

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

**Tiago Levi Diniz Lima**

**Caracterização molecular de duas populações de**  
***Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae) do**  
**Estado de Pernambuco, Brasil**

**Recife**  
**2013**

**Tiago Levi Diniz Lima**

**Caracterização molecular de duas populações de  
*Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae) do  
Estado de Pernambuco, Brasil**

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

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

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

**Recife**

**2013**

Catálogo na fonte  
Elaine Barroso  
CRB 1728

**Lima, Tiago Levi Diniz**

**Caracterização molecular de duas populações de *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae) do Estado de Pernambuco, Brasil/  
Tiago Levi Diniz Lima– Recife: O Autor, 2013.**

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

**Orientador: Valdir de Queiroz Balbino**

**Coorientador: Roberto Pujol-Luz**

**Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Genética, 2013.**

**Inclui bibliografia**

- 1. Biologia Molecular 2. Entomologia Forense 3. Diptera II. Balbino, Valdir de Queiroz (orientador) III. Pujol-Luz, Roberto (coorientador) III. Título**

**572.8**

**CDD (22.ed.)**

**UFPE/CCB- 2013- 162**

**Tiago Levi Diniz Lima**

**Caracterização molecular de duas populações de  
*Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae) do  
Estado de Pernambuco, Brasil**

Aprovado em \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

**Banca Examinadora:**

---

**Dr. Valdir de Queiroz Balbino**  
**Universidade Federal de Pernambuco**

---

**Dra. Anna Theresa de Souza Liberal**  
**Universidade Federal de Pernambuco**

---

**Dr. Tereza Cristina Leal Balbino**  
**Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães**

**Recife**  
**2013**

Aos meus Pais (José Geraldo de Lima e Maria de Fátima Diniz Lima) por todo o suporte emocional e por serem constantes exemplos de superação.

## **Agradecimentos**

Ao CNPq e a Universidade Federal de Pernambuco pela viabilização desta pesquisa.

Agradeço aos meus pais e familiares, os alicerces da minha vida. Obrigado por todo o carinho e pelo apoio irrestrito em todas as minhas peripécias. Agradeço ainda ao meu pai José Geraldo por se mostrar tão empolgado com meus estudos sobre os califorídeos e por me ajudar em grande parte das coletas.

Ao amigo e orientador, Dr. Valdir Balbino, por todo o aprendizado nesses quase cinco anos de convívio. Obrigado pelos conselhos, pelas críticas e pela confiança depositada. Deixo aqui registrado que é uma honra poder falar que um dia fui seu aluno.

Ao meu Coorientador, Dr. José Roberto Pujol-Luz, por receber nossa equipe de braços abertos e por nos mostrar o quão fascinante o estudo dos insetos pode ser. Obrigado por me ensinar a identificá-los e por oferecer tão rico acervo bibliográfico para minhas pesquisas.

Aos membros que passaram pelo LABBE nesses meus cinco anos de casa. Obrigado pelo companheirismo, pela ajuda e por compartilharem comigo todos os obstáculos e prazeres da vida acadêmica. Especialmente aos amigos:

Carlos (jabuti) pelos constantes momentos de descontração, que tornaram a estadia de todos no laboratório mais agradável. Obrigado por aceitar o desafio de trabalhar comigo no estudo dos califorídeos de importância forense.

Marcus (Sergipe), pelos acalorados debates que sempre me ensinaram muito e por representar o modelo de pesquisador a ser seguido por todos os estudantes que fazem parte do LABBE.

Moisés, por aturar (nem sempre na esportiva) minhas brincadeiras.

Marco (Petrolina), por todo o convívio nesses anos de mestrado e graduação, pela sempre disposição e pela amizade.

À Érica Sevilha e Cecília Kosmann, pelo treinamento de identificação dos califorídeos e pela ajuda prestada todo esse tempo.

À Hercília Santos pela ajuda na identificação e coleta dos espécimes utilizados nesse trabalho.

