em estágios larvais são comumente os mais encontrados, haja vista que necessitam do material decomposto para o desenvolvimento do seu ciclo biológico (Vanin *et al.*, 2008). A identificação destes espécimes é uma tarefa difícil em função da carência de chaves taxonômicas de identificação de imaturos, assim como pelo fato de muitas espécies apresentarem diferenças morfológicas

discretas, requerendo a atuação de um profissional especialista. Desta forma, para possibilitar a identificação das espécies com maior precisão, faz-se necessária a criação dos espécimes larvais até a fase adulta, procedimento que dispende bastante tempo no decorrer das investigações criminais (Benecke, 1998).

Na fase adulta, a identificação morfológica também não é uma atividade simples, uma vez que muitas chaves de identificação se baseiam em caracteres específicos. Na família Sarcophagidae, por exemplo, a análise é realizada geralmente através da observação de características externas da genitália masculina, dificultando a identificação de fêmeas e impossibilitando a identificação em casos em que os espécimes, independente do gênero, estão morfológicamente danificados (Thyssen, 2007; Vairo *et al.*, 2015; Sontigun *et al.*, 2018).

Uma alternativa para contornar os problemas de identificação taxonômica reside na utilização de marcadores moleculares de DNA, aplicáveis a espécimes em qualquer estágio do desenvolvimento e que faz uso de apenas um pequeno fragmento do inseto. Sperling *et al.* (1994) foram os primeiros a propor a identificação molecular de dípteros necrófagos califorídeos ao utilizarem uma região de 2.300pb de mtDNA para três espécies (*Phaenicia sericata*, *Phormia regina* e *Lucilia illustris*). Desde então, diversos trabalhos de taxonomia molecular têm sido conduzidos através do emprego de diferentes técnicas, tais como RFLP (Ratcliffe *et al.*, 2003; Schroeder *et al.*, 2003), qPCR (Jang *et al.*, 2019), Pirosequenciamento (Zhang *et al.*, 2015) e sequenciamento de DNA (Wallman e Donnellan, 2001; Harvey *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 2011; Zajac *et al.*, 2016; Park *et al.*, 2018).

Devido as características do mtDNA e da região do *barcode*, este se tornou o marcador mais utilizado para a identificação de espécies, sendo amplamente aplicado na identificação taxonômica de espécies de dípteros de interesse forense. No entanto, limitações na separação taxonômica de espécies próximas são observadas, incentivando a busca por regiões alternativas (Harvey *et al.*, 2008; Sonet *et al.*, 2012).

Diversas regiões do mtDNA vêm sendo utilizadas como alternativa ao COI, tais como: 16s, COII, CytB, ND5 (Junqueira *et al.*, 2002; Zehner *et al.*, 2004; Zaidi

et al., 2011; Kavitha *et al.*, 2012; GilArriortua *et al.*, 2013; Bortolini *et al.*, 2018). Neste contexto, destaca-se o uso de segmentos do gene mitocondrial citocromo B. Estudos de Parson *et al.* (2000) em vertebrados evidenciaram o seu potencial como marcador na biologia forense, havendo, desde então, reiteradas comprovações da sua aplicabilidade em análises filogenéticas e de taxonomia em diversas espécies de invertebrados (Branicki *et al.*, 2003; Hajibabaei *et al.*, 2007; GilArriortua *et al.*, 2013; Limsopatham *et al.*, 2018).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Identificar e analisar a estrutura genética de dípteros necrófagos a partir do uso de marcadores mitocondriais.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar molecularmente espécies de dípteros;
- Avaliar a eficácia de regiões dos genes mitocondriais Citocromo Oxidase I e Citocromo B na identificação de dípteros;
- Validar um novo marcador molecular para a identificação de dípteros com interesse forense, desenhado a partir de um fragmento do gene CytB;
- Observar a diversidade genética da espécie *Chrysomya albiceps* em diferentes localidades utilizando a região *barcode* do COI.

4 ARTIGO I - MOLECULAR IDENTIFICATION OF NECROPHAGOUS DIPTERA WITH A NEW MOLECULAR MARKER MTDNA DEVELOPED THROUGH ENTROPY ANALYSIS

*Bárbara Natieli Silva Pereira¹

pereira.bns@gmail.com

Carlos Alberto Santiago Figueirêdo Júnior¹

cjsantifigo@hotmail.com

Marcus Vinicius de Aragão Batista²

[mvabatista@hotmail.com](mailto:mvatista@hotmail.com)

Tadeu Moraes Cruz^{1,3}

tadeumcruz@hotmail.com

José Roberto Pujol-Luz⁴

jrpujol@unb.br

Valdir de Queiroz Balbino¹

vqballbino@gmail.com

¹Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Genética, Laboratório de Bioinformática e Biologia Evolutiva, Recife, Pernambuco, Brasil

²Laboratório de Genética Molecular e Biotecnologia, Departamento de Biologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, Sergipe, Brasil.

³Governo do Estado de Pernambuco, Secretaria de Defesa Social, Recife, Pernambuco, Brasil.

⁴Universidade de Brasília, Departamento de Zoologia, Brasília, Brasil

*Corresponding author

Keywords: Diptero fauna, Cytochrome B, Cytochrome oxidase I, Forensic Entomology, Taxonomy molecular

Abstract

Forensic entomology has been applied in legal medicine to assist with the elucidation of violent crimes, acting mainly in the determination of the postmortem interval (PMI). The correct identification of the species found in a crime scene is a fundamental step, however is often a difficult task, especially in larvae considering the few morphological differences between the species in this stage. To address such limitations, molecular taxonomy through molecular approaches has become a straightforward and time-effective technique. This current work aimed to develop a new molecular marker for identification of Diptera specimens with forensic interest. The region of the marker was chosen through entropy analysis, the primer was developed from in silico analysis, the applicability and efficiency was evaluated using dipterous from 14 species from three families: Calliphoridae, Muscidae and Sarcophagidae, as well as was validated in maggots collected in nine decomposed corpses admitted to Forensic Medicine Services in the states of Paraíba and Pernambuco. The identified region corresponded to a fragment of the mitochondrial Cytochrome B gene and the results revealed that the developed marker showed more robustness and power to discriminate necrophagous Diptera than the traditional COI region, with genetic distance values between 8.4% and 21.6%. From the species collected in the corpses was possible discriminate six species belonging to three families, the specie *Chrysomya albiceps* was the most

predominant recorded in six decomposed corpses. Also, our study represents the first report of *Peckia chrysostoma* in state of Paraíba.

Introduction

Forensic entomology has applied arthropods in biological and ecological features to improve criminal investigations (Pujol-Luz et al., 2008a). Among insect orders, Diptera represent one of the main groups of forensic interest and has an important role to assist in investigations since necrophagous insects attracted by decomposition odors are usually the first organisms to find and colonize the corpse (Lord and Stevenson, 1986; Oliveira-Costa, 2013; Ramos-Pastrana et al., 2018). In fact, insects could provide a range of criminal evidence in cases where death was caused by drugs consumption (Bugelli et al., 2017); crimes of abandonment and ill-treatment of the unable (Benecke et al., 2004; Wells and Stevens, 2008); identification of victims and suspects (Campobasso et al., 2005); displacement of corpses and estimation of the post-death interval (Catts and Goff, 1992; Pujol-Luz et al., 2008a). However, the forensic entomology feasibility relies on two main requirements: understanding the colonization by insects of the corpse as well as environmental and biological variables, since conditions that impact the cadaveric decomposition and can mediate changes in the biological cycles of insects, which makes the understanding of the biological patterns across geographic region crucial (Pinto, 1908; Freire, 1914; Schoenly et al., 2006; Tomberlin et al., 2011).

In general, the process of insect succession is subdivided in five different stages following the level of the body decomposition (Catts and Goff, 1992): initial decomposition, putrefaction, dark putrefaction, fermentation and dry

putrefaction (Bornermisza, 1957). Each of these stages attracts a different set of species, which use the corpse as a food source or a site for oviposition and larval development. Among arthropods, the order Diptera represents the main colonizer, and its species are frequently associated with the first three stages of the insect succession (Biavati et al., 2010; Cruz et al., 2021). The most representative family, Calliphoridae, is usually the first to locate and oviposit in cadavers (Cainé et al., 2009, Oliveira and Vasconcelos, 2010; Kosmann et al., 2011; Moophayak et al., 2014).

To support correct predictions of postmortem interval using the association between entomofauna and decomposition stage, it is crucial to correctly identify the species found, once misidentifications can invalidate the estimated postmortem interval. A common approach to identify arthropod species is through taxonomic keys based on morphological traits. However, many species present larval stages with great morphological similarity, requiring them to be raised until the adult stage for an adequate species identification. Although it is a valid approach, it compromises the speed of the investigations (Liu and Greenberg, 1989; Oliveira and Vasconcelos, 2010).

Alternatively, molecular markers can be used to identify species at any development stage, thus avoiding the time-constraints associated with the rearing of organisms from larvae to adult (Otranto and Stevens, 2002). The barcode region of the Cytochrome Oxidase I (COI) gene in the mitochondrial DNA (mtDNA) has been reported as a very efficient molecular marker for species identification (Harvey et al., 2003; Hebert et al., 2003; Rolo et al., 2013, GilArriortua et al., 2014; Fuentes-López et al., 2020). However, some studies have reported limited discriminatory capacity for this marker in close related

species (Zaidi et al., 2011). Therefore, other mtDNA genes have been explored to boost taxonomic specificity despite low interspecific genetic diversity, from the use of alternative or complementary markers for instance: Cytochrome Oxidase II (COII), Cytochrome B (CytB) and NADH dehydrogenase subunit 1 and 5 (NAD1 and NAD5) (Junqueira et al., 2002; Zehner et al., 2004; Harvey et al., 2008; Zaidi et al., 2011; Kavitha et al., 2012; Sonet et al., 2012; GilArriortua et al., 2014; Bortolini et al., 2018).

In this context, given the need to identify more informative regions within the genetic markers, the present study aimed to design an effective molecular marker for the DNA barcode technique, compare it with the barcode region of the mitochondrial COI gene, as well as to identify specimens of maggots with forensic interest recovered from human cadavers of the Forensic Medicine services of the states of Paraíba and Pernambuco, Brazil.

Materials and Methods

Samples collection

Adult diptera were collected in December 2017 in the necropsy room of the Petrolina Institute of Forensic Medicine, Pernambuco using Ferreira-type traps (1978) containing 100g of cow beef and exposed for 72 hours, while being suspended at 1.30 meters from the ground. The captured specimens were anesthetized using ethyl acetate, and then individually stored in tubes containing absolute alcohol and cooled at - 20 °C. Samples previously identified by morphological characters from the entomological collection of the University of Brasília, collected in the Federal District and dry preserved, were used to increase the number species in the validation of the new marker. (Table 1).

Maggots were obtained between November 2014 and May 2015 from 9 decomposed human cadavers recently admitted to the Forensic Medicine services of the cities of Campina Grande and João Pessoa (State of Paraíba) and Recife (State of Pernambuco). Specimens were collected with the aid of surgical tweezers, packed in identified tubes containing 96% ethyl alcohol and preserved at -20 °C.

Primer design

Sequences of the 12 mitochondrial genes (NADH dehydrogenase subunit 1 to 6, Cytochrome oxidase subunit I to III, Cytochrome B, ATP synthase subunit 6 and 8) from 13 Calliphoridae species and one sequence from each external group; Sarcophagidae and Tachinidae (Supplementary table 1) were obtained at the Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). In order to identify phylogenetically informative regions, the nucleotide sequences were aligned with the muscle algorithm (Edgar, 2004) and submitted to entropy analysis through the DAMBE program (Xia and Xie, 2001), using a window size equal to 100 to reduce the noise of the graph.

The regions identified were analyzed individually through construction of a phylogenetic tree by a Neighbor-Joining model and genetic distance matrix by kimura 2 parameters method with 1000 bootstrap replicates, both were calculated on MEGA X software (Kumar et al., 2018). For comparison, a phylogenetic tree was generated using the same methodology with the 12 concatenated mitochondrial genes.

The graph resulting from the entropy analysis was used to discriminate the most suitable regions for definition of degenerate primers. Primers were manually designed from the alignment of regions with the lowest entropy values

to amplify a DNA fragment up to 1200 bp. Primers characteristics were evaluated with Oligo Analyzer v. 3.1 (<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer>).

Genomic DNA extraction

Individual DNA was isolated through one fly leg using chelex method (Huang et al., 2009). For the isolation from maggots DNA, was used the whole specimen at L1 stage and only the two posterior segments for early stages L2 and L3 were used. DNA extraction was carried out with the phenol-chloroform method, following the protocol proposed by Isola et al. (1994), modified to half reaction.

DNA amplification and sequencing

To amplify the fragments of mtDNA, individual PCR reactions were performed in a final volume of 25 µl, containing 100 ng of genomic DNA, 12.5 µl of GoTaq® Colorless Master Mix 2X (Promega, Fitchburg, Wisconsin, USA), 0.6 µM of each primer [COI: LCO1490 and HCO2198 (Folmer et al., 1994) and CytB: TagCytB_936 and TagCytB_1547 (current work)], and the remaining volume was completed with nuclease free water. Conditions of amplification for both markers were as follow: initial denaturation at 94° C for 5 minutes; 35 cycles of 94° C for 30 s, 47° C for 60 s, 72° C for 60 s and 72° C for 10 minutes. Amplicons were visualized on 1% agarose gel electrophoresis stained with ethidium bromide.

PCR products were purified using Wizard® SVGel and PCR Clean-Up System (Promega, Fitchburg, Wisconsin, USA), following the manufacturer's protocol. Purified products were quantified in NanoDrop® and subsequently diluted for 10 ng/µl. Sequences were obtained from ABI PRISM® 3500 Genetic Analyzer with the Big Dye Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Cleveland, Ohio, USA). Sequence quality and contig assembly were performed using Pregap4 v. 1.5 and Gap4 software from Staden Package® (Staden, 1996). The sequence identities were analyzed from homology search on GenBank data using BLASTn software online at NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Data analysis

Homologous sequences were retrieved and aligned with the specimen consensus sequences using Muscle alignment algorithm (Edgar, 2004). Phylogenetic analysis for clustering of monophyletic groups was inferred using Neighbor-Joining method and the genetic distance matrix by Kimura 2-parameters model with 1000 bootstrap replicates, both were calculated on MEGA X software (Kumar et al., 2018). Genetic diversity indexes were estimated using DNAsp v. 5.0 software (Librado and Rozas, 2009).

Results

Selection of informative genomic regions and primers validation

Four regions with low entropy and possibly useful for the identification of Diptera species were found in the NADH 2, 3, 6 and CytB genes with sizes of 198, 352, 379 and 343 nucleotides respectively. Among the trees generated,

the NADH6 gene showed greater similarity in topology to the model tree and COI barcode region (Supplementary figure 1 and 2).

The genetic distance matrix obtained through the CytB gene fragment (Supplementary table 2) showed interspecific values less than 3% and intraspecific values greater than 3%. With values greater than the COI barcode region (Supplementary table 3), this region was chosen for develop the pair of primers named Tag_CytB (Table 2) that spans a fragment size of 611 bp including the diagnostic sequence.

Comparative molecular taxonomy: COI Vs Tag_CytB

In total 60 DNA sequences were analyzed, 30 for each marker amplified, using DNA from 14 species of necrophagous dipterans distributed in three families. Homology against GenBank sequences query cover was 100 and percentage identity between 99.27 and 100 for the COI gene. In CytB gene the query cover values were 94 and 100, while the percentage of identity ranged from 98.89 to 100, where was not identified homologous sequences for the species *Hemilucilia semidiaphana*, *Lucilia eximia* and *Oxysarcodexia admixta*, therefore, we used sequences from the species *Hemilucia sp.*, *Lucilia coeruleiviridis* e *Oxysarcodexia varia* (Supplementary table 4).

The discrimination strength for each marker assuming the K2P model of genetic distance, revealed a genetic differentiation among species greater than 3% for both species and markers. Values obtained using the barcode region of the COI gene were predominantly lower than those obtained with the primer pair Tag_CytB for the CytB gene (Table 3).

The lowest values of genetic distance found refer to the barcode region of the COI gene with the differentiation between *Chrysomya megacephala* vs.

C. putoria 3,8% and *Peckya chrysostoma* vs. *P. uncinata* 4.2%, while for the CytB values were twice higher; 10.0% and 8.8% respectively. The highest value obtained among the 14 species corresponded to the CytB gene among the species *Peckya chrysostoma* vs. *Synthesiomyia nudiseta* 21.6% (COI 12.2%). Comparing the values between families, the greatest differentiation was observed between Calliphoridae, *C. albiceps* vs. *C. megacephala* 13.3% (CytB); Muscidae, *Musca domestica* vs. *Synthesiomyia nudiseta* 17.3% (CytB); Sarcophagidae, *P. chrysostoma* vs. *Sarcophaga ruficornis* 16.6% (CytB). For the COI gene, across all families these indexes were lower corresponded to 5.4%, 12.7% and 7.8% respectively.

Regarding phylogeny, both markers grouped sequences by species, but without separating by families (Figure 1).

Molecular taxonomy of maggots with Tag_CytB and species diversity

A total of 118 sequences with 540 nucleotides were obtained and the search for homologous sequences in GenBank through the BLASTn algorithm showed query cover of 94 e 100 and percentage identity between 98 and 100% with nucleotide sequences of the species *Chrysomya albiceps*, *C. megacephala*, *C. putoria*, *Cochliomyia macellaria* (Calliphoridae), *Peckia chrysostoma* (Sarcophagidae) and *Hermetia illucens* (Stratiomyidae). From the phylogenetic tree, it was possible to observe clustering within six groups, confirming the occurrence of six species distributed among ten decomposed cadavers (Figure 2).