Agradeço por fim, à Rafaela Albuquerque Gonçalves, meu amor e minha melhor amiga. Obrigado pelo carinho, pelo constante incentivo, por entender minhas ausências, por acreditar em mim e por ser a causa do meu eterno sorriso.

“Ao verme que primeiro roeu as  
frias carnes do meu cadáver dedico  
com saudosa lembrança estas  
memórias...”.

(Machado de Assis)

## Resumo

A Entomologia Forense pode ser compreendida como uma vertente da ciência que procura se utilizar do estudo de insetos e outros artrópodes para elucidar questões litigiosas tais como morte violenta, uso de entorpecentes e inúmeros outros casos que se apresentam à investigação criminal. A análise da sucessão de artrópodes permite a associação de cada espécie ou grupo com um estágio de decomposição. Os dípteros caliptrados possui preferência pelos estágios iniciais do processo de decomposição, entre eles *C. megacephala* corresponde a uma das espécies de maior representatividade na entomofauna cadavérica, além de possuir importância médico-sanitária como agente transmissor de patógenos. A entomologia forense no Brasil ainda é subotimizada, com concentração de trabalhos nas regiões Sul-Sudeste do país. Sendo assim, o trabalho é justificável por apresentar uma contribuição ao levantamento dos dípteros caliptrados de importância forense no Estado de Pernambuco, além de promover a categorização genética (análise do polimorfismo do gene *Citocromo Oxidase de DNA Barcode (COI)* das populações de *C. megacephala* com o intuito de procurar atribuir aos espécimes sua população geográfica. Os resultados encontrados apontam elevada adaptação da espécie invasora *C. megacephala* as localidades estudadas. Os estudos com o marcador *COI* apresentaram uma elevada similaridade entre as sequências, ilustrando uma incapacidade do marcador em estimar a diversidade genética de populações recém introduzidas. Com o trabalho é possível concluir que outras metodologias, como análises multigênicas devem ser adotadas para se estudar populações com diversificação recente.

**Palavras-chave:** *C. megacephala*; Entomologia Forense; Biologia Molecular

## Abstract

The forensic entomology can be understood as a branch of science that seeks to utilize the study of insects and other arthropods to clarify contentious issues such as violent death, use of narcotics and numerous other cases that are presented to the criminal investigation. An analysis of arthropod succession allows the association of each species or group with one stage of decomposition. The dipteran calyptrate have preference for early stages of the decomposition process, including *C. megacephala* corresponds to one of the most representative species of the insect fauna mortis, also has important medico-sanitary agent may transmit pathogens. Forensic entomology in Brazil is still sub optimized with concentration of jobs in the South-East of the country. Thus, the present work is justified by a contribution to the lifting of calyptrate flies of forensic importance in the State of Pernambuco, in addition to promoting genetic categorization (polymorphism analysis of gene *COI*) populations of *C. megacephala* in order to seek to assign specimens its geographic population. The results show high adaptation of the invasive species *C. megacephala* localities studied. Studies with marker *COI* showed a high similarity between the sequences, illustrating the inability of the marker to estimate the genetic diversity of populations recently introduced. With the work we conclude that other methodologies, such as multigene analyzes should be adopted to study populations with recent diversification.

**Key words:** *C. megacephala*, forensic entomology, molecular biology.

## Lista de Ilustrações

Figura 1	Subdivisões da Entomologia Forense.	04
Figura 2	Artrópodes encontrados em cenas de crime.	04
Figura 3	Identificação do tempo de morte de Isabela Tainara, através do uso de artrópodes de importância forense	11
Figura 4	Principais dípteros de importância forense.	12
Figura 5	Vista dorsal de um espécime de <i>Crysomya megacephala</i> .	15
Figura 6	Dispersão do gênero <i>Chrysomya</i> no Brasil.	16
Figura 7	Distribuição geográfica (até 1979) dos membros do gênero <i>Chrysomya</i> , introduzidos no país.	17
Figura 8	Características morfológicas de <i>C.megacephala</i> .	18
Figura 9	Representação esquemática do gene COI	21
Figura 10	Mesorregiões do Estado de Pernambuco.	24
Figura 11	Armadilha utilizada nas coletas.	25
Figura 12	Espécies encontradas nos municípios de Brejo da M. de Deus e Tamandaré.	30
Figura 13	Elaboração da sequência consenso formado pelos <i>primers</i> direto e reverso utilização do Staden 1.6.	31

## Lista de Tabelas

Tabela 01: Relatório das coletas nos municípios pernambucanos de Brejo da Madre de Deus e Tamandaré. FA e FR correspondem as frequências absolutas e relativas das espécies encontradas.	29
Tabela 02: Análise molecular das populações (avaliação dos sítios polimórficos , da diversidade haplotípica, nucléotídica, número médio de diferenças e o tipo de mutação) de Tamandaré e Brejo da Madre de Deus.	32

## Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

Item	Definição
<i>C. albiceps</i>	<i>Chrysomya albiceps</i>
<i>C. megacephala</i>	<i>Chrysomya megacephala</i>
<i>C. putoria</i>	<i>Chrysomya putoria</i>
<i>Ch. idioidea</i>	<i>Chloroprocta idioidea</i>
<i>Co. hominivorax</i>	<i>Cochliomyia hominivorax</i>
<i>Co. macellaria</i>	<i>Cochliomyia macellaria</i>
COI	Citocromo oxidase I
FA	Frequência Absoluta
FR	Frequência Relativa
IPM	Intervalo post-mortem
LABBE	Laboratório de Bioinformática e Biologia Evolutiva
mm	Milímetros
mtDNA	DNA mitocondrial
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> /Reação em Cadeia da Polimerase
μm	Micrômetro

## Sumário

<b>Resumo</b>	<i>Vii</i>
<b>Abstract</b>	<i>Viii</i>
<b>Lista de ilustrações</b>	<i>Ix</i>
<b>Lista de tabelas</b>	<i>X</i>
<b>Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos</b>	<i>Xi</i>
<b>1. Introdução</b>	1
<b>2. Revisão da Literatura</b>	3
<b>2.1 Entomologia Forense e Suas Aplicações</b>	3
<b>2.2 Histórico da Entomologia Forense</b>	7
<b>2.3 Fauna Decompositora</b>	12
<b>2.4 <i>Chrysomya megacephala</i></b>	14
<b>2.5 Biologia Molecular</b>	19
<b>3. Objetivos</b>	23
<b>4. Material e Métodos</b>	24
<b>5. Resultados</b>	29
<b>6. Discussão</b>	34
<b>7. Conclusões</b>	38

<b>8. Referências Bibliográficas</b>	<b>39</b>
<b>9. Currículo Lattes atualizado (correspondente ao período do curso)</b>	<b>44</b>

## 1. Introdução

A Entomologia Forense pode ser compreendida como uma vertente da ciência que procura se utilizar do estudo de insetos e outros artrópodes para elucidar questões litigiosas tais como morte violenta, uso de entorpecentes e inúmeros outros casos que se apresentam à investigação criminal.

Ao procurar compreender a composição da fauna necrófaga, bem como as características do ciclo de vida de cada uma dessas espécies, o entomólogo forense pode contribuir com o sistema judicial estimando o intervalo post-mortem (IPM). Na medicina legal, a cronologia da morte é comumente aferida observando-se a rigidez cadavérica, esfriamento do cadáver, alterações oculares entre outros fenômenos. Não obstante, com o avançar do processo de decomposição, as tradicionais formas de estimação do IPM podem se apresentar como imprecisas. Nesse sentido, a entomologia forense é capaz de oferecer um parecer alternativo sobre a cronologia da morte.