Distance and genetic diversity

To evaluate the efficiency of the Tag_CytB marker on species differentiation, a genetic distance matrix was generated using the Kimura 2

parameters model. In all species, the intraspecific distance obtained was less than 3% (table 5): *Cochliomyia macellaria* (0.06%), *Chrysomya putoria* (0.07%), *Hermetia illucens* (1.1%) and for the other species the value found was 0%. Interspecifically, the lowest value was 9.7% between *C. putoria* and *Cochliomyia macellaria* (Calliphoridae); the highest value was 26.6% among the species *H. illucens* (Stratiomyidae) and *C. macellaria* (Calliphoridae).

Hermetia illucens revealed the highest nucleotide diversity (PI) (0.00718), followed by *C. putoria* (0.00494), *Cochliomyia macellaria* (0.00339) and *C. albiceps* (0.00034). The number of haplotypes is 7 for *H. illucens*, four for *C. putoria*, 14 for *C. macellaria* and 3 for *C. albiceps*. We observed that *C. macellaria* accounts for the highest number of polymorphic sites (17), followed by *H. illucens* (12), *C. putoria* (7), and *C. albiceps* (5).

Sequences of the species *Chrysomya megacephala* and *Peckia chrysostoma*, revealed one haplotype and absence of genetic diversity.

Discussion

Entropy method revealed four regions with capacity for species discrimination similar to DNA barcode and generated trees provided support for choosing fragments. However, as the study did not have the purpose of a phylogenetic review, but of molecular identification, genetic distance analysis was applied for the choice of the region, thus, although the NADH6 gene had greater topological similarity with the guide trees, we chose the CytB gene for primer development, as it revealed values higher than traditional COI barcode region.

Due to its confirmed effectiveness in phylogenetic and molecular taxonomic studies, Cytochrome B (CytB) gene has been suggested as a good candidate marker for forensic entomology (Parson et al., 2000, Branicki et al., 2003, Cainé et al., 2006, Hajibabaei et al., 2007, GilArriortua et al., 2013). In agreement with these authors, our *in silico* and experimental study identified an interspecific variation of less than 3% and an intraspecific variation higher than this threshold, which follow the guidelines suggested by Hebert et al. (2003) in the global identification of species regards the assumptions for species identification using molecular taxonomy.

A molecular marker that distinguishes the species with robustness eliminates the dubiousness of the identification and makes the investigation more accurate, thus helping the correct progress of the research. Identifying Diptera with a fragment from the COI gene, GilArriortua et al. (2014) achieved good values of interspecific differentiation: *C. albiceps* x *C. megacephala* (7.0%); *C. albiceps* x *C. putoria* (7.8%); and *C. putoria* x *C. megacephala* (5.4%). However, our values with Tag_CytB were higher for all these comparisons.

Several authors have already reported a problem in the morphological and molecular identification of the paraphyletic species *L. cuprina* and *L. sericata*, so the description of a marker that can help in the solution of this problem makes it an important contribution. According to Zaidi et al. (2011), the divergences in the sequences of the COI gene is insufficient to distinguish the species *L. cuprina* and *L. sericata* (Calliphoridae), because the genetic distance between these two species is markedly low (0.78%). Based on *in silico* analysis, our data suggest that the same interspecific comparison using the Tag_CytB

region was able to separate the species with a strength about six time higher (4.6%) compared to COI. Therefore, although the proposed region for the universal identification of species refers to the fragment of the COI gene and we observe that this marker has efficacy for the proposed activity, through the values obtained in our work, we could verify that the Tag_CytB primer pair show greater robustness in molecular identification of species of Diptera.

The observed predominance of higher values of genetic distance in the in loco analyzes of our work were obtained with the Tag_CytB primer and is justified by the molecular marker, different from COI, have to aim identify only dipterans, thus being developed by evaluating the mitogenome of species of this order, which allowed anchoring the most conserved regions of the group.

Regarding the absence of CytB gene sequences deposited in databases for three of the 15 species studied, it is important to emphasize that the CytB gene is commonly used as an alternative to COI and has less use, making it difficult to search for homologous sequences. The opposite occurs with COI gene, which has wide characterization and a considerable number of studies published mainly after “The Barcode of Life Project”, that boosted the generation and deposit of nucleotide sequences in the databases. As noted by Porter and Hajibabaei (2018), since the creation of the Barcode Data System of Life (BOLD) in 2013, the deposit of COI-related strings has increased approximately 51% per year. This data reinforces the importance of depositing Diptera sequences with alternative genes, in order to collaborate with future works in molecular taxonomy.

Diptera is an important order in forensic entomology and the Calliphoridae family stands out because is world-wide distributed, clusterize

more than 1000 species and is commonly associated with decomposed corpses. According to this, in our work Calliphoridae was present in nine of ten cadavers studied, showing their great relevance in forensic analysis (Kosmann et al., 2013). Similar data have been reported in a study carried out at the Institute of Legal Medicine in Recife, Pernambuco, where the presence of the Calliphoridae can be observed in all cadavers analyzed (fourteen) with Diptera maggots (Oliveira and Vasconcelos 2010), as well as in different states in the Brazilian territory, through collections of human cadavers and animal baits (Vasconcelos and Salgado 2014, Rosa et al., 2011, Carvalho et al., 2000).

The genus *Chrysomya*, one of the most important and studied for having medical and veterinary relevance and forensics (Monzon et al., 1991; Catts and Goff 1992), obtained a preponderant number of records with its species colonizing eight corpses. This genus is exotic in the New World and by having easy adaptation and rapid dispersion is often found in decomposed corpses. (Guimarães et al., 1979; Gagné 1981, Wells and Greenberg, 1992).

The species *C. albiceps* has been better represented, but it is not considered novelty, since its expressive representation is described in the literature in several regions of Brazil and the world, being an important forensic indicator (Cainé et al., 2009; Corrêa et al., 2010; Kosmann et al., 2011; Ururahy-Rodrigues et al., 2013, Vasconcelos et al., 2013). Its high frequency can be understood by this species to have easy adaptation to diverse environments and substrates, besides rapid displacement and interspecific predation.

The species *C. macellaria* obtained the second largest representation, it has necrobiontophagous larvae, then develop only in putrid meats or

decomposing organic matter, and consequently it is frequently found in decomposed corpses as already reported by Oliva (2007), Koller et al. (2011) and Vasconcelos and Salgado (2014). However, *C. macellaria* suffers predation by *C. albiceps*, which has been causing expulsion of this species from large urban centers, reducing its populations and causing them not to colonize the same corpse (Aguiar-Coelho et al., 1995; Salviano et al., 1996; Andrade et al., 2002).

In this work, we report the presence of *C. macellaria* only in the countryside of Paraíba, especially the corpses PB C3 and C4, which could be observed colonization shared with *C. albiceps*, in a smaller number of specimens. This data is attractive, given the greater number of *C. macellaria* found, thus *C. albiceps* probably arrived at the corpse after the colonization of *C. macellaria* and until the moment of collection they had not started the predation activity.

From the six species detected, five of them (*C. albiceps*, *C. megacephala*, *C. putoria*, *C. macellaria* and *Hermetia illucens*), are constantly described colonizing decomposed human cadavers (Lord et al., 1994; Carvalho et al., 2000; Andrade et al., 2005; Pujol et al., 2008b), whereas the species *Peckia chrysostoma*, belonging to the family Sarcophagidae, is frequently described as a colonizer of baits and pig carcasses (Barros et al., 2008; Vasconcelos and Araujo, 2012). When we speak of human cadavers, only one study reports *Peckia chrysostoma* presence (Vasconcelos et al., 2014), this being the second report of colonization in a human corpse and the first report of the species in Paraíba. In both works the species was found in corpses present

in the coastal region of the Northeast of Brazil, and may become important for criminal investigations

In conclusion, our results reinforce the existence of dipterofauna variation according to the environment and the need for further investigation of these species, since dipterans with forensic interest may be being ignored. In addition, the Cytochrome B gene fragment amplified with the Tag_CytB primer, designed in this work, had greater separation power of the studied species than the Cytochrome Oxidase I fragment amplified with the HCO-LCO primer, known as region barcode, thus becoming an effective option for molecular identification of Diptera.

References

- Aguiar-Coelho VM, Queiroz MMC, Milward-de-Azevedo EMV (1995) Associações entre larvas de *Cochliomyia macellaria* (Fabricius) e *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera, Calliphoridae) em condições experimentais. *Revista Brasileira de Zoologia* 12 (4): 983-990.
- Andrade JB, Rocha FA, Rodrigues P, Rosa GS, Faria LDB, Zuben CJV, Rossi MN, Godoy WAC (2002) Larval dispersal and predation in experimental populations of *Chrysomya albiceps* and *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae). *Memorial Instituto Oswaldo Cruz* 97 (8): 1137-1140.
- Andrade HTA, Varela-Freire AA, Batista MJA, Medeiros JF (2005) Calliphoridae (Diptera) Coletados em Cadáveres Humanos no Rio Grande do Norte. *Neotropical Entomology* 34 (5): 855-856.
- Barros RM, Mello-Patiu CA and Pujol-Luz JR (2008) Sarcophagidae (Insecta, Diptera) associados à decomposição de carcaças de *Sus scrofa* Linnaeus (Suidae) em área de Cerrado do Distrito Federal, Brasil. *Revista Brasileira de Entomologia* 52 (4): 606-609.
- Benecke M, Josephi E and Zweihoff R (2004) Neglect of the elderly: Forensic entomology cases and considerations. *Forensic Science International* 146: S195-S199.
- Biavati GM, Santana FHA and Pujol-Luz JR (2010) A Checklist of Calliphoridae Blowflies (Insecta, Diptera) Associated with a Pig Carrion in Central Brazil. *Journal of Forensic Sciences* 55 (6): 1603-1606.
- Bornemissza GF (1957) An analysis of arthropod succession in carrion and the effect of its decomposition on the soil fauna. *Australian Journal Zoology* 5: 1-12.
- Bortolini S, Giordani G, Tuccia F, Maistrello L and Vanin S (2018) Do longer sequences improve the accuracy of identification of forensically important Calliphoridae species? *PeerJ* 6:e5962.
- Branicki W, Kupiec T, Pawlowski R (2003) Validation of Cytochrome b Sequence Analysis as a Method of Species Identification. *Journal of Forensic Sciences* 48 (1).
- Bugelli V, Papi L, Fornaro S, Stefanelli F, Chericoni S, Giusiani M, Vanin S and Campobasso CP (2017) Entomotoxicology in burnt bodies: a case of maternal filicide-suicide by fire. *International Journal of Legal Medicine* 131: 1299-1306.
- Cainé LM, Real FC, Pancorbo MM, Lima G, Pontes L, Abrantes D and Pinheiro F (2006) Genetic identification of forensically important Calliphoridae in Portugal. *International Congress Series* 1288: 846-848.
- Cainé LM, Real FC, Salonã-Bordas MI, Pancorbo MM, Lima G, Magalhães T and Pinheiro F (2009) DNA typing of Diptera collected from human corpses in Portugal. *Forensic Science International* 184: e21-e23.
- Campobasso CP, Linville JG, Wells JD and Introna F (2005) Forensic genetic analysis of insect gut contents. *The American Journal of Forensic Medicine and Pathology* 26: 161-5.
- Carvalho LML, Thyssen PJ, Linhares AX, Palhares FAB (2000) A Checklist of Arthropods Associated with Pig Carrion and Human Corpses in Southeastern Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 95 (1): 135-138.
- Catts EP and Goff ML (1992) Forensic entomology in criminal investigations. *Annual Review of Entomology* 37: 253-72.

- Corrêa EC, Koller WW, Barros ATM (2010) Abundância relativa e sazonalidade de espécies de *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) no Pantanal Sul-Mato Grossense, Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 19 (2): 85- 88.
- Cruz TM, Barbosa TM, Thyssen PJ and Vasconcelos SD (2021) Diversity of Diptera species associated with pig carcasses in a Brazilian city exposed to high rates of homicide. *Papéis avulsos de zoologia* v.61: e20216101.
- Edgar RC (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput, *Nucleic Acids Research* 32 (5): 1792-97.
- Ferreira MJM (1978) Sinantropia de dípteros muscóides de Curitiba, Paraná. I. Calliphoridae. *Revista Brasileira de Biologia* 38: 445-454.
- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R and Vrijenhoek R (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3 (5): 294-299.
- Freire O (1914) Algumas notas para o estudo da fauna cadavérica na Bahia. *Gazeta Medica da Bahia* 46 (4): 149-162.
- Fuentes-López A, Ruiz C, Galián J and Romera E (2020) Molecular identification of forensically important fly species in Spain using COI barcodes. *Science & Justice* 60: 293-302.
- Gagné RJ (1981) *Chrysomya Spp.*, Old World Blow Flies (Diptera: Calliphoridae), Recently Established in the Americas. *Entomological Society of America*, 27 (1): 21-22.
- GilArriortua M, Bordas MIS, Cainé LM, Pinheiro F, Pancorbo MM (2013) Cytocrome b as useful tool for the identification of blowflies of forensic interest (Diptera: Calliphoridae). *Forensic Science International*, 228: 132-136.
- GilArriortua M, Bordas MIS, Kohnemann S, Pfeiffer H and Pancordo MM (2014) Molecular differentiation of central European blowfly species (Diptera: Calliphoridae) using mitochondrial and nuclear genetic markers. *Forensic Science International*, 242: 274-282.
- Guimarães JH, Prado AP, Buralli GM (1979) Dispersal and distribution of three newly introduced species of *Chrysomya* Robineau-Desvoidy in Brazil (Diptera, Calliphoridae). *Revista Brasileira de Entomologia*, 23: 245-255.
- Hajibabaei M, Singer GAC, Clare AL, Hebert PDN (2007) Design and applicability of DNA arrays and DNA barcodes in biodiversity monitoring. *BioMed Central Biology*, 5 (24): 1-7.
- Harvey ML, Dadour IR and Gaudieri S (2003) Mitochondrial DNA cytochrome oxidase I gene: potential for distinction between immature stages of some forensically important fly species (Diptera) in Western Australia. *Forensic Science International* 131: 134-139.
- Harvey ML, Gaudieri S, Villet MH, Dadour IR (2008) A global study of forensically significant calliphorids: implications for identification. *Forensic Science International*, 177 (1): 66-76.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, de-Waard JR (2003) Biological identification through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 270: 569-599.
- Huang CG, Hsu JC, Haymer DS, Lin GC and Wu WJ (2009) Rapid Identification of the Mediterranean Fruit Fly (Diptera: Tephritidae) by Loop-Mediated

- Isothermal Amplification. *Journal of Economic Entomology* 102 (3): 1239-1246.
- Isola J, DeVries S, Chu L, Ghazvini S, Waldman F (1994) Analysis of changes in DNA sequence copy number by comparative genomic hybridization in archival paraffin-embedded tumor samples. *American Journal of Pathology*, 145 (6): 1301-1308.
- Junqueira ACM, Lessinger AC and Azeredo-Espin (2002) Methods for the recovery of mitochondrial DNA sequences from museum specimens of myiasis causing flies. *Medical and Veterinary Entomology*, 16: 39-45.
- Kavitha R, Nazni WA, Tan TC, Lee HL, Mat Isa MN and Sofian Azirun M (2012) Molecular identification of blowflies recovered from human cadavers during crime Scene investigation in Malaysia. *Malaysian Journal Pathology*, 34 (2): 127-132.
- Koller WW, Barros ATM, Corrêa EA (2011) Abundance and seasonality of *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae) in Southern Pantanal, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria*, 20 (1): 27-30.
- Kosmann C, Macedo MP, Barbosa TAF and Pujol-Luz JR (2011) *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) and *Hemilucilia segmentaria* (Fabricius) (Diptera, Calliphoridae) used to estimate the postmortem interval in a forensic case in Minas Gerais, Brazil. *Revista Brasileira de Entomologia* 55 (4): 621-623.
- Kosmann C, Mello RP, Harterreiten-Souza ES and Pujol-Luz JR (2013) A List of Current Valid Blow Fly Names (Diptera: Calliphoridae) in the Americas South of Mexico with Key to the Brazilian Species. *EntomoBrasilis* 6 (1): 74-85.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018) MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547–1549.
- Librado, P. and Rozas, J. (2009). DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
- Liu D and Greenberg B (1989) Immature stages of some flies of forensic importance. *Entomological society of America* 82: 80-93.
- Lord WD and Stevenson JR (1986) Directory of forensic entomologists. Def. Pest Mgmt. Info. Anal. Center (eds), Washington: walter reed army medical center 86.
- Lord WD, Goff ML, Adkins TR, Haskell NH. (1994) The black soldier fly *Hermetia illucens* (Diptera, Stratiomyidae) as a potential measure of human postmortem interval: observations and case histories. *Journal Forensic Science* 39: 215–22
- Monzon RB, sanchez AR, Tadiaman BM, Najos OA, Valencia EG, Rueda RR and Ventura JVM (1991) A comparison of the role of *Musca domestica* (Linnaeus) and *Chrysomya megacephala* (Fabricius) as mechanical vectors of helminthic parasites in a typical slum area of metropolitan manila. *Southeast Asean Journal Tropical Medicine Public Health* 22: 2.
- Moophayak K, Klong-klaew T, Sukontason K, Kurahashi H, Tomberlin JK and Sukontason KI (2014) Species composition of carrion blow flies in Northern Thailand: altitude appraisal. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 56 (2): 179-182.
- Oliva A (2007) Frecuencia y distribución temporal de moscas cadavéricas (Diptera) en la ciudad de Buenos Aires. *Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales* 9 (1): 4-14.

- Oliveira TC and Vasconcelos SD (2010) Insects (Diptera) associated with cadavers at the Institute of Legal Medicine in Pernambuco, Brazil: Implications for forensic entomology. *Forensic Science International* 198: 97-102.
- Oliveira-Costa J (2013) Insetos "Peritos" - A entomologia forense no Brasil. 3^o edição. Millenium Editora Ltda. São Paulo.
- Otranto D and Stevens JR (2002) molecular approaches to the study of myiasis causing larvae. *International Journal for Parasitology* 32: 1345-1360.
- Parson W, Pegoraro K, Niederstatter H, Foger M, Steinlechner M (2000) Species identification by means of the cytochrome b gene. *International Journal of Medicine Legal* 144: 23-28.
- Pinto R (1908) Nota sobre a fauna cadavérica. *A tribuna médica* 14 (21): 413-417.
- Poter TM and Hajibabei M (2018) Over 2.5 million COI sequences in GenBank and growing. *PLoS ONE* 13 (9): e0200177
- Pujol-Luz JR, Arantes LC and Constantino R (2008a) Cem anos de Entomologia Forense no Brasil (1908-2008). *Revista Brasileira de Entomologia* 52 (4):485-492.
- Pujol-Luz JR, Francez PAC, Ururahy-Rodrigues A, Constantino R (2008b) The black soldier-fly, *Hermetia illucens* (Diptera, Stratiomyidae), used to estimate the postmortem Interval in a case in Amapá State, Brazil. *Journal of Forensic Sciences* 53 (2): 476-478.
- Ramos-Pastrana Y, Virguez-Díaz Y and Wolff M (2018) Insects of forensic importance associated to cadaveric decomposition in a rural area of the Andean Amazon, Caquetá, Colombia. *Acta Amazonica* 48: 126-136.
- Rolo EA, Oliveira AR, Dourado CG, Farinha A, Rebelo MT and Dias D (2013) Identification of sarcosaprophagous Diptera species through DNA barcoding in wildlife forensics. *Forensic Science International* 228: 160-164.
- Rosa TA, Babata MLY, Souza CM, Sousa D, Mello-Patiu CA, Vaz-de-Mello FZ, Mendes J (2011) Arthropods associated with pig carrion in two vegetation profiles of Cerrado in the State of Minas Gerais, Brazil. *Revista Brasileira de Entomologia* 55 (3): 424-434.
- Salviano RJB, Mello RP, Santos RFS, Beck LCNH, Ferreira A (1996) Calliphoridae (Diptera) associated with human corpses in Rio de Janeiro, Brazil. *Entomology y vectores* 3: 145-146.
- Schoenly KG, Haskell NH, Mills DK, Bieme-Ndi C, Larsen K and Lee Y (2006) Recreating death's acre in the school yard: Using pig carcasses as model corpses. *The American biology teacher* 68 (7): 402-410.
- Sonet G, Jordaens K, Braet Y, Desmyter S (2012) Why is the molecular identification of the forensically important blowfly species *Lucilia caesar* and *L. illustris* (family Calliphoridae) so problematic? *Forensic Science International*, 223: 153-159.
- Staden R (1996) The staden sequence analysis package. *Molecular Biotechnology*, 5(3): 233.
- Tomberlin JK, Mohr R, Benbow ME, Tarone AM and VanLaerhoven S (2011) A roadmap for bridging basic and applied research in forensic entomology. *Annual Review of Entomology* 56: 401-421.
- Urrahy-Rodrigues A, Rafael JA, Pujol-Luz J (2013) Temporal distribution of blowflies of forensic importance (Diptera: Calliphoridae), in man-size

- domestic pigs carcasses, in the forest reserve Adolpho Ducke, Manaus, Amazonas, Brazil. *EntomoBrasilis* 6 (1): 9-22.
- Vasconcelos SD and Araujo MCS (2012) Necrophagous species of Diptera and Coleoptera in northeastern Brazil: state of the art and challenges for the Forensic Entomologist. *Revista Brasileira de Entomologia* 56 (1): 7–14.
- Vasconcelos SD, Cruz TM, Salgado RL, Thyssen, PJ (2013) Dipterans associated with a decomposing animal carcass in a rainforest fragment in Brazil: Notes on the early arrival and colonization by necrophagous species. *The Journal of Insect Science* 145 (13): 1-11.
- Vasconcelos SD and Salgado RL (2014) First record of six Calliphoridae (Diptera) species in a seasonally dry tropical forest in Brazil: Evidence for the establishment of invasive species. *Florida Entomologist* 97 (2): 814-816.
- Vasconcelos SD, Soares TF, Costa LD (2014) Multiple colonization of a cadaver by insects in an indoor environment: first record of *Fannia trimaculata* (Diptera: Fanniidae) and *Peckia* (*Peckia*) *chrysostoma* (Sarcophagidae) as colonizers of a human corpse. *International Journal of Legal Medicine* 128: 229-233.
- Wells JD and Greenberg B (1992) Interaction between *Chrysomya rufifacies* and *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae): the possible consequences of an invasion. *Bulletin of Entomological Research* 82 (1): 133-137.
- Wells JD and Stevens JR (2008) Application of DNA-based methods in forensic entomology. *Annual Review of Entomology* 53: 103-20.
- Xia X and Xie Z (2001) DAMBE: data analysis and molecular biology and evolution. *The Journal of Heredity* 92 (4): 371-373.
- Zaidi F, Wei SJ, Shi M and Chen XX (2011) Utility of multi-gene loci for forensic species diagnosis of blowflies. *Journal of Insect Science* 11: 59.
- Zehner R, Amendt J, Schutt S, Sauer J, Krettek R and Povolný D (2004) Genetic Identification of forensically important flesh flies (Diptera: Sarcophagidae). *International Journal of Legal Medicine* 118: 245-247.

Tables

Table 1: Description of necrophagous diptera samples used for comparison of barcode COI and CytB molecular markers

Family	Species	Number of specimens	Place of origin
Calliphoridae	<i>Chloroprocta idioidea</i>	1	Distrito Federal
	<i>Chrysomya albiceps</i>	3	Pernambuco
	<i>Chrysomya megacephala</i>	3	Pernambuco
	<i>Chrysomya putoria</i>	3	Pernambuco
	<i>Cochliomyia macellaria</i>	4	Pernambuco
	<i>Hemilucia semidiaphana</i>	1	Pernambuco
	<i>Lucilia cuprina</i>	2	Pernambuco
	<i>Lucilia eximia</i>	1	Distrito Federal
Muscidae	<i>Musca domestica</i>	3	Pernambuco
	<i>Synthesiomyia nudiseta</i>	1	Pernambuco
Sarcophagidae	<i>Oxysarcodexia admixta</i>	1	Distrito Federal
	<i>Peckya chrysostoma</i>	2	Pernambuco
	<i>Peckya uncinata</i>	2	Distrito Federal
	<i>Sarcophaga ruficornis</i>	3	Pernambuco

Table 2: Specifications of *primers* developed from entropy analysis and used to amplify a region of the mitochondrial cytochrome B gene of Diptera.

Primer F	CAAATRTCWTTYTGAGGAGC
Start position in gene	936
Length	20 pb
GC content	40%
Melting temperature	49 °C
Hairpin (T _m)	-0.1 °C
Hairpin (ΔG)	0.98 kcal/mol
Primer R	GCTCCAATTCATGTYARTA
Start position in gene	1547
Length	19 pb
GC content	36.8 %
Melting temperature	47.1 °C
Hairpin (T _m)	23.1 °C
Hairpin (ΔG)	0.13 kcal/mol

Table 3: Matrix of the intra and interspecific genetic distance of 14 diptera species estimated by Kimura 2 Parameters model, using a fragment the Cytochrome B gene and the cytochrome oxidase I. The values in the upper-right correspond to the CytB gene and lower-left to the COI gene.

Species	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1. Cid1_DF		0,133	0,118	0,102	0,115	0,108	0,126	0,128	0,171	0,169	0,160	0,174	0,158	0,139
2. Cal1_PE	0,093		0,130	0,120	0,118	0,118	0,130	0,114	0,130	0,162	0,167	0,181	0,151	0,160
3. Cme1_PE	0,076	0,054		0,100	0,114	0,106	0,126	0,126	0,151	0,152	0,160	0,163	0,143	0,143
4. Cpu1_PE	0,095	0,054	0,038		0,095	0,084	0,105	0,120	0,143	0,165	0,169	0,163	0,148	0,134
5. Cma1_PE	0,064	0,089	0,074	0,078		0,098	0,122	0,124	0,140	0,176	0,182	0,156	0,141	0,158
6. Hse1_PE	0,084	0,089	0,062	0,076	0,058		0,103	0,095	0,153	0,147	0,160	0,163	0,130	0,124
7. Lcu1_PE	0,076	0,110	0,088	0,101	0,074	0,076		0,112	0,165	0,151	0,156	0,170	0,137	0,140
8. Lex1_DF	0,099	0,103	0,101	0,101	0,102	0,093	0,070		0,149	0,162	0,154	0,152	0,143	0,145
9. Mdo1_PE	0,112	0,118	0,101	0,114	0,112	0,112	0,114	0,125		0,173	0,178	0,192	0,164	0,162
10. Snu1_PE	0,110	0,114	0,112	0,114	0,107	0,110	0,107	0,116	0,127		0,188	0,216	0,174	0,168
11. Oad1_DF	0,103	0,125	0,114	0,121	0,119	0,110	0,095	0,103	0,138	0,116		0,163	0,161	0,143
12. Pch1_PE	0,107	0,107	0,105	0,105	0,127	0,114	0,112	0,129	0,142	0,122	0,110		0,088	0,166
13. Pun1_DF	0,105	0,116	0,097	0,116	0,136	0,110	0,114	0,127	0,129	0,120	0,095	0,042		0,152
14. Sru1_PE	0,120	0,114	0,110	0,116	0,107	0,116	0,101	0,125	0,138	0,116	0,105	0,078	0,086	

Table 4: Origin, identification and quantity of maggots collected from decomposed human cadavers from the Forensic Medicine services of the States of Paraíba and Pernambuco.

Corpse	City	Collection date	Decomposition stage	Species	Number of specimens
PB C1	Pitimbu	February 20, 2015	Putrefaction	<i>Chrysomya megacephala</i>	4
				<i>C. putoria</i>	7
				<i>Peckia chrysostoma</i>	3
PB C2	Campina Grande	February 27, 2015	Dark putrefaction	<i>Cochliomyia macellaria</i>	15
PB C3	Sumé	March 7, 2015	Dark putrefaction	<i>C. albiceps</i>	5
				<i>Co. macellaria</i>	10
PB C4	Natuba	May 22, 2015	Dark putrefaction	<i>C. albiceps</i>	5
				<i>Co. macellaria</i>	9
PE C1	Sanharó	November 21, 2014	Dark putrefaction	<i>Hermetia illucens</i>	12
PE C2	Paulista	December 15, 2014	Putrefaction	<i>C. albiceps</i>	14
PE C3	Vitória de Santo Antão	January 6, 2015	Putrefaction	<i>C. albiceps</i>	15
PE C4	Vicência	February 08, 2015	Initial decomposition	<i>C. albiceps</i>	5
PE C5	Cabo de Santo Agostinho	February 09, 2015	Initial decomposition	<i>C. albiceps</i>	11
				<i>C. megacephala</i>	3

Table 5: Matrix of the intra and interspecific genetic distance estimated by the Kimura 2 Parameters model, using a fragment of the Cytochrome B gene in six species of dipterans collected in the Forensic Medicine Services of the States of Paraíba and Pernambuco.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. <i>Chrysomya albiceps</i> _PB_C3_1												
2. <i>Chrysomya albiceps</i> _PE_C2_1	0,000											
3. <i>Chrysomya megacephala</i> _PB_C1_1	0,130	0,130										
4. <i>Chrysomya megacephala</i> _PE_C5_6	0,130	0,130	0,000									
5. <i>Chrysomya putoria</i> _PB_C1_2	0,116	0,116	0,106	0,106								
6. <i>Chrysomya putoria</i> _PB_C1_5	0,112	0,112	0,106	0,106	0,007							
7. <i>Cochliomyia macellaria</i> _PB_C2_1	0,116	0,116	0,116	0,116	0,097	0,097						
8. <i>Cochliomyia macellaria</i> _PB_C3_2	0,119	0,119	0,110	0,110	0,099	0,099	0,006					
9. <i>Hermetia illucens</i> _PE_C1_1	0,254	0,254	0,251	0,251	0,252	0,252	0,260	0,258				
10. <i>Hermetia illucens</i> _PE_C1_2	0,259	0,259	0,257	0,257	0,252	0,247	0,266	0,263	0,011			
11. <i>Peckia chrysostoma</i> _PB_C1_3	0,169	0,169	0,162	0,162	0,162	0,164	0,153	0,150	0,247	0,261		
12. <i>Peckia chrysostoma</i> _PB_C1_4	0,169	0,169	0,162	0,162	0,162	0,164	0,153	0,150	0,247	0,261	0,000	

Figure 1: Phylogenetic tree showing the grouping of 14 diptera species using a fragment the Cytochrome B gene and the Cytochrome Oxidase I obtained by Neighbor-Joining analysis, using Kimura 2 Parameters methodology with 1000 bootstrap repetitions. A: Grouping with sequences corresponding the CytB gene fragment; B: Grouping with sequences corresponding the COI gene fragment. PB corresponds to samples from Paraíba and PE samples from Pernambuco.

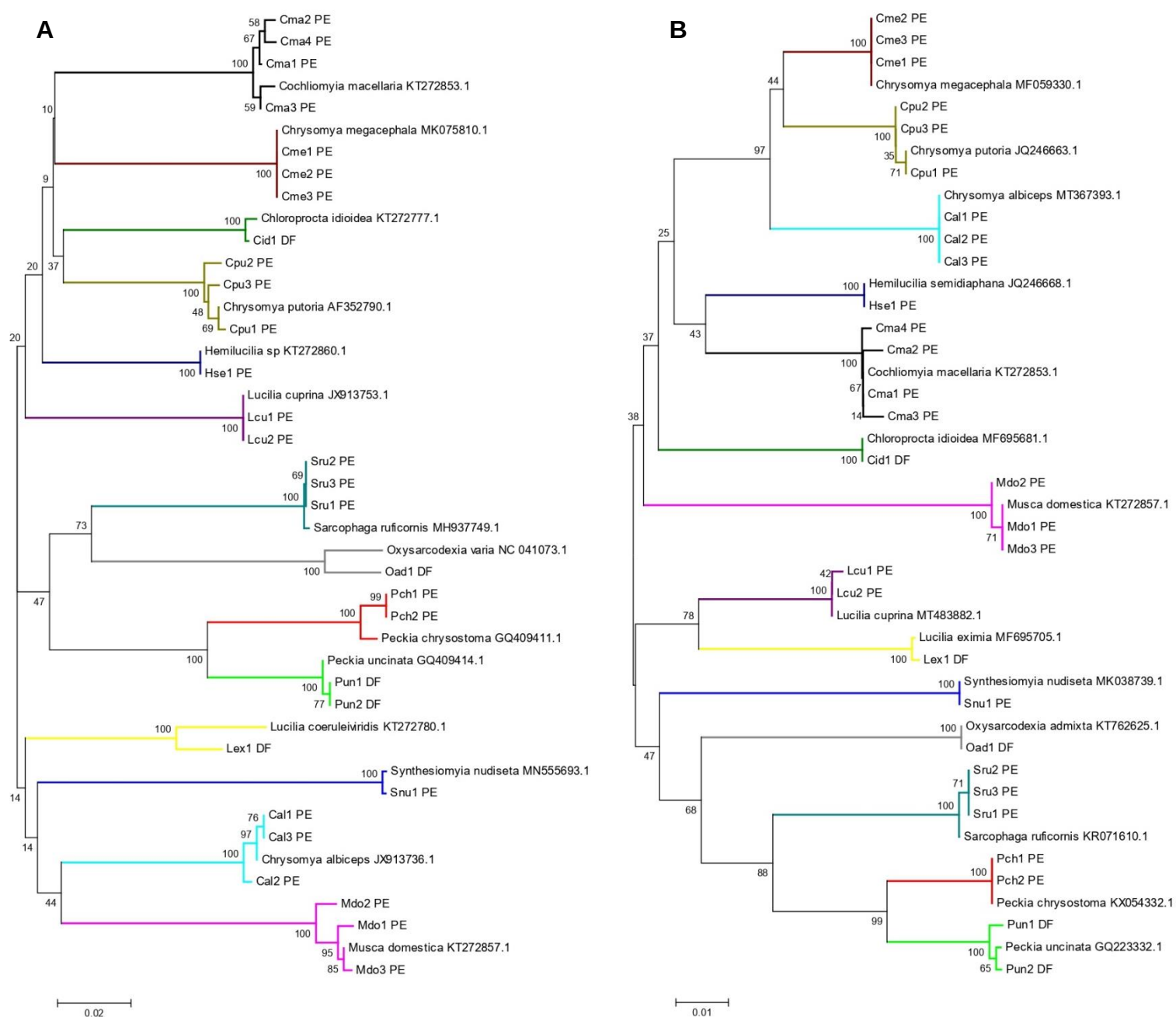
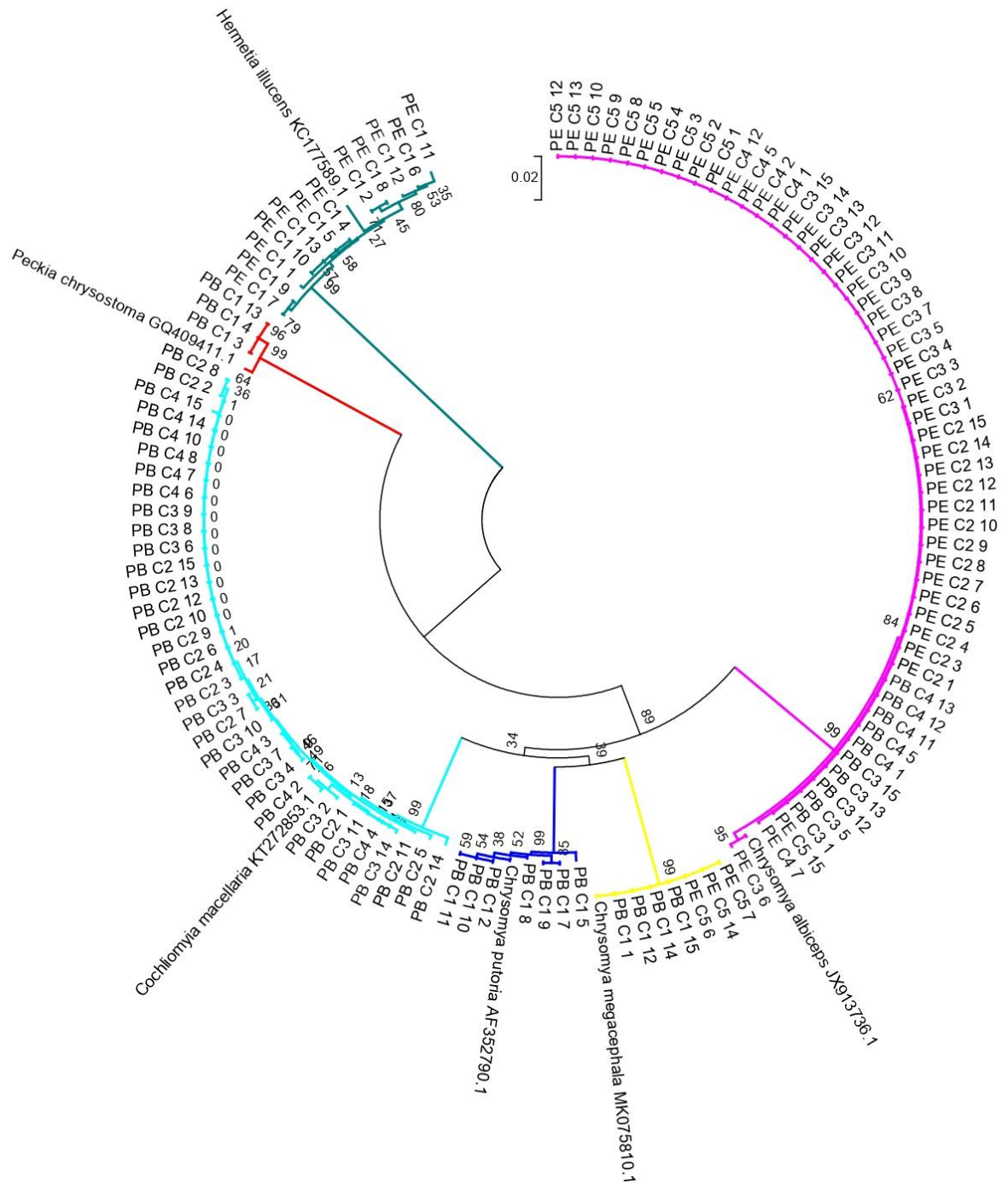