Os dípteros e coleópteros são considerados os dois principais grupos de importância forense, com destaque para Calliphoridae, Sarcophagidae e Muscidae dentre os dípteros, Silphidae, Scarabaeidae e Staphylinidae nos coleópteros. Os dípteros atuam preferencialmente nas fases iniciais dos processos de decomposição, atraídos além do odor de putrefação fresca, por estímulos visuais, umidade, pela presença de carnes moles, bem como compostos ricos em amônia e sulfeto. Entre os dípteros de importância forense *C. megacephala* se destaca por ser uma das mais representativas espécies da entomofauna cadavérica, além de possuir importância médico-sanitária como agente transmissor de patógenos.

Ainda que a Entomologia Forense sirva como uma ferramenta auxiliar ao sistema judicial na elucidação de crimes e outras ações legalistas, seus estudos ainda são incipiente em nosso país, com a concentração de trabalhos nas regiões sul e sudeste do Brasil. Sendo necessário, portanto, fomentar o desenvolvimento de mais estudos que procurem englobar outras áreas do país.

Sendo assim, o trabalho é justificável por além de contribuir no levantamento dos califorídeos de importância forense no Estado, apresentar pela primeira vez a caracterização molecular (através do fragmento do gene *Citocromo Oxidase de DNA Barcode*) de populações de *C. megacephala* no Estado de Pernambuco.

## **2. Revisão da Literatura**

### **2.1 Entomologia Forense e Suas Aplicações**

A Entomologia Forense pode ser compreendida como uma vertente da ciência que procura se utilizar do estudo de insetos e outros artrópodes para elucidar questões litigiosas. Seu surgimento é decorrente da demanda que o poder judiciário tem por pareceres alternativos que melhor esclareçam as imprecisões inerentes ao processo judicial. A partir dos trabalhos de Lord & Stevesson (1986) a entomologia forense foi subdividida em três áreas: urbana; produtos armazenados; e médico legal (Oliveira-Costa, 2008; Kosmann, 2009).

Na Entomologia Forense do tipo urbana o foco do estudo consiste na interação dos artrópodes com o ambiente citadino. É nesse ramo que se situam as disputas legais envolvendo imóveis infestados por insetos, caberia então ao perito, um parecer ilustrando o tempo em que ocorrera a infestação (Figura 1a). A Entomologia Forense de produtos armazenados procura resolver questões que envolvam a estocagem deficiente de determinados produtos de importância comercial (Figura 1b). Entre esses produtos, podem-se destacar os materiais provenientes do setor alimentício, que estocados de maneira inadequada produzem micro-habitats favoráveis à infestação de diversos insetos. De maneira similar ao observado na Entomologia Forense do tipo urbana o perito é responsável por esclarecer o tempo em que ocorreu a infestação e assim estabelecer a culpabilidade da empresa responsável por estocar o produto ou do cliente que depois de efetivar a compra conservou o produto de maneira ineficaz (Thyssen, 2000; Pujol-Luz *et al.*, 2008)