Figure 2: Phylogenetic tree obtained by Neighbor-Joining analysis, using the methodology of Kimura 2 Parameters, with nucleotide sequences of the mitochondrial Cytochrome B gene of necrophagous dipteran species. Branch values correspond to bootstrap support (1000 replications).



Supplementary material

Supplementary table 1: Diptera species used to search for phylogenetic signal through entropy analysis

Family	Species	Access number
Calliphoridae	<i>Calliphora vicina</i>	JX913760.1
	<i>Chrysomya albiceps</i>	JX913736.1
	<i>C. bezziana</i>	JX913737.1
	<i>C. megacephala</i>	MK075810.1
	<i>C. putoria</i>	AF352790.1
	<i>C. rufifacies</i>	JX913741.1
	<i>C. saffranaea</i>	JX913742.1
	<i>Cochliomyia hominivorax</i>	AF260826.1
	<i>Hemipyrellia ligurriens</i>	JX913759.1
	<i>Lucilia cuprina</i>	JX913748.1
	<i>L. porphyrina</i>	JX913758.1
	<i>L. sericata</i>	KT272854.1
	<i>Protophormia terraenova</i>	JX913743.1
Sarcophagidae	<i>Sarcophaga impatiens</i>	NC_017605.1
Tachinidae	<i>Rutilia goerlingiana</i>	JX913762.1

Supplementary table 2: Genetic distance of 15 dipteran species based on the 343 bp fragment of the mitochondrial Cytochrome B gene. Distance calculated by Kimura 2 Parameters model.

Species	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>Rutelia 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

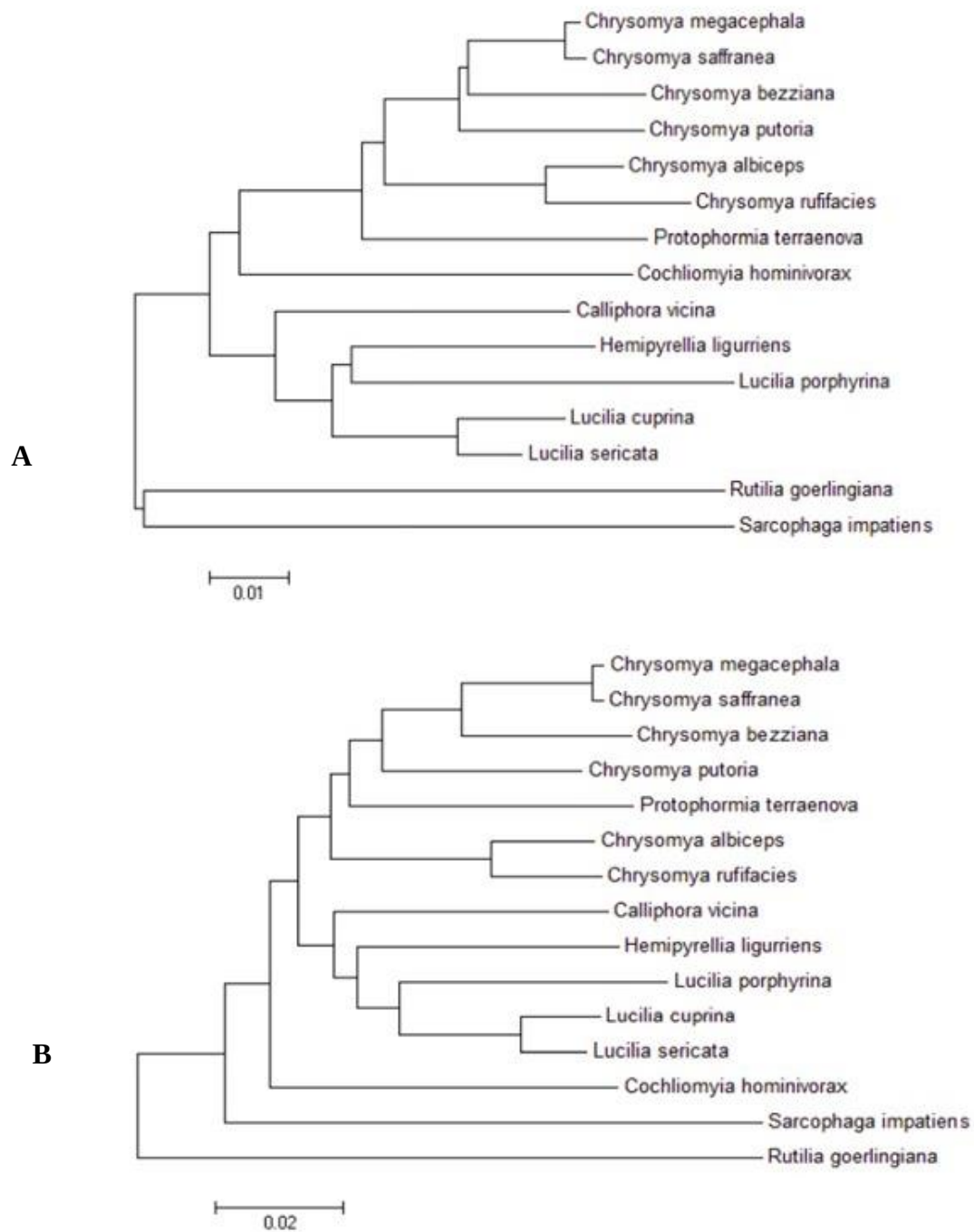
Supplementary table 3: Genetic distance of 15 dipteran species based on the 658 bp fragment of barcode region of mitochondrial Cytochrome oxidase I gene. Distance calculated by Kimura 2 Parameters model.

Species	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 porphyria</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>Rutelia goerlingiana</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

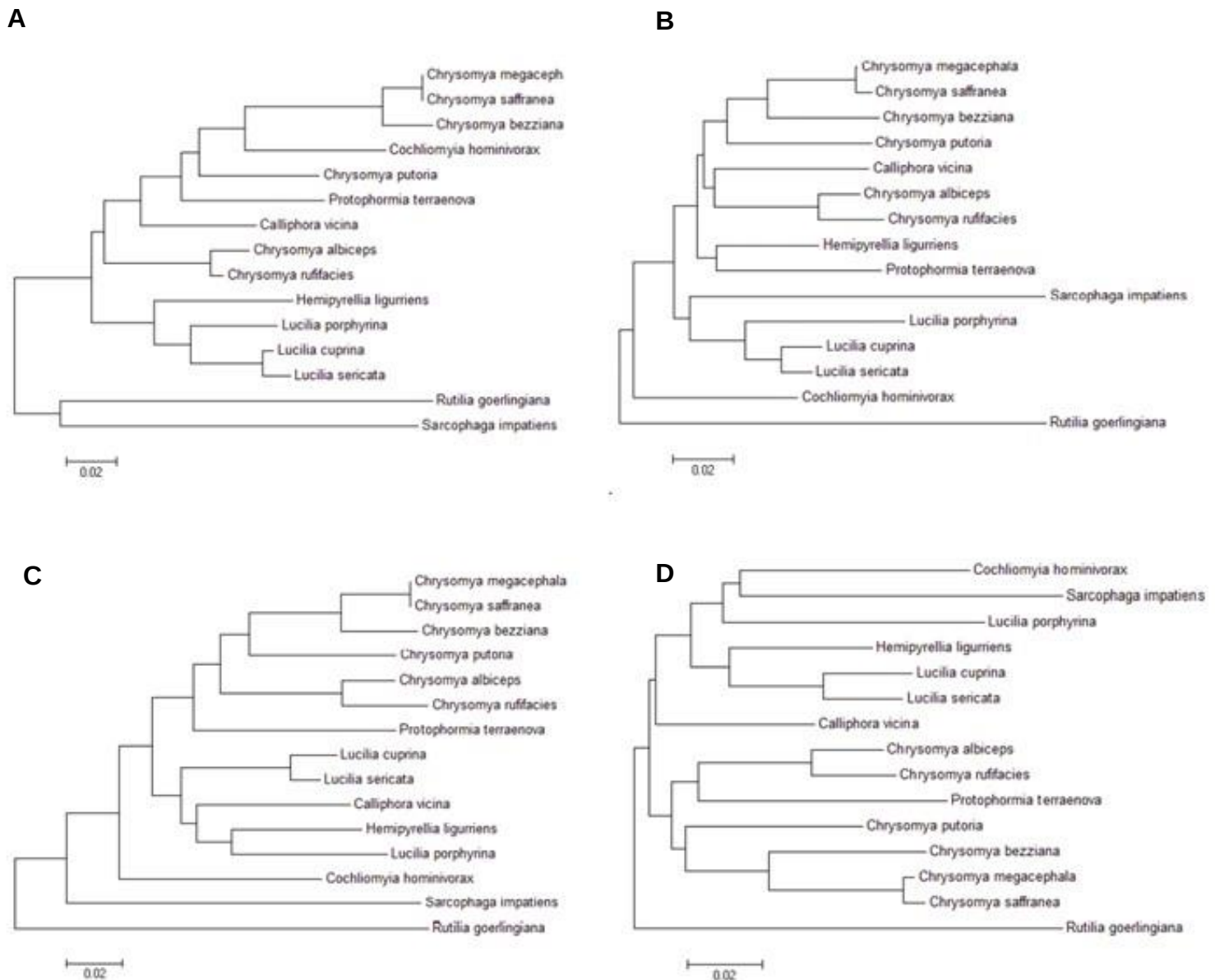
Supplementary table 4: Diptera sequence information obtained from genbank
and used for the analysis of species grouping and genetic distance.

Family	Specie	Query cover		Per. Ident		Access number	
		COI	CytB	COI	CytB	COI	CytB
Caliphoridae	<i>Chloroprocta idioidea</i>	100	100	100	99,48	MF695681.1	KT272777.1
	<i>Chrysomya albiceps</i>	100	100	100	99,83	MT367393.1	JX913736.1
	<i>Chrysomya megacephala</i>	100	100	100	100	MF059330.1	MK075810.1
	<i>Chrysomya putoria</i>	100	100	99,82	99,83	JQ246663.1	AF352790.1
	<i>Cochliomyia macellaria</i>	100	100	100	99,48	KT272853.1	KT272853.1
	<i>Hemilucilia semidiaphana</i>	100		99,82		JQ246668.1	
	<i>Hemilucilia sp</i>		100		100		KT272860.1
	<i>Lucilia cuprina</i>	100	100	99,27	100	MT483882.1	JX913753.1
	<i>Lucilia eximia</i>	100		99,63		MF695705.1	
	<i>Lucilia coeruleiviridis</i>		100		96,51		KT272780.1
Muscidae	<i>Musca domestica</i>	100	100	100	99,48	KT272857.1	KT272857.1
	<i>Synthesiomyia nudiseta</i>	100	100	100	99,83	MK038739.1	MN555693.1
Sarcophagidae	<i>Oxysarcodexia admixta</i>	100		100		KT762625.1	
	<i>Oxysarcodexia varia</i>		100		97,03		NC_041073.1
	<i>Peckia chrysostoma</i>	100	94	100	98,89	KX054332.1	GQ409411.1
	<i>Peckia uncinata</i>	100	94	99,45	99,63	GQ223332.1	GQ409414.1
	<i>Sarcophaga ruficornis</i>	100	100	99,82	99,65	KR071610.1	MH937749.1

Supplementary figure 1: Phylogenetic tree of 15 Diptera species based on the fragment corresponding to (A) barcode region of mitochondrial Cytochrome oxidase I gene (648pb) and (B) 13 mitochondrial genes (11.196pb). Topology obtained by Neighbor-Joining analysis.



Supplementary figure 2: Phylogenetic trees of 15 species of dipterans, generated from the regions chosen in the entropy analysis (A: NADH2, B, NADH3, C: NADH 6, D: CytB) and generated with the obtained by Neighbor-Joining analysis.



5 ARTIGO II - DIVERSIDADE GENÉTICA DE *CHRYSOMYA ALBICEPS* UTILIZANDO O GENE MITOCONDRIAL CITOCROMO OXIDASE I

*Bárbara Natieli Silva Pereira¹

pereira.bns@gmail.com

Valdir de Queiroz Balbino¹

vqballbino@gmail.com

¹Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Genética, Laboratório de Bioinformática e Biologia Evolutiva, Recife, Pernambuco, Brasil

*Autor correspondente

Resumo

Chrysomya albiceps é presente em vários países do mundo e apresenta grande capacidade de adaptação e dispersão. A espécie possui importância médico-veterinária e forense, e frequentemente seus espécimes são alvo de estudos genéticos com diversos objetivos, em sua maioria de identificação molecular ou caracterização local. Neste trabalho objetivamos caracterizar a variação da composição molecular desta espécie em diferentes países através do gene mitocondrial Citocromo Oxidase I (COI), para isto fizemos o download de sequências nucleotídicas do COI em *C. albiceps* disponíveis no GenBank do National Center for Biotechnology Information e em seguida analisamos a diversidade genética através dos softwares Mega X, DNAsp v.6 e Network v.10.2. Foram analisadas 204 sequências de quatro diferentes continentes, referentes a região *barcode* do COI, estas amostras revelaram baixa diversidade genética na espécie, com sequências bem conservadas (0,980), presença de 12 haplótipos, sendo dois compartilhados em todos os continentes. Ao realizar a análise das sequências por continente, na América do Sul foi observada a menor diversidade genética, ocorrendo apenas dois haplótipos com diferença de um único sítio polimórfico. Os dados sugerem que a espécie possui o gene COI bem conservado, independentemente do tempo em que estão situados no local e que na América do Sul a maior conservação pode ser resultado da recente chegada da espécie ao continente.

Palavras-chave: Caracterização molecular, Diptera, Calliphoridae, DNA *barcode*.

Introdução

A família Calliphoridae representa um grupo de moscas cosmopolitas composto por 150 gêneros, distribuídos em mais de 1600 espécies (Kosmann *et al.*, 2013; Carvalho *et al.*, 2021), com ciclo de vida, hábitos e importâncias variadas.

O gênero *Chrysomya* é originário do velho mundo e possui mais de 30 espécies descritas. As moscas deste gênero apresentam características que colaboram para que seus representantes ocupem rapidamente as regiões onde chegam, como rápida capacidade de dispersão, adaptação e reprodução (Prado e Guimaraes, 1982), chegando a afetar a dinâmica de espécies nativas, fato já constatado no Peru e Brasil, em que populações da espécie *Cochliomyia macellaria* foram reduzidas devido aos hábitos competitivos e predatórios de espécies do gênero *Chrysomya* (Baumgartner e Greenberg 1984; Andrade *et al.*, 2002).

Atualmente as espécies do gênero *Chrysomya* são encontradas em várias partes do mundo, uma de grande relevância neste grupo é a *Chrysomya albiceps* que apresenta importância medico-veterinária por ser agente etiológico facultativo de miíases em espécies animais e no homem, e transportar patógenos (Ferraz *et al.*, 2010, Ceylan *et al.*, 2019), como também auxiliam na área forense através da degradação da matéria orgânica que possibilita a identificação de restos cadavéricos, determinação do intervalo pós morte e análises entomotoxicológicas em casos de mortes violentas (Arnaldos *et al.*, 2005; Kosmann *et al.*, 2011; Açikgoz, 2018; Chamoun *et al.*, 2020),

sendo uma das espécies mais encontradas em cadáveres putrefeitos (Cainé *et al.*, 2009, Oliveira e Vasconcelos, 2010).

Diversos trabalhos abordam aspectos biológicos, ecológicos e genéticos desses indivíduos. Na biologia molecular há um expressivo número de estudos utilizando genes mitocondriais, neste âmbito o Citocromo Oxidase I é comumente o mais utilizado, suprimindo estudos com objetivos diversos na taxonomia, filogenia e genética de populações (Wells e Sperling, 1999; Singh *et al.*, 2011; Grella *et al.*, 2015). No entanto, os trabalhos populacionais tendem a abordar populações locais, restringindo assim as suas análises.

Estudar a composição genética dessa espécie é importante para ampliar o conhecimento destas populações e auxiliar na tomada de decisões do seu uso. Sobretudo quando falamos em ciências forenses, uma vez que a correta identificação de espécies é uma etapa primordial da análise, logo, regiões bem conservadas são ideais para este objetivo, no entanto o contrário ocorre quando falamos da rastreabilidade de espécies, útil para casos de deslocamento de cadáveres, uma vez que para rastrear espécies é fundamental a presença de variabilidade intraespecífica nas populações, para que assim elas possam ser identificadas e isoladas (Harvey *et al.*, 2003; Amendt *et al.*, 2010).

Desta forma, o presente trabalho objetivou investigar a variação genética da espécie *Chrysomya albiceps* em diversos países utilizando a região *barcode* do COI, identificando, assim, diferenças inter- e intrapopulacionais.

Materiais e métodos

Buscas por sequências nucleotídicas referentes ao gene mitocondrial Citocromo Oxidase I da espécie *Chrysomya albiceps* foram realizadas no GenBank do NCBI (*National Center for Biotechnology Information* - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) utilizando os termos “*Chrysomya albiceps* and COI”. A pesquisa resultou em 320 sequências com tamanhos variando entre 272 e 2303pb, destas, foram selecionadas para análises as que apresentavam tamanho superior a 530pb, incluíam a região do *barcode*, e possuíam a identificação do país de origem do espécime. Com o banco de dados criado, ocorreu o alinhamento e padronização do tamanho das sequências no algoritmo Muscle do Mega X (Kumar *et al.*, 2018), em seguida análises de diversidade genética foram realizadas no software DNAsp v6 (Rozas *et al.*, 2017) e uma rede haplotípica foi gerada no Network v10.2.

Resultados

A triagem dos dados obtidos no GenBank resultou em 204 sequências nucleotídicas oriundas de quatro diferentes continentes, representados por 15 países (África do Sul, Alemanha, Arábia Saudita, Bélgica, Brasil, Colômbia, Egito, Equador, Espanha, França, Itália, Líbano, Portugal, Romênia, Uruguai) e a região da Península Ibérica (Tabela suplementar 1). Após tratamento as sequências apresentaram tamanho final de 500 nucleotídeos, e foram observados 490 sítios conservados, 10 variáveis, sendo 6 parcimônio informativos e 4 singletos, e baixa diversidade nucleotídica (0,00145). A análise de diversidade genética revelou a presença 12 haplótipos, sendo dois comuns a todos os continentes (haplótipos 2 e 3), o haplótipo 2 esteve ausente apenas nos países da Bélgica e Portugal (Figura 1, Tabela suplementar 2).

Quando analisadas por continente, a África foi a que apresentou maior diversidade nucleotídica (0,00206), enquanto a América do Sul revelou os menores valores de diversidade nucleotídica e haplotípica (0,00092 e 0,461, respectivamente) com polimorfismo em apenas um sítio (Tabela 1).

Discussão

Chrysomya albiceps é uma espécie com hábitos necrófagos, utilizando matérias em decomposição para alimentação e realização de oviposição, sendo assim ela constantemente é encontrada em locais de crime colonizando cadáveres putrefeitos (Vairo *et al.*, 2015; Ramos-Pastrana e Wolff, 2017). No entanto, apesar da espécie apresentar fácil dispersão, adaptação e grandes populações, como podemos observar, ela apresenta baixos valores de diversidade genética, sobretudo na América do Sul onde encontramos apenas dois haplótipos diferenciados por apenas uma base nucleotídica localizada na população do Equador.

Resultados semelhantes foram encontrados no Brasil por Pereira *et al.* (dados não publicados) onde populações desta espécie oriundas de dois estados do Nordeste brasileiro (Paraíba e Pernambuco) apresentaram ausência absoluta de diferenciação genética na região *barcode* do COI, por sua vez, Figueiredo-JR (2015) observou baixos valores de diversidade nucleotídica e haplotípica (0,095 e 0,00019, respectivamente) ao analisar a espécie *C. megacephala* em populações brasileiras do estado de Pernambuco utilizando a mesma região.

Estes dados se justificam, possivelmente, devido à recente entrada das espécies no país, haja vista que estudos indicam que a introdução do gênero *Chrysomya* na América do Sul ocorreu no ano de 1975, a partir dos estados de São Paulo e Paraná, região Sul do Brasil, através de navios com refugiados africanos vindos da Angola e Moçambique (Guimarães *et al.*, 1978). Rapidamente esta espécie se espalhou no país e continente. Porém, apesar da dispersão, ela não teve tempo de sofrer processos de estruturação genética, pois, como observamos, neste continente ela apresentou apenas dois haplótipos com diferença de um único sítio entre eles.

No nosso trabalho as maiores variações genéticas, que ainda são baixas, remetem as populações oriundas dos continentes da África, Ásia e Europa. Diversos autores já relataram dados semelhantes aos nossos ao utilizar marcadores mitocondriais em populações de *C. albiceps* destes continentes. GilArriortua *et al.* (2013) estudando 65 espécimes oriundos de Portugal encontraram apenas um polimorfismo e 2 haplótipos em fragmento do gene mitocondrial Citocromo b (CytB). Em 2015, os mesmos autores utilizando as regiões COI e CytB em 59 espécimes da mesma localidade, encontraram sequências bem conservadas com baixo valor de diversidade nucleotídica, números de sítios variáveis e haplótipos (0.0003 - 0.0004, 4 e 5; 0.0002 - 0.0005, 1 e 2, respectivamente). Enquanto que Harvey *et al.* (2003) encontraram variação intraespecífica de 0,2% em populações da África e Austrália. Cooke *et al.* (2018), na África, encontraram absoluta ausência de estruturação com apenas um haplótipo e nenhum sítio polimórfico.

Quando analisamos outras espécies do gênero encontramos valores semelhantes aos de *C. albiceps*. Na Ásia, Hall *et al.* (2009) com 178 amostras

de *C. bezziana*, utilizando o CytB identificaram 5 haplótipos que variavam de um a dois nucleotídeos. Enquanto Tan *et al.* (2009) estudando *C. megacephala* e *C. rufifacies* com fragmentos dos genes COI e COII encontraram baixa diferenciação nucleotídica (5/1533 e 2/692; 4/1533 e 1/692 respectivamente) na Malásia.

Os valores encontrados indicam que o DNA mitocondrial no grupo é bem conservado e necessita de grandes períodos para sofrer mutações, porém apesar de apresentar baixa diversidade é possível detectar haplótipos exclusivos nos continentes em que a espécie se originou, enquanto que os dois haplótipos presentes na população da América do Sul são compartilhados com os demais continentes.

No âmbito forense este dado é desanimador quando falamos de investigação de rastreamento de movimentação de cadáveres, visto que a ausência de diversidade impossibilita a diferenciação das populações, no entanto o inverso ocorre para a taxonomia molecular, uma vez que quanto mais conservada e quanto menos diferenças intrapopulacionais ocorrer, melhor o marcador se mostrará para a identificação de espécies.

Estudos com outros marcadores e populações maiores poderá esclarecer melhor a estrutura genética dessas espécies.

Referências

- Açikgoz HN (2018) Multiple drug Analysis of *Chrysomya albiceps* larvae provides important forensic insights to unravel drug associated mortalities. *Entomological News*, 128 (1): 99-107.
- Amendt J, Zehner R, Johnson DG, Wells J (2010), Future Trends in Forensic Entomology. *Current Concepts in Forensic Entomology*, 353-368.
- Andrade JB, Rocha FA, Rodrigues P, Rosa GS, Faria LDB, Zuben CJV, Rossi MN, Godoy WAC (2002) Larval Dispersal and Predation in Experimental Populations of *Chrysomya albiceps* and *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 97(8): 1137-1140.
- Arnaldos MI, García MD, Romera E, Presa JJ, Luna A (2005) Estimation of postmortem interval in real cases based on experimentally obtained entomological evidence. *Forensic Science International* 149: 57–65.
- Baumgartner DL, Greenberg B (1984) The Genus *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) in the New World. *Journal of Medical Entomology*, 21 (1): 105-113.
- Cainé LM, Real FC, Bordas MIS, Pancorbo MM, Lima G, Magalhães T, Pinheiro F (2009) DNA typing of Diptera collected from human corpses in Portugal. *Forensic Science International*, 184 (2009) e21–e23.
- Carvalho CJB, Mello-Patiu CA, Almeida LM (2021) O papel da Taxonomia na Entomologia Forense. *Entomologia Forense na pratica do laboratório a utilização do vestígio*. Editora Millennium Ltda. São Paulo, 225-273.
- Ceylan O, Dik B, İlhan C, İder M, Gülersoy E (2019) The first case of anal myiasis caused by *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819) in a dog infested with *Rhiphicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) ticks suspected to cause paralysis in Turkey. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 25 (5): 721-724.
- Chamoun CA, Couri MS, Garrido RG, Moura-Neto RS, Oliveira-Costa J (2020) Recovery e identification of human Y-STR DNA from immatures of *Chrysomya albiceps* (Diptera: Calliphoridae). *Simulation of sexual crime investigation involving victim corpse in state of decay*. *Forensic Science International*, 310:110239.
- Cooke T, Kulenkampff K, Heyns M, Heathfield LJ (2018) DNA barcoding of forensically important flies in the Western Cape, South Africa. *Genome*, 61: 12.
- Ferraz ACP, de Almeida VRG, de Jesus DM, Rotatori GN, Nunes R, Proença B, Aguiar-Coelho VM, Lessa CSS (2010) Epidemiological Study of Myiasis in the Hospital do Andaraí, Rio de Janeiro, Including Reference to an Exotic Etiological Agent. *Neotropical Entomology*, 40(3): 393-397.
- Figueiredo-JR CAS (2015) Diversidade genética de dípteros Calliphoridae de importância forense. Tese (Doutorado em Genética), Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- GilArriortua M, Bordas MIS, Cainé LM, Pinheiro F, Pancorbo MM (2013) Cytochrome b as a useful tool for the identification of blowflies of forensic interest (Diptera, Calliphoridae). *Forensic Science International*, 228: 132–136.

- GilArriortua M, Bordas MIS, Cainé LM, Pinheiro F, Pancorbo MM (2015) Technical Note: “Mitochondrial and nuclear DNA approaches for reliable identification of *Lucilia* (Diptera, Calliphoridae) species of forensic interest from Southern Europe”. *Forensic Science International*, 257: 393-397.
- Grella MD, Savino AG, Paulo DF, Mendes FM, Azeredo-Espin AML, Queiroz MMC, Thyssen PJ, Linhares AX (2015) Phenotypic polymorphism of *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) may lead to species misidentification. *Acta Tropica*, 141: 60-72.
- Guimarães JH, Prado AP, Linhares AX (1978) Three newly introduced blowfly species in southern Brazil (Diptera, Calliphoridae). *Revista Brasileira de Entomologia*, 22: 53-60.
- Hall MJR, Warfhana AH, Shahhosseini G, Adams ZJO, Ready PD (2009) Genetic diversity of populations of Old World screwworm fly, *Chrysomya bezziana*, causing traumatic myiasis of livestock in the Gulf region and implications for control by sterile insect technique. *Medical and Veterinary Entomology*, 1:51-8.
- Harvey ML, Mansell MW, Villet MH, Dadour IR (2003) Molecular identification of some forensically important blowflies of Southern Africa and Australia. *Medical and Veterinary Entomology*, 17: 363–369.
- Kosmann C, Macedo MP, Barbosa TAF, Pujol-Luz JR (2011) *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) and *Hemilucilia segmentaria* (Fabricius) (Diptera, Calliphoridae) used to estimate the postmortem interval in a forensic case in Minas Gerais, Brazil. *Revista Brasileira de Entomologia* 55(4): 621–623.
- Kosmann C, Mello RP, Harterreiten-Souza ES, Pujol-Luz JR (2013) A list of current valid blow fly names (Diptera: Calliphoridae) in the Americas South of Mexico with key to the brazilian species. *EntomoBrasilis*, 6:1, 74-85.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018) MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547–1549.
- Oliveira TC, Vasconcelos SD (2010) Insects (Diptera) associated with cadavers at the Institute of Legal Medicine in Pernambuco, Brazil: Implications for forensic entomology *Forensic Science International* 198 (2010) 97–102.
- Pereira BNS, Figueiredo-JR CAS, Batista MVA, Cruz TM, Pujol-Luz JR, Balbino VQB (Não publicado) Molecular identification of necrophagous diptera with a new molecular marker mtDNA developed through entropy analysis.
- Prado AP, Guimaraes JH (1982) Estado atual de dispersão e distribuição do gênero *Chrysomya* Robineau-Desvoidy na região neotropical (Diptera: Calliphoridae) *Revista Brasileira de Entomologia*, 26 (3-4): 225-231.
- Ramos-Pastrana Y, Wolff M (2017) Postmortem interval estimation based on *Chrysomya albiceps* (Diptera, Calliphoridae) in a forensic case in the Andean Amazon, Caquetá, Colombia. *Acta Amazonica*, 47(4): 369 – 374.
- Rozas J, Ferrer-Mata A, Sanchez-DelBarrio JC, Guirão-Rico S, Librado P, Ramos-Onsins SE, Sanchez-Garcia A (2017) DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets. *Molecular Biology and Evolution*. 34 (12): 3299-3302.
- Singh B, Kurahashi H and Wells JD (2011) Molecular phylogeny of the blowfly genus *Chrysomya*. *Medical and Veterinary Entomology* 25, 126–134.
- Tan SH, Aris EM, Surin J, Omar B, Kurahashi H, Mohamed Z (2009) Sequence variation in the cytochrome oxidase subunit I and II genes of two commonly found blow fly species, *Chrysomya megacephala* (Fabricius)

- and *Chrysomya rufifacies* (Macquart) (Diptera: Calliphoridae) in Malaysia. *Tropical Biomedicine*, 26 (2): 173–181.
- Vairo KP, Correa RC, Lecheta MC, Caneparo MF, Mise KM, Preti D, Carvalho CJB, Almeida LM, Moura MO (2015) Forensic Use of A Subtropical Blowfly: The First Case Indicating Minimum Postmortem Interval (mPMI) in Southern Brazil and First Record of *Sarconesia Chlorogaster* from a Human Corpse. *Journal of Forensic Science*, 60: S257-S260.
- Wells JD, Sperling FAH (1999) Molecular Phylogeny of *Chrysomya albiceps* and *C. rufifacies* (Diptera: Calliphoridae) *Journal Medical Entomology*, 36(3): 222-226.

Figuras e tabelas

Figura 1: Distribuição dos haplótipos referentes a região *barcode* do gene Citocromo Oxidase I em populações de *Chrysomya albiceps* oriundas de quatro diferentes continentes.

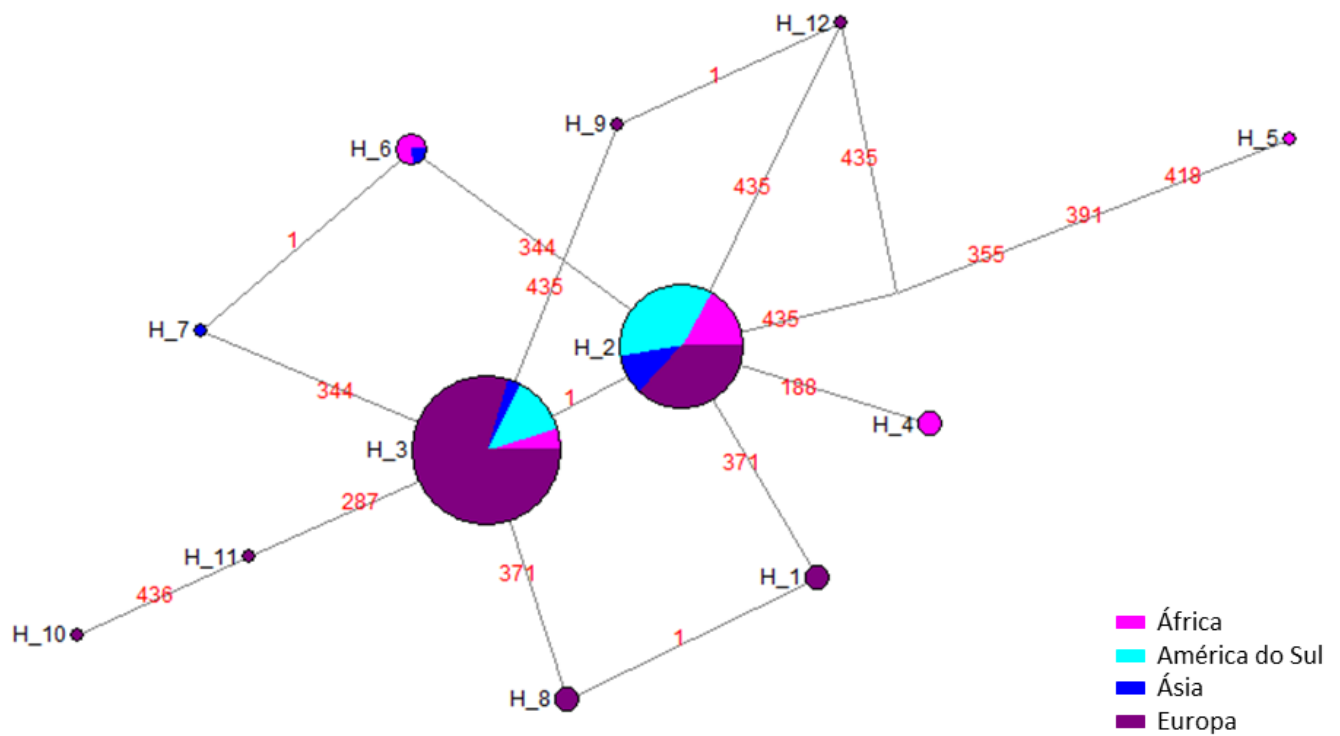


Tabela 1: Diversidade genética de *Chrysomya albiceps* oriundas de quatro diferentes continentes a partir da região *barcode* do gene Citocromo Oxidase I.