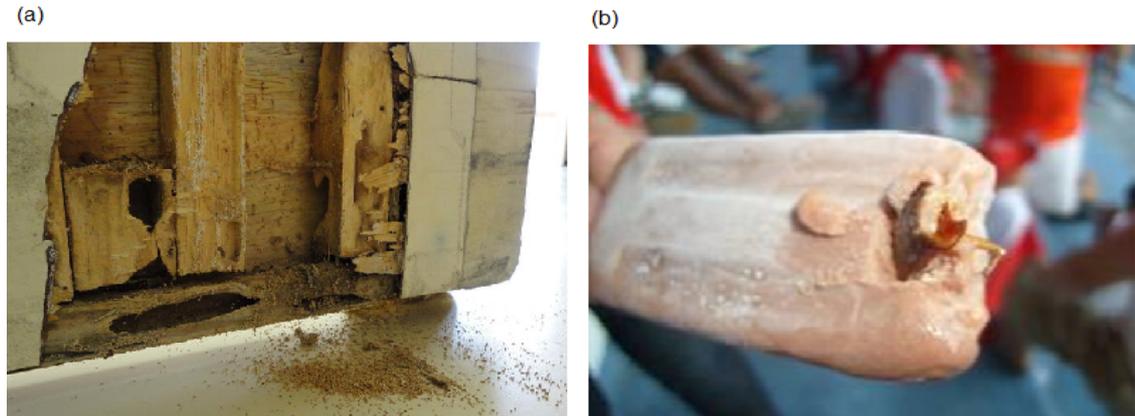


Figura 1: Subdivisões da Entomologia Forense. a) Entomologia Forense do Tipo Urbana. b) Entomologia Forense de Produtos Armazenados. (Disponível em: <http://www.hagah.com.br/rbs/image///12863706.jpg> e <http://migre.me/cOFaF>; acesso em 15/11/2012).

A última das subdivisões diz respeito às questões médico-legais (Figura 2); os artrópodes podem ser encontrados em uma diversidade de ambientes, entre eles as cenas de crimes. Em virtude de sua elevada capacidade olfativa, os insetos necrófagos, sobretudo os dípteros, são os primeiros a promover a colonização cadavérica, apresentando preferência pelos orifícios naturais do corpo e eventuais feridas abertas (Frasson *et al.*, 2006; Erzinçlioglu, 1983; Amendt *et al.*, 2007)



Figura 2: Artrópodes encontrados em cenas de crime. a) larvas de dípteros encontradas em rosto de cadáver. b) corpos encontrados na Amazônia brasileira (IPM definido a partir da coleta dos insetos presentes na cena de crime). Fonte: Byrd & Castner (2000) e Pujol *et al.* 2006).

Ao procurar compreender a composição da fauna necrófaga, bem como as características do ciclo de vida de cada uma dessas espécies, o entomólogo forense pode contribuir com o sistema judicial estimando o intervalo post-mortem (IPM). Na medicina legal, a Cronotanatognose (Cronologia da morte) é comumente inferida através da observação de determinados fenômenos que incidem sobre o cadáver, entre os fenômenos pode-se destacar: esfriamento do cadáver, rigidez cadavérica, manchas de hipóstase, crescimento do pelo, nível de potássio no humor vítreo, alterações oculares e conteúdo gástrico. Não obstante, com o avançar do processo de decomposição, as tradicionais formas de estimação do IPM podem se apresentar como imprecisas. Nesse sentido, a entomologia forense é capaz de oferecer um parecer alternativo sobre a cronologia da morte mediante a utilização de duas metodologias distintas: análise do ciclo de vida e sucessão ecológica (Thyssen, 2000; Oliveira-Costa, 2008).

A análise do ciclo de vida consiste no artifício mais utilizado pela perícia forense na determinação do IPM. Segundo essa técnica o perito lança mão do seu conhecimento acerca da taxonomia e ecologia de insetos forenses para categorizar quais as espécies presentes no cadáver, bem como o padrão de desenvolvimento dessas espécies. Através da compreensão do ciclo de vida dos insetos encontrados *in loco*, é possível estimar a idade larval e determinar diretamente o tempo ao qual o corpo esteve exposto (Pujol-Luz *et al.*, 2008)

Pujol-luz *et al* (2006) ilustra o primeiro caso de identificação de corpos por entomologia forense na Amazônia brasileira. No Parque Indígena Aripuana (Rondônia-RD, Brasil), 26 corpos foram encontrados, a maioria deles mortos por

traumatismo crânio-encefálico. O intervalo post-mortem mínimo foi identificado a partir da datação dos imaturos da espécie *Paralucilia fulvinota*.