	Amostras agrupadas	África	América do Sul	Ásia	Europa
Número de sequências	204	23	41	16	124
Conservação da sequência, C	0,980	0,986	0,998	0,996	0,990
Diversidade nucleotídica, Pi	0,00145	0,00206	0,00092	0,00172	0,00112
Sítios polimórficos	10	7	1	2	5
Sítios parcimônio informativos	6	2	1	2	4
Número de haplótipos, h	12	5	2	4	8
Diversidade haplotípica, Hd	0,582	0,640	0,461	0,692	0,470
Número médio de diferenças nucleotídicas, k	0,726	1,028	0,461	0,858	0,559

Material suplementar

Tabela suplementar 1: Origem e referência das sequências nucleotídicas referentes a região *barcode* do gene mitocondrial Citocromo Oxidase I da espécie *Chrysomya albiceps* utilizadas nas análises do referido estudo.

Continente	País	Número de acesso
África	África do Sul	MH765365.1 a MH765374.1
	Egito	KC249680.1; KC249681.1; KM434339.1 a KM434348.1; KM407601.1
América do Sul	Brasil	MF695674.1; MF695678.1; MF695680.1; MF695682.1; MF695684.1; MF695685.1; MF695688.1; MF695689.1; MF695693.1; MF695695.1; MF695707.1
	Colômbia	KC568256.1; KC568258.1
	Equador	MG700286.1 a MG700290.1; MG700292.1 a MG700294.1; MG700296.1; MG700298.1 a MG700303.1; MG700305.1; MG700307.1; MG700308.1; MW200422.1; MW200537.1; MW200554.1; MW200562.1; MW200607.1; MW200701.1; MW200750.1; MW200769.1; MW200898.1; MW200912.1
	Uruguai	Q246659.1
	Arábia Saudita	KU578289.1 a KU578293.1; MT367393.1
Ásia	Líbano	MF536028.1 a MF536030.1; MF536033.1 a MF536036.1; MF536038.1; MF536044.1; MF536046.1

Europa	Alemanha	HE814059.1 a HE814061.1
	Bélgica	KF919017.1
	Espanha	KJ635731.1 a KJ635734.1; KJ394546.1; KX161521.1 a KX161558.1
	França	KF919011.1 a KF919013.1; KF919015.1; KF919016.1
	Itália	EU503116.1; KY316528.1; MH401800.1; MH401801.1; MH401833.1
	Península Ibérica	KJ394508.1; KJ394514.1; KJ394515.1
	Portugal	JX438026.1; KC775968.1 a KC776026.1; MN868837.1; MN868772.1
	România	KJ193726.1; KP760114.1

Tabela suplementar 2: Distribuição dos haplótipos encontrados na região *barcode* do gene mitocondrial Citocromo Oxidase I de populações de *Chrysomya albiceps* oriundas de quatro continentes.

Haplótipo	Número de sequências	Países
1	3	Bélgica, Espanha
2	76	África do Sul, Alemanha, Arábia Saudita, Brasil, Colômbia, Egito, Equador, Espanha, França, Itália, Líbano, Península Ibérica, România, Uruguai
3	108	África do Sul, Equador, Espanha, Líbano, Portugal,
4	3	Egito
5	1	Egito
6	5	Arábia Saudita, Egito, Líbano
7	1	Líbano
8	3	Espanha, Portugal
9	1	Portugal
10	1	Portugal
11	1	Portugal
12	1	Espanha

6 DISCUSSÃO GERAL

Para a aplicação da técnica de DNA *barcode* é essencial o uso de marcadores moleculares bem definidos em conjunto com bancos de sequências nucleotídicas robustos. O marcador mais utilizado é o COI, o qual possui grande número de trabalhos utilizando-o, principalmente após a criação do projeto “*The Barcode of Life Project*” (Boehme *et al.*, 2012; Cainé *et al.*, 2006 e 2009; Harvey, 2008; Wells *et al.*, 2013; Shinde *et al.*, 2021) e como observado por Poter e Hajibabei (2018), esta procura contribuiu para o crescimento no depósito de sequências nucleotídicas obtidas através deste marcador. O grande número de sequências depositadas facilita na busca por sequências homólogas, como pudemos observar ao obtermos *match* com todas as espécies trabalhadas utilizando este marcador.

O CytB é conhecido um gene alternativo que habitualmente é utilizado em conjunto com o COI (Ferreira *et al.*, 2011; Zaidi *et al.*, 2011; GilArriortua *et al.*, 2015), logo, possui menor procura e conseqüentemente menor número de sequências depositadas, sobretudo para espécies pouco estudadas, tornando dificultosa a busca por sequências homólogas para amostras trabalhadas com este gene, como podemos perceber ao constatar a ausência de sequências depositadas para três das 14 espécies estudadas neste trabalho.

No que se refere a separação de espécies, Hebert *et al.* (2003) estipularam que a variação interespecífica deve ser superior a 3%, enquanto a intraespecífica não deve exceder este valor. Todos os nossos resultados *in silico* e *in loco* apresentaram-se superiores ao valor mínimo para a diferenciação de espécies.

Nas análises *in silico* para o gene CytB obtivemos valor de distância genética superiores a valores relatados na literatura para o gene COI, entre as espécies de *Chrysomya megacephala* e *C. rufifacies* a diferenciação genética foi 14,7% e *C. megacephala* e *L. cuprina* 16%, enquanto GilArriortua *et al.* (2014) obtiveram apenas 7,1% e 9% respectivamente para as mesmas espécies utilizando a região *barcode* do COI.

Zaidi *et al.* (2011), avaliaram fragmento do mtDNA correspondente ao COI em dípteros necrófagos, e o resultado foi incapaz de distinguir as espécies *L. cuprina* e *L. sericata* (0,78%), uma vez que apresentaram valor abaixo do limite

dos 3% da premissa do método. Nos nossos resultados *in silico*, a mesma comparação interespecífica utilizando-se a região do Tag_CytB, conseguiu separar as mesmas espécies obtendo o valor de distância genética de 4,6%, revelando desta forma a capacidade de o marcador separar espécies próximas.

Em loco, o nosso menor valor correspondeu a 4% (*C. megacephala* x *C. putoria*) utilizando o marcador COI, enquanto para o marcador CytB o menor valor refere-se a 8,4% (*C. putoria* x *H. semidiaphana*), mostrando que ambos os marcadores utilizados são adequados para a prática de DNA *barcoding*. No entanto, apesar da região proposta para a identificação universal de espécies referir-se ao fragmento do gene COI e observarmos que este marcador possui eficácia para a atividade proposta, através dos valores obtidos em nosso trabalho e por outros autores, pudemos conferir, que para dípteros necrófagos a região amplificada através do par de *primers* Tag_CytB apresenta maior robustez na identificação molecular, conseguindo distinguir espécies do mesmo gênero com alto valor de diferenciação como *C. megacephala* x *C. putoria* (10,0%) e *C. albiceps* x *C. megacephala* (13,0%).

Por sua vez, GilArriortua *et al.* (2014) ao analisarem dípteros com um fragmento do gene COI, conseguiram bons valores de diferenciação interespecífica: *C. albiceps* x *C. megacephala* (7%); *C. albiceps* x *C. putoria* (7,8%); e *C. putoria* x *C. megacephala* (5,4%). No entanto, os nossos valores se mostraram superiores, conferindo, desta forma, a robustez do marcador desenhado para análises de diferenciação específica, com potencial para separar espécies próximas.

Ao analisar a diversidade genética de populações de *C. albiceps* oriundas de quatro continentes, a partir da região *barcode* do COI, nossos dados foram de acordo com a literatura, indicando baixa diversidade na espécie (Hall *et al.*, 2009; GilArriortua *et al.*, 2013, Cooke *et al.*, 2018) e consequente insuficiência do marcador para estudos de estrutura genética populacional e aplicação da espécie, com este marcador, para a análise de deslocamento de cadáveres. No entanto a alta conservação da região torna o marcador eficiente para a identificação da espécie.

A separação de espécies próximas com precisão é importante uma vez que espécies do mesmo gênero tendem a apresentar características semelhantes,

logo um marcador molecular que as distinguem com robustez elimina a dúvida da identificação.

7 CONCLUSÕES

Os marcadores moleculares mitocondriais Citocromo Oxidase I e Citocromo B se mostraram eficientes para a identificação de espécies de pelo menos dezesseis espécies de quatro diferentes espécies de dípteros necrófagos;

O fragmento do Citocromo B amplificado com o par de primers Tag_CytB teve maior poder de separação das espécies estudadas do que o fragmento do Citocromo Oxidase I amplificado com o par de *primers* HCO-LCO, conhecido como região *barcode*.

A região *barcode* do Citocromo Oxidase I é bastante conservada na espécie *Chrysomya albiceps*, com haplótipos que diferem em apenas um sítio polimórfico.

As populações de *Chrysomya albiceps* da América do Sul não apresentam haplótipo exclusivo, possuindo apenas dois haplótipos compartilhados com as populações da África, Ásia e Europa.

REFERÊNCIAS

- Amendt J, Krettek R and Zehner R (2004) Forensic entomology. *Naturwissenschaften*, 91: 51-65.
- Amendt J, Campobasso CP, Gaudry E, Reiter C, LeBlanc HN and Hall MJR (2007) Best practice in forensic entomology – standards and guidelines. *International Journal of Legal Medicine*, 121: 90-104;
- Amendt J, Richards CS, Campobasso CP, Zehner R and Hall MJR (2011) Forensic entomology: applications and limitations. *Forensic Science, Medicine and Pathology*, 7(4): 379-92.
- Avise JC (1991) Ten unorthodox perspectives on evolution prompted by comparative population genetic findings on mitochondrial DNA. *Annual Review of Genetics*, 23: 45-69.
- Benecke M (1998) Six forensic entomology cases: description and commentary. *Journal of Forensic Sciences*, 43(4): 797-805.
- Benecke M (2001) A brief history of forensic entomology. *Forensic Science International*, 120: 2-14.
- Boehme P, Amendt J and Zehner R (2012) The use of COI barcodes for molecular identification of forensically important fly species in Germany. *Parasitol Research*, 110: 2325–2332.
- Bornemissza GF (1957) An analysis of arthropod succession in carrion and the effect of its decomposition on the soil fauna. *Australian Journal Zoology*, 5: 112.
- Bortolini S, Giordani G, Tuccia F, Maistrello L and Vanin S (2018) Do longer sequences improve the accuracy of identification of forensically important Calliphoridae species?. *PeerJ*, 6:e5962.
- Branicki W, Kupiec T and Pawlowski R (2003) Validation of cytochrome b sequence analysis as a method of species identification. *Journal of Forensic Sciences*, 48(1): 1-5.
- Brown WM, George-Jr M and Wilson AC (1979) Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *PNAS*, 76: 1967-1971.
- Bugelli V, Papi L, Fornaro S, Stefanelli F, Chericoni S, Giusiani M, Vanin S and Campobasso CP (2017) Entomotoxicology in burnt bodies: a case of maternal filicide-suicide by fire. *International Journal of Legal Medicine*, 131: 1299–1306.
- Byrd JH and Castner JL (2009) *Forensic Entomology: The Utility of Arthropods in Legal Investigations*. Boca Raton. CRC Press LLC.
- Cainé LM, Corte-Real F, Lima G, Pontes L, Abrantes D and Pinheiro MF (2006) *International Congress Series*, 1288: 846, 848.
- Cainé LM, Corte-Real F, Salomã-Bordas MI, Martinez-de-Pancorbo M, Lima G, Magalhães T and Pinheiro MF (2009) DNA typing of Diptera collected from human corpses in Portugal. *Forensic Science International*, 184: e21-e23.
- Calegari BB, Avila EF, Reis RE and Alho CS (2020) DNA barcode authentication reveals highly fraudulent Cod commerce in Porto Alegre, Brazil. *Forensic Science International: Reports*, 2: 100072.
- Carvalho CJB, Mello-Patiu CA and Almeida LM (2021) O papel da Taxonomia na Entomologia Forense. *Entomologia Forense na pratica do laboratório a utilização do vestígio*. Editora Millennium Ltda. São Paulo, 225-273.

- Catts EP and Goff ML (1992) Forensic entomology in criminal investigations. *Annual Reviews Entomology*, 37: 253-272.
- Chiao-Hao C, Han-Yang L, Qui R, Yeong-Shin L and Kwang-Tsao S (2016) DNA barcode identification of fish products in Taiwan: Government-commissioned authentication cases. *Food Control*, 66: 38-43.
- Clery JM (2001) Stability of prostate specific antigen (PSA), and subsequent Y-STR typing, of *Lucilia* (Phaenicia) *sericata* (Meigen) (Diptera: Calliphoridae) maggots reared from a simulated postmortem sexual assault. *Forensic Science International*, 120: 72-76.
- Coghlan ML, White NE, Parkinson L, Haile J, Spencer PBS and Bunce M (2012) Egg forensics: An appraisal of DNA sequencing to assist in species identification of illegally smuggled eggs. *Forensic Science International Genetics*, 6(2): 268-273.
- Cooke T, Kulenkampff K, Heyns M, Heathfield LJ (2018) DNA barcoding of forensically important flies in the Western Cape, South Africa. *Genome*, 61: 12
- Coulson RMR, Curtis CF, Ready PD, Hill N and Smith DF (1990) Amplification and analysis of human DNA present in mosquito bloodmeals. *Medical and Veterinary Entomology*, 4: 357-366.
- Curic G, Hercog R, Vrselja Z and Wagner J (2014) Identification of person and quantification of human DNA recovered from mosquitoes (Culicidae). *Forensic Science International Genetics*, 8: 109-112.
- De Carlos A, Bañón R, Cobo-Arroyo S, Arronte JC, Río JL and Barros-Garcia D (2020) DNA barcoding flags the existence of sympatric cryptic species in the slender codling *Halar gyreus Johnsonii* Gunther, 1862 (Gadiformes, Moridae). *Marine Biodiversity*, 50: 49.
- Desmyter S and Gosselin M (2009) COI sequence variability between Chrysomyinae of forensic interest. *Forensic Science International Genetics*, 3(2): 89-95.
- D'Oliveira RCBF (2018) Fauna necrófaga associada à carcaças e zonas fisicamente mapeadas de interesse entomoforense no estado do Rio Grande do Norte. *Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas)* Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal.
- Feitosa LM, Martins APB, Giarrizzo T, Macedo W, Monteiro IL, Gemaque R, Nunes JLS, Gomes F, Schneider H, Sampaio I, Souza R, Sales JB, Rodrigues-Filho LF, Tchaicka L and Carvalho-Costa LF (2018) DNA-based identification reveals illegal trade of threatened shark Species in a global elasmobranch conservation hotspot. *Scientific Reports*, 8: 3347.
- Ferreira S, Oliveira AR, Farinha A, Rebelo MT and Dias D (2011) Forensic Entomology: nuclear and mitochondrial markers for Diptera and Coleoptera identification. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 3: e174-e175.
- Freire O (1914) Algumas notas para o estudo da fauna cadavérica na Bahia. *Gazeta Medica da Bahia*, 46(4): 149-162.
- GilArriortua M, Bordas MIS, Cainé LM, Pinheiro F and Pancordo MM (2013) Cytochrome b as a useful tool for the identification of blowflies of forensic interest (Diptera: Calliphoridae). *Forensic Science International*, 228: 132-136.
- GilArriortua M, Bordas MIS, Kohnemann S, Pfeiffer H and Pancordo MM (2014) Molecular differentiation of central European blowfly species (Diptera:

- Calliphoridae) using mitochondrial and nuclear genetic markers. *Forensic Science International*, 242: 274-282.
- GilArriortua M, Saloña-Bordas MI, Cainé LM, Pinheiro F and Pancorbo MM (2015) Technical Note: "Mitochondrial and nuclear DNA approaches for reliable identification of *Lucilia* (Diptera, Calliphoridae) species of forensic interest from Southern Europe". *Forensic Science International*, 257: 393-397.
- Greenberg B (1985) Forensic entomology: Case studies. *Bulletin of the Entomological Society of America*, 31(4): 25-28.
- Guimarães JH, Prado AP and Linhares AX (1978) Three newly introduced species of *Chrysomya* Robineau-Desvoidy, in Brazil (Diptera, Calliphoridae). *Revista Brasileira de Entomologia*, 22(1): 53-60.
- Hajibabaei M, Singer GAC, Clare AL, Hebert PDN (2007) Design and applicability of DNA arrays and DNA barcodes in biodiversity monitoring. *BioMed Central Biology*, 5(24): 1-7.
- Hall MJR, Warfhana AH, Shahhosseini G, Adams ZJO, Ready PD (2009) Genetic diversity of populations of Old World screwworm fly, *Chrysomya bezziana*, causing traumatic myiasis of livestock in the Gulf region and implications for control by sterile insect technique. *Medical and Veterinary Entomology*, 1: 51-8.
- Hao YJ, Zou YL, Ding YR, Xu WY, Yan ZT, Li XD, Fu WB, Li TJ and Chen B (2017) Complete mitochondrial genomes of *Anopheles stephensi* and *An. dirus* and comparative evolutionary mitochondriomics of 50 mosquitoes. *Scientific Reports*, 7: 7666
- Harrison RG (1989) Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. *Trends in Ecology and Evolution*, 4: 6-11.
- Harvey ML, Dadour IR and Gaudieri S (2003) Mitochondrial DNA cytochrome oxidase I gene: potential for distinction between immature stages of some forensically important fly species (Diptera) in western Australia. *Forensic Science International*, 131: 134-139.
- Harvey ML, Gaudieri S, Villet MH, Dadour IR (2008) A global study of forensically significant calliphorids: implications for identification. *Forensic Science International*, 177(1): 66-76.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, de-Waard JR (2003) Biological identification through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 270: 569-599.
- Introna F, Campobasso CP and Fazio AD (1998) Three case studies in forensic entomology from southern Italy. *Journal of Forensic Sciences* 43(1):210-214.
- Jang H, Shin SE, Koo KS and Park SH (2019) SNP typing using multiplex real-time PCR assay for species identification of forensically important blowflies and fleshflies collected in South Korea (Diptera: Calliphoridae and Sarcophagidae). *Biomed Research International*, 2: 1-11.
- Junqueira ACM, Lessinger AC and Azeredo-Espin (2002) Methods for the recovery of mitochondrial DNA sequences from museum specimens of myiasis-causing flies. *Medical and Veterinary Entomology*, 16: 39-45.
- Kavitha R, Nazni WA, Tan TC, Lee HL, Mat Isa MN and Sofian Azirun M (2012) Molecular identification of blow flies recovered from human cadavers during crime Scene investigation in Malaysia. *Malaysian Journal of Pathology*, 34(2): 127-132.
- Kavitha R, Tan TC, Lee HL, Nazni WA and Sofian AM (2013) Molecular identification of Malaysian *Chrysomya megacephala* (Fabricius) and

- Chrysomya rufifacies* (Macquart) using life stage specific mitochondrial DNA. *Tropical Biomedicine*, 30(2): 211-219.
- Kosmann C, Macedo MP, Barbosa TAF, Pujol-Luz JR (2011) *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) and *Hemilucilia segmentaria* (Fabricius) (Diptera, Calliphoridae) used to estimate the postmortem interval in a forensic case in Minas Gerais, Brazil. *Revista Brasileira de Entomologia*, 55(4): 621–623.
- Kosmann C, Mello RP, Harterreiten-Souza ES and Pujol-Luz JR (2013) A list of current valid blow fly names (Diptera: Calliphoridae) in the Americas South of Mexico with key to the Brazilian species. *EntomoBrasilis*, 6:1, 74-85.
- Kulshrestha P and Satpathy DK (2001) Use of beetles in forensic entomology. *Forensic Science International*, 120: 15–17.
- Li X, Cai JF, Guo YD, Xiong F, Zhang L, Feng H, Meng FM, Fu Y, Li JB and Chen YQ (2011) Mitochondrial DNA and STR analyses for human DNA from maggots crop contents: A forensic entomology case from central-southern China. *Tropical Biomedicine* 28(2): 333–338.
- Limsopatham K, Hall MJR, Zehner R, Zajac BK, Verhoff MA, Sontigun N, Sukontason K, Sukontason KL and Amendt J (2018) A molecular, morphological, and physiological comparison of English and German populations of *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae). *Plos One*, 13(12): e0207188.
- Linville J, Hayes J and Wells J (2004) Mitochondrial DNA and STR Analyses of Maggot Crop Contents: Effect of Specimen Preservation Technique. *Journal of Forensic Sciences*, 49(2): 1-4.
- Lopes-Andrade C and Grebennikov VV (2015) First record and five new species of *Xylographellini* (Coleoptera: Ciidae) from China, with online DNA barcode library of the family. *Zootaxa*, 4006(3): 463-480.
- Lord WD and Stevenson JR (1986) Directory of forensic entomologists. Def. Pest Mgmt. Info. Anal. Center (eds), Washington: Walter Reed Army Medical Center, 86.
- Martinez E, Duque P and Wolff M (2007) Succession pattern of carrion-feeding insects in Paramo, Colombia. *Forensic Science International*, 166: 182-189.
- Martins G, Santos WE, Creão-Duarte AJ, Silva LBG, Oliveira AAF (2013) Estimativa do intervalo pós-morte em um canino (*Canis lupus familiaris* Linnaeus 1758) pela entomologia forense em Cabedelo-PB, Brasil: relato de caso. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 65(4): 1107-1110.
- Meira KTR and Barros RM (2015) Padrões de sucessão da fauna cadavérica no Brasil, uma contribuição para a prática forense. *Acta de Ciências e Saúde*, 4(1): 63-99.
- Monteiro-Filho ELA and Peneiro JL (1987) Estudo da decomposição e sucessão sobre uma carcaça animal numa área do estado de São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira de Biologia*, 47(3): 289-295.
- Njau DG, Muge EK, Kinyanjui PW, Omwandho and Mukwana S (2015) STR analysis of human DNA from maggots fed on decomposing bodies: Assessment of the time period for successful analysis. *Egyptian Journal of Forensic Sciences* <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejfs.2015.04.002>.
- Nuorteva P (1977) Sarcosaprophagous insects as forensic indicators. In CG Tedeschi, WG Eckert and LG Tedeschi (eds), *Forensic Medicine: a Study in Trauma and Environmental Hazards*, Vol. II, WB Saunders, New York, p.1072-1095.

- Oliveira AR, Farinha A, Rebelo MT and Dias D (2011) Forensic entomology: molecular identification of blowfly species (Diptera: Calliphoridae) in Portugal. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, e439-440.
- Oliveira TC, Santos ABR, Rabelo KCN, Souza CA, Santos SM, Crovella S (2016) Human autosomal DNA and X chromosome STR profiles obtained from *Chrysomya albiceps* (Diptera: Calliphoridae) larvae used as a biological trace. *Genetics and molecular research*, 15(4): gmr15047622.
- Oliveira-Costa J (2011) *Entomologia Forense: Quando os insetos são vestígios. Tratado de perícias criminalísticas*. Organizador Domingos Tocchetto. Millenium Editora Ltda. São Paulo.
- Oliveira-Costa J, Lamego CMD, Couri MS, Mello-Patiu CA (2014) Differential Diptera succession patterns onto partially burned and unburned pig carrion in southeastern Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 74(4): 870-876.
- Park JH, Kim YH, Ham CS, shin SE, Lee HJ, Ko KS, Choi J, Son GI and Park SH (2018) Molecular identification of forensically important Calliphoridae and Sarcophagidae species using ITS2 nucleotide sequences. *Forensic Science International*, 284: 1-4.
- Parson W, Pegoraro K, Niederstätter H, Föger M and Steinlechner M (2000) Species identification by means of the cytochrome b gene. *International Journal of Legal Medicine*, 114 :23–28.
- Pinto R (1908) Nota sobre a fauna cadavérica. *A tribuna médica*, 14(21): 413-417.
- Poter TM and Hajibabei M (2018) Over 2.5 million COI sequences in GenBank and growing. *PLoS ONE* 13(9): e0200177
- Prado AP and Guimaraes JH (1982) Estado atual de dispersão e distribuição do gênero *Chrysomya* Robineau-Desvoidy na região neotropical (Diptera: Calliphoridae) *Revista Brasileira de Entomologia*, 26(3-4): 225-231.
- Pujol-Luz JR, Marques H, Ururahy-Rodrigues A, Rafael JA, Santana FHA, Arantes LC and Constantino R (2006) A Forensic Entomology Case from the Amazon Rain Forest of Brazil. *Journal of Forensic Sciences*, 51(5): 1151-1153.
- Pujol-Luz JR, Arantes LC, Constantino R (2008) Cem anos da Entomologia Forense no Brasil (1908-2008). *Revista Brasileira de Entomologia*, 52(4): 485-492.
- Ratcliffe ST, Webb DW, Weinzievr RA and Robertson HM (2003) PCR-RFLP identification of Diptera (Calliphoridae, Muscidae and Sarcophagidae) a generally applicable method. *Journal of Forensic Sciences*, 48: 783-785.
- Ries ACR, Costa-Silva V, Santos CF, Blochtein B, Thyssen PJ (2021) Factors Affecting the Composition and Succession of Beetles in Exposed Pig Carcasses in Southern Brazil, *Journal of Medical Entomology*, 58(1): 104–113.
- Rolo EA, Oliveira AR, Dourado CG, Farinha A, Rebelo MT and Dias D (2013) Identification of sarcosaprophagous Diptera Species through DNA barcoding in wildlife forensics. *Forensic Science International*, 228: 160-164.
- Rosa TA, Babata MLY, Souza CM, Sousa D, Mello-Patiu CA, Mendes J (2009) Dípteros de Interesse Forense em Dois Perfis de Vegetação de Cerrado em Uberlândia, MG. *Neotropical Entomology*, 38(6): 859-866.
- Schoch CL, Ciufo S, Domrachev M, Hottton CL, Kannan S, Khovanskaya R, Leipe D, Mcveigh R, O'Neill K, Robbertse B, Sharma S, Soussov V, Sullivan JP, Sun L, Turner S and Karsch-Mizrachi (2020) NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. *Database*, article id: baaa062; doi:10.1093/database/baaa062

- Schroeder H, Klotzbach H, Elias S, Augustin C and Pueschel K (2003) Use of PCR–RFLP for differentiation of Calliphoridae larvae (Diptera, Calliphoridae) on human corpses. *Forensic Science International*, 132: 76–81.
- Shinde AM, Mahakalkar AL, Sapkal HP, Galil FMAA, Al-Mekhlafi FA, Wadaan MA (2021) Molecular identification of a forensically relevant blowfly species (Diptera: Calliphoridae) from the Nagpur region of Maharashtra, India. *Entomological Research*, 51(6): 315-320.
- Sonet G, Jordaens K, Braet Y, Desmyter S (2012) Why is the molecular identification of the forensically important blowfly species *Lucilia caesar* and *L. illustris* (family Calliphoridae) so problematic? *Forensic Science International*, 223: 153-159.
- Sontigun N, Sanita S, Wannasana A, Sukontasona K, Amendt J, Yasangad T and Sukontasona KL (2018) Ultrastructure of male genitalia of blow flies (Diptera: Calliphoridae) of forensic importance. *Acta Tropica*, 179: 61-80.
- Sperling FA, Anderson GS, Hickey DA (1994) A DNA-based approach to the identification of insect used for post-mortem interval estimation. *Journal of Forensic Sciences*, 39(2): 418-427.
- Sukontason K, Narongchai P, Kanchai C, Vichairat K, Sribanditmongkol P, Bhoopat T, Kurahashi H, Chockjamsai M, Piangjai S, Bunchu N, Vongvivach S, Samai W, Chaiwong T, Methanitikorn R, Ngern-Klun R, Sripakdee D, Boonsriwong W, Siri wattanarungsee S, Srimuangwong C, Hanterdsith B, Chaiwan K, Srisuwan C, Upakut S, Moopayak K, Vogtsberger RC, Olson JK and Sukontason KL (2007) Forensic entomology cases in Thailand: a review of cases from 2000 to 2006. *Parasitology Research*, 101: 1417-1423.
- Thyssen PJ, Lessinger AC, Azeredo-Espin AML, Linhares AX (2005) The value of PCR-RFLP molecular markers for the differentiation of immature stages of two necrophagous flies (Diptera: Calliphoridae) of potential forensic importance. *Neotropical Entomology*, 34 (5): 777-783.
- Thyssen PJ (2007) A aplicação da análise molecular na entomologia forense. In: Oliveira- Costa, J. (ed). *Entomologia Forense: Quando os insetos são vestígios*. Campinas. Millennium Editora. xix + 420p.
- Thyssen PJ, Aquino MFK, Purgato NCS, Martins E, Costa AA, Lima CGP, Dias CR (2018) Implications of entomological evidence during the investigation of five cases of violent death in Southern Brazil. *Journal of Forensic Science and Research*, 2: 01-08.
- Tuccia F, Giordani G and Vanin S (2018) Forensic entomology: an overview. *Crime, Security and Society*, 1-19.
- Turchetto M and Vanin S (2004) Forensic entomology and climatic change. *Forensic Science International*, 146S: S207-S209.
- Vairo KP, Moura MO and Mello-Patiu CA (2015) Comparative morphology and identification key for females of nine Sarcophagidae species (Diptera) with forensic importance in Southern Brazil. *Revista Brasileira de Entomologia*, 59: 177-187.
- Vanin S, Tasinato P, Ducolin G, Terranova C, Zancaner S, Montisci M, Ferrara SD and Turchetto M (2008) Use of *Lucilia* species for forensic investigations in Southern Europe. *Forensic Science International*, 177: 37-41.
- Vasconcelos SD, Cruz TM, Salgado RL, Thyssen, PJ (2013) Dipterans associated with a decomposing animal carcass in a rainforest fragment in Brazil: Notes on the early arrival and colonization by necrophagous species. *The Journal of Insect Science*, 145(13): 1-11.

- Vieira BRC, Carvalho EF, Silva DA (2017) Analysis of human DNA present in the digestive tract of *Aedes aegypti* mosquitoes for possible forensic application. Forensic Science International: Genetics Supplement Series, 6, e324-326.
- Villet MH, Richards CS and Midgley JM (2010) Contemporary precision, bias and accuracy of minimum post-mortem intervals estimated using development of carrion-feeding insects. In: Amendt J, Campobasso CP, Goff ML and Grassberger M, eds. Current Concepts in Forensic Entomology. Netherlands: Springer, 109-137.
- Wallman JF and Donnellan SC (2001) The utility of mitochondrial DNA sequences for the forensically important blowflies (Diptera: Calliphoridae) in southeastern Australia. Forensic Science International, 120: 60-67.
- Wang M, Chu J, Wang Y, Li F, Liao M, Shi H, Zhang Y, Hu G and Wang J (2019) Forensic entomology application in China: Four case reports. Journal of Forensic and Legal Medicine, 63: 40-47
- Wells JD, Introna FJ, Di Vella G, Campobasso CP, Hayes J and Sperling FAH (2001) Human and Insect Mitochondrial DNA Analysis from Maggots. Journal of Forensic Sciences, 46(3): 685-687.
- Wells JD and Smith JL (2013) First Report of *Blaesoxipha plinthopyga* (Diptera: Sarcophagidae) from a Human Corpse in the U.S.A. and a New State Geographic Record Based on Specimen Genotype. Journal of Forensic Sciences, 58(5): 1378-1380.
- Wells JD (2019) A Forensic Entomological Analysis Can Yield an Estimate of Postmortem Interval, and Not Just a Minimum Postmortem Interval: An Explanation and Illustration Using a Case. Journal of Forensic Science, Journal of forensic sciences, 64(2): 634-637.
- Zaidi F, Wei SJ, Shi M and Chen XX (2011) Utility of multi-gene loci for forensic species diagnosis of blowflies. Journal of Insect Science, 11: 59
- Zajac BK, Martin-Vega D, Feddern N, Fremdt H, Castro CP, Szplia K, Reckel F, Schutt S, Verhoff MA, Amendt J and Zehner R (2016) Molecular identification and phylogenetic analysis of the forensically important family Piophilidae (Diptera) from different European locations. Forensic Science international, 259: 77-84.
- 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. International Journal of Legal Medicine, 111: 323-327.
- Zehner R, Amendt J, Schutt S, Sauer J, Krettek R and Povolný D (2004) Genetic Identification of forensically important flesh flies (Diptera: Sarcophagidae). International Journal of Legal Medicine, 118: 245-247.
- Zhang CQ, Fu XI, Yang X, Liu JS and Guo YD (2015) Application of MtSNP marker for genetic identification of forensically important sarcophagid flies (Diptera: Sarcophagidae) in China. Forensic Science International: Genetics Supplement series, 5: e-240-e242.

ANEXOS

Anexo 1. Guia para submissão de artigos na Forensic Science International

(https://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/505512?generatepdf=true)

GUIDE FOR AUTHORS

Your Paper Your Way

We now differentiate between the requirements for new and revised submissions. You may choose to submit your manuscript as a single Word or PDF file to be used in the refereeing process. Only when your paper is at the revision stage, will you be requested to put your paper in to a 'correct format' for acceptance and provide the items required for the publication of your article.

To find out more, please visit the Preparation section below.

INTRODUCTION

Forensic Science International is a peer-reviewed, international journal for the publication of original contributions in the many different scientific disciplines comprising the forensic sciences. These fields include, but are not limited to, forensic pathology and histochemistry, toxicology (including drugs, alcohol, etc.), serology, chemistry, biochemistry, biology (including the identification of hairs and fibres), odontology, psychiatry, anthropology, the physical sciences, firearms, and document examination, as well as the many other disciplines where science and medicine interact with the law.

Types of paper

1. Original Research Articles (Regular Papers)
2. Review Articles
3. Rapid Communications
4. Technical Notes
5. Forensic Anthropology Population Data
6. Case Reports
7. Preliminary Communications
8. Letters to the Editor
9. Commentaries

Announcement of Population Data: these types of articles will be published in *Forensic Science International: Genetics*, only. Please submit these articles via <https://www.editorialmanager.com/fsi>.

Preliminary Communications (where brief accounts of important new work may be announced with less delay than is inevitable with major papers) may be accepted after correspondence with the appropriate Associate Editor.

Review Articles may be regularly submitted or invited by Editors. However, they will undergo the normal review process of the journal.

Forensic Anthropology Population Data: Although the main focus of the anthropology section of the journal remains on the publication of original research, authors are invited to submit their forensic anthropology population data articles by selecting the "Forensic Anthropology Population Data" article type on the online submission system. When submitting a Forensic Anthropology Population data article, please assure that "Forensic Anthropology Population Data" is included as one of the keywords. These forensic anthropology population data articles involve the application of already published and standardised methods of aging, sexing, determination of ancestry and stature and other well known diagnoses on different populations. This is at the heart of applied forensic anthropology. For example, in order to correctly assess age, stature or even sex of individuals of different ancestry or from different populations, it is fundamental that the method be tested on the specific population one is working on. In building the biological profile of a skeleton in order to aid identification, one needs to calibrate such techniques on the population of interest before applying them. The same may be true in a completely different scenario of anthropology, for example identifying criminals taped on video surveillance systems and aging victims of juvenile pornography. This section is dedicated to forensic anthropological population data and other types of updates (state of the art of particular issues, etc.), particularly concerning the following:

- Sexing
- Aging sub adult skeletal remains
- Aging adult skeletal remains
- Aging living sub adults and adults
- Determining ancestry
- Stature estimation

CURRICULUM LATTES REFERENTE AO PERÍODO DO DOUTORADO**IDENTIFICAÇÃO**

Nome Bárbara Natieli Silva Pereira
Nome em citações bibliográficas Pereira, B.N.S.; Silva Pereira, Bárbara Natieli
Lattes iD <http://lattes.cnpq.br/6265275583013540>
Orcid iD <https://orcid.org/0000-0001-7787-9111>

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

2017 - 2022 Doutorado em Genética.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Brasil.
Título: Utilização de marcadores moleculares para identificação de dípteros necrófagos.
Orientador: Valdir de Queiroz Balbino
Coorientador: Walter Fabrício Silva Martins
Bolsista do (a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

2021 Psicologia da educação. (Carga horária: 60h).
Universidade Estadual do Maranhão, UEMA, Brasil.

2020 Vigilância e controle de vetores de importância em saúde pública.
(Carga horária: 45h).
Universidade de Brasília, UnB, Brasil.

2020 Competências Profissionais, Emocionais, Tecnológicas para Tempos de Mudança. (Carga horária: 4h).
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Brasil.

- 2017** Análises bioinformáticas de dados gerados em plataformas NGS.
(Carga horária: 3h).
Sociedade Brasileira de Genética, SBG, Brasil.

PROJETOS DE PESQUISA

- 2018 - Atual** Identifying the drivers of insecticide resistance in Brazilian *Aedes aegypti*.

Integrantes: Bárbara Natieli Silva Pereira - Integrante / Silva Martins, Walter Fabricio - Coordenador / Silva Martins, Paulo Geovani - Integrante / Wilding, Craig Stephen - Integrante / Donnelly, Martin James - Integrante.

Financiador(es): Wellcome Trust - Auxílio financeiro.

- 2018 - Atual** Genômica da resistência a inseticidas químicos: impacto no controle de populações do mosquito *Aedes aegypti* no estado da Paraíba.

Descrição: O projeto objetiva investigar a evolução da resistência a inseticidas químicos em populações de *A. aegypti* das quatro mesorregiões do estado da Paraíba, assim como verificar o impacto dos mecanismos genéticos e bioquímicos nas populações resistentes e investigar a suscetibilidade das populações através de bioensaios utilizando os principais inseticidas e larvicidas aplicados no controle do *A. aegypti* no estado da Paraíba.

Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa.

Alunos envolvidos: Graduação: (5) / Doutorado: (1).

Integrantes: Bárbara Natieli Silva Pereira - Integrante / Rosália Santos Ferreira - Integrante / Ellen Rachel de Almeida Martins - Integrante / Camila Cavalcante Albuquerque - Integrante / Evaldo Joaquim de Farias Filho - Integrante / Silva Martins, Walter Fabricio - Coordenador / Maria Karoline da Silva Marcelino - Integrante.

Financiador(es): Universidade Estadual da Paraíba - Auxílio financeiro.

- 2017 - Atual** Determinação do perfil genético, através de marcadores autossômicos e de linhagem, e desenvolvimento de estratégias

metodológicas de inferências biogeográficas e fisionômicas a partir do DNA de populações do Nordeste para utilização em Genética Forense.

Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa.

Alunos envolvidos: Graduação: (1) / Mestrado acadêmico: (2) / Doutorado: (2) .

Integrantes: Bárbara Natieli Silva Pereira - Integrante / Anna Theresa de Souza Libera - Integrante / Valdir de Queiroz Balbino - Coordenador / Ellen Cássia de Oliveira Medeiros - Integrante / Bruno Sampaio - Integrante / Aparecida Jayane Sampaio Miranda - Integrante / Bruno Almeida Silva - Integrante.

Financiador(es): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Auxílio financeiro.

PRÊMIOS E TÍTULOS

2019 Melhor painel científico na área de Papiloscopia Forense do XV Congresso Brasileiro de Identificação, Biometrics HITech.

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigos completos publicados em periódicos

1. SILVA MARTINS, WALTER FABRICIO; **SILVA PEREIRA, BÁRBARA NATIELI**; VIEIRA ALVES, ANA THAYSE; MURPHY, ANNABEL; SILVA MARTINS, PAULO GEOVANI; WEETMAN, DAVID; WILDING, CRAIG STEPHEN; DONNELLY, MARTIN JAMES. Development and application of a tri-allelic PCR assay for screening Vgsc-L1014F kdr mutations associated with pyrethroid and organochlorine resistance in the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *Parasites & Vectors* **JCR**, v. 12, p. 232, 2019.

Resumos expandidos publicados em anais de congressos

1. FOERSTER, S. I. A. ; PEREIRA, B. N. S. ; LIRA, A. F. A. ; BALBINO, V. Q. . A estabilidade climática da Caatinga pode predizer padrões de identidade genética? Um estudo com o escorpião *Jaguajir rochae* (Borelli, 1910). In: XX Encontro de Zoologia do Nordeste, 2019, Maceió, AL. Invertebrados Terrestres, 2019.

Resumos publicados em anais de congressos

1. MIRANDA, A. J. S.; SAMPAIO, B.; **PEREIRA, B. N. S.**; Nascimento JR, J. B.; MEDEIROS, E.C.O.; SILVA, B. A.; LIBERAL, A.T.S.; BALBINO, V. Q. Análise da diversidade genética e linhagens patrilineas da população do Vale do São Francisco, Pernambuco, Brasil. In: XXIII Encontro de Genética do Nordeste, 2021. Genética humana.

2. PEREIRA, B. N. S.; BALBINO, V. Q. . Amplificação direta de DNA humano recuperado do conteúdo estomacal de formas larvais de dipteros necrofagos. In: X Jornada do Programa de Pós Graduação da Genética, 2020, Recife - PE. Bioinformática, 2020.

3. FOERSTER, S. I. A.; **PEREIRA, B. N. S.**; LIRA, A. F. A.; BALBINO, V. Q. Dispersão e atuação de barreiras ecológicas sobre a diferenciação genética de populações do escorpião *Jaguajir rochae* (Scorpiones: Buthidae). In: VI Congreso Latinoamericano de Aracnologia, 2020, Buenos Aires. Sistemática/Biogeografia, 2020.

4. FOERSTER, S. I. A.; PEREIRA, B. N. S.; LIRA, A. F. A.; BALBINO, V. Q. Potenciais determinantes de variabilidade genética em populações do escorpião *Jaguajir rochae* (Scorpiones: Buthidae) em ambientes de Caatinga. In: VI Congreso Latinoamericano de Aracnologia, 2020, Buenos Aires. Sistemática/Biogeografia, 2020.

5. NOGUEIRA, P. S. B.; MAGALHÃES, U. C. O.; **PEREIRA, B. N. S.**; MEDEIROS, E. C. O.; LIBERAL, A. T. S. Levantamento da frequência dos quatro tipos fundamentais a partir das fórmulas datiloscópicas no banco de fichas decadatilares do IITB de Pernambuco. In: Conferência Internacional de Ciências

Forenses, 2019, São Paulo, SP. Investigação de cenas de crime, 2019.

6. NOGUEIRA, P. S. B.; MAGALHÃES, U. C. O.; **PEREIRA, B. N. S.**; MEDEIROS, E. C. O.; Liberal, A. T. S. Análise de variabilidade de fórmulas datiloscópicas no banco de fichas decadatilares do IITB de Pernambuco. In: XV Congresso Brasileiro de Identificação, 2019, São Paulo, SP. Papiloscopia Forense, 2019.

7. NOGUEIRA, P. S. B.; MAGALHÃES, U.C.O.; **PEREIRA, B. N. S.**; MEDEIROS, E.C.O.; Liberal, A. T. S. Estudo estatístico da incidência de fórmulas de codificação das impressões digitais oriundas das pessoas identificadas civilmente no estado de Pernambuco. In: II Jornada Papiloscópica Pernambucana, 2019, Afogados da Ingazeira, PE. Local de crime, 2019.

8. **PEREIRA, B. N. S.**; MARTINS, W. F. S.; BALBINO, V. Q. Taxonomia molecular de dípteros necrófagos através de mtDNA. In: I Encontro de Biociências, 2019, Recife. Bioinformática, 2019.

9. FOERSTER, S. I. A.; PEREIRA, B. N. S.; LIRA, A. F. A.; da SILVA, W. D.; BALBINO, V. Q. Validação de método de extração de DNA com chelex 100 resin e amplificação da região COI (mtDNA) em duas espécies de escorpiões. In: VIII Jornada de Pós-Graduação de Genética, 2018, Recife. VIII Jornada de Pós-Graduação de Genética, 2018.

10. do NASCIMENTO, I. C.; MAGALHÃES, U. C. O.; MAIA, D. C. A.; de SANTANA, L. M. N.; MEDEIROS, E. C. O.; Nascimento JR, J. B.; **PEREIRA, B. N. S.**; da SILVA, A. G. B. F.; Liberal, A. T. S. Construção do modelo de banco de dados populacional representativo do estado de Pernambuco de frequência de minúcias decadactilar. In: I Jornada Papiloscópica Pernambucana, 2018, Recife. I Jornada Papiloscópica Pernambucana, 2018.

11. PEREIRA, B. N. S.; PUJOL-LUZ, J. R.; BALBINO, V. Q. Recuperação de DNA e identificação molecular de dípteros necrófagos não preservados. In: VIII Jornada de Pós-Graduação de Genética, 2018, Recife. VIII Jornada de Pós-Graduação de Genética, 2018.

12. da SILVA, A. L. F.; MEDEIROS, E. C. O.; **PEREIRA, B. N. S.**; LIBERAL, A. T. S.; BALBINO, V. Q. Application of the didactic game for the educational teaching of Forensic Genetics: Microbiological Apocalypse. In: XXII International Congress of Genetics, 2018, Foz do Iguaçu. XXII International Congress of Genetics, 2018.
13. MEDEIROS, E.C.O.; LIBERAL, A. T. S.; **PEREIRA, B. N. S.**; da SILVA, A. L. F.; SILVA, A. M. S.; BALBINO, V. Q. Validation of OSIRIS software for use in paternity testing. In: XXII International Congress of Genetics, 2018, Foz do Iguaçu. XXII International Congress of Genetics, 2018.
14. **PEREIRA, B. N. S.**; OLIVEIRA, J. M.; da SILVA, A. L. F.; MEDEIROS, E. C. O.; LIBERAL, A. T. S.; BALBINO, V. Q. Elaboration of a didactic game for use in the teaching of genetics and forensic entomology. In: XXII International Congress of Genetics, 2018, Foz do Iguaçu. XXII International Congress of Genetics, 2018.
15. ALVES, A.T.V.; **PEREIRA, B. N. S.**; MARTINS, P. G. S.; MARTINS, W. F. S. Desenvolvimento de triplo alelo-específico para mutação VGSC-L1014F associada a inseticidas em *Culex quinquefasciatus*. In: XXII Encontro de Genética do Nordeste, 2018, Natal. XXII Encontro de Genética do Nordeste, 2018.
16. MARTINS, W. F. S.; FERREIRA, R. S. F.; MARTINS, E. R. A.; MARCELINO, M. K. S.; ALBUQUERQUE, C. C.; FARIAS-FILHO, E. J; ALVES, A. T. V.; **PEREIRA, B. N. S.**; MARTINS, P. G. S.; WEETMAN, D.; DONNELLY, M. J. Spread of a trio of Pyrethroid-resistance Associated Target-site Mutations in Northeast Brazilian *Aedes aegypti* and its Dynamic on Evolving Insecticide Resistance. In: 2nd WIN international Conference, 2018, Singapura. 2nd WIN international Conference, 2018.
17. **PEREIRA, B. N. S.**; Nascimento JR, J. B.; MEDEIROS, E.C.O.; LIBERAL, A.T.S.; BALBINO, V. Q. Utilization of mtDNA for molecular identification of immature Diptera of forensic interest a human corpse with multiple colonization. In: Brazilian-International Congress of Genetics, 2017, Águas de Lindóia. Brazilian-International Congress of Genetics, 2017.

18. Nascimento JR, J. B.; MEDEIROS, E.C.O.; SILVA, A.M.S.; **PEREIRA, B. N. S.**; LIBERAL, A.T.S.; BALBINO, V. Q. Calculation of the genetic distance by the FST method for inference of the genetic structuring pattern of the state of Pernambuco, Brazil. In: Brazilian-International Congress of Genetics, 2017, Águas de Lindóia. Brazilian-International Congress of Genetics, 2017.

19. CORDEIRO, B.M.; Nascimento JR, J. B.; MEDEIROS, E.C.O.; SILVA, A.M.S.; LIBERAL, A.T.S.; BALBINO, V. Q.; **PEREIRA, B. N. S.** Nei genetic distance data among 11 brazilian populations. In: Brazilian-International Congress of Genetics, 2017, Águas de Lindóia. Brazilian-International Congress of Genetics, 2017.

20. MEDEIROS, E.C.O.; **PEREIRA, B. N. S.**; Silva J.H.R.; Nascimento JR, J. B.; SILVA, A.M.S.; LIBERAL, A.T.S.; BALBINO, V. Q. Identification and genetic diversity of *Cochliomyia macellaria* using mitochondrial markers. In: Brazilian-International Congress of Genetics, 2017, Águas de Lindóia. Brazilian-International Congress of Genetics, 2017.

Apresentações de trabalho

1. **PEREIRA, B. N. S.** Genética do bioterrorismo. 2019. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).

2. **PEREIRA, B. N. S.** Atuação da Universidade na Genética Forense. 2018. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).

3. **PEREIRA, B. N. S.** Atuação das Universidades na Investigação Forense. 2018. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).

4. **PEREIRA, B. N. S.** Ciência em Local de Crime: Genética Forense e Entomologia Forense. 2018. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).

5. **PEREIRA, B. N. S.** Universidade no Contexto Forense. 2017. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).

6. **PEREIRA, B. N. S.** Atuação das Universidades na Investigação Forense. 2017. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).

7. **PEREIRA, B. N. S.** Atuação das Universidades na Investigação Forense. 2017. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).

Demais tipos de produção técnica

1. **PEREIRA, B. N. S.**; MEDEIROS, E.C.O.; BALBINO, V. Q. As atribuições da genética na biologia forense. 2018. (Curso de curta duração ministrado/Outra).

2. **PEREIRA, B. N. S.** I Curso de Genética Forense: Universidade e Aplicabilidade. 2017. (Curso de curta duração ministrado/Outra).

3. **PEREIRA, B. N. S.** XIV Curso de Bioinformática: Análise de dados moleculares. 2017. (Curso de curta duração ministrado/Outra).

Bancas

Trabalhos de conclusão de curso de graduação

1. **PEREIRA, B. N. S.**; Bicho, C. L.; MARTINS, W. F. S. Participação em banca de Rosália Santos Ferreira. Análise do perfil de compra e uso de inseticidas domésticos pela população paraibana. 2021. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas - Bacharelado) - Universidade Estadual da Paraíba.

EVENTOS

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1. I Digital World Conference of Forensic Entomology. 2020. (Outra).

2. X Jornada do Programa de Pós-Graduação em Genética. 2020. (Outra).

3. I Encontro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco. Taxonomia molecular de dípteros necrófagos através de mtDNA. 2019. (Encontro).

4. I Jornada Papiloscópica Pernambucana. 2018. (Outra).

5. VIII Jornada de Pós-Graduação de Genética. Recuperação de DNA e identificação molecular de dípteros necrófagos não preservados. 2018. (Encontro).

6. XXII Encontro de Genética do Nordeste. Atuação da Universidade na Genética Forense. 2018. (Encontro).

7. XXII International Congress of Genetics. Ciência em Local de Crime: Genética Forense e Entomologia Forense. 2018. (Congresso).

8. 4º Congresso da Licenciatura em Biologia. Universidade no contexto forense. 2017. (Congresso).

9. Brazilian International Congress of Genetics. Utilization of mtDNA for molecular identification of immature diptera of forensic interest in a human corpse with multiple colonization. 2017. (Congresso).

10. VII Jornada de Pós-Graduação de Genética. 2017. (Encontro).

11. X Semana de Ensino, Pesquisa e Extensão. Atuação das Universidades na Genética Forense. 2017. (Encontro).

Organização de eventos, congressos, exposições e feiras

1. MAGALHÃES, U.C.O.; LIBERAL, A.T.S.; MEDEIROS, E. C. O.; **PEREIRA, B. N. S.** I Jornada Papiloscópica Pernambucana. 2018. (Outro).

2. **PEREIRA, B. N. S.**; Nascimento JR, J. B.; Liberal, A. T. S. I Curso de Genética Forense: Universidade e Aplicabilidade. 2017. (Outro).

3. **PEREIRA, B. N. S.**; Nascimento JR, J. B.; Liberal, A. T. S.; Balbino V.Q. XIV Curso de Bioinformática: Análise de Dados Moleculares. 2017. (Outro).