O método da sucessão ecológica, inicialmente proposto por Mégnin (1894), é fundamentado na ideia de que transformações observadas no cadáver (em especial as variações odoríferas) ao longo do processo de decomposição tendem a atrair uma série de artrópodes diferentes que apresentarão preferência por uma ou outra fase da degeneração cadavérica. Os dípteros podem ser encontrados na maior parte dos estágios, não obstante predominam nas primeiras fases da decomposição do cadáver. As fases mais avançadas são preferencialmente colonizadas por coleópteros e outros artrópodes que degradam a matéria orgânica dura (com aparência resinosa). A reconstrução do processo *post-mortem* consistiria então na observação de qual agrupamento de insetos seriam observados no corpo (Hall, 2011)

Além da estimativa do IPM, o estudo da entomofauna cadavérica é útil ao sistema judicial por esclarecer outros questionamentos que possam surgir durante o processo, como por exemplo: a causa *mortis*; a ligação de indivíduos com a cena de crime; a presença de substâncias tóxicas no cadáver; ou se restos mortais sofreram deslocamento na tentativa de confundir a polícia.

O comportamento dos artrópodes na cena de crime pode de maneira indireta promover alterações na cena do crime. Ao procurar realizar sua alimentação os insetos podem acabar desmembrando alguma parte do corpo, bem como podem promover a ocultação (soterramento) desses restos mortais. A alteração da cena de crime, mediante ação de insetos, constitui um desafio às perícias forenses, obrigando aos peritos uma maior atenção sobre a ecologia da decomposição (Byrd & Castner, 2011). A necessidade de entender como insetos podem

modificar uma cena de crime é tal, que existe um ramo da Entomologia Forense (A Tafonomia) preocupado em entender como as variáveis ambientais, bióticas e abióticas alteram as evidências que são objetos de uma investigação criminal (Pujol-Luz *et al.*, 2008).

Ainda relacionado ações criminosas, a entomologia forense pode ser útil no rastreamento de drogas ilícitas e na confirmação de maus tratos a menores ou idosos. Em 2011, a polícia federal utilizando o estudo sobre os fragmentos de insetos encontrados em uma amostra de maconha, pode descobrir que a origem da droga teria sido produzida no Paraguai. (Disponível em: <http://goo.gl/GH8Gp>. Acesso 12 de fevereiro de 2013).

## **2.2 Histórico da Entomologia Forense**

O caso mais antigo de utilização de insetos para fins forenses data do século XIII, ocorrendo na China em 1235 durante a dinastia Song. Sung Tz'u, autor do manual "*The washing away of wrongs*" relata um caso de homicídio onde um camponês teve a cabeça decepada por instrumento de ação corto-contundente; na tentativa de encontrar pistas sobre o possível suspeito, as autoridades chinesas intimaram os camponeses da região a se apresentarem com suas foices. Ao analisarem os materiais, as autoridades perceberam que as moscas tinham preferência por uma foice específica, provavelmente atraídas por odores exalados de compostos orgânicos presentes no instrumento e imperceptíveis a olho nu. Seguindo-se o interrogatório, o suspeito acabou confessando sua participação no homicídio (Frasson, 2006; Pujol-Luz 2008; Kosmann 2009; Benecke, 2001).

Apesar de a entomologia forense ter sido aplicada séculos antes, foi apenas no século XIX que os insetos começaram a ser utilizados na datação do intervalo

*post-mortem*. O médico francês Bergeret, relata em seu estudo (1855) o caso de uma garota encontrada enterrada no interior de um imóvel, coberta com uma camada de gesso. Bergeret utilizou da análise do ciclo de vida, da entomofauna presente na colonização do cadáver, para estimar o tempo de morte da criança e inocentar os então moradores que tinham adquirido o imóvel há pouco tempo (Benecke, 2001)

Nove anos depois de Bergeret iniciar os trabalhos envolvendo artrópodes e a determinação da cronologia da morte, Jean Pierre Mégnin (veterinário do exército francês) publica o primeiro livro sobre a temática, intitulado “*La Faune des Cadavres*” (Benecke, 2001). No livro Mégnin elabora o arcabouço teórico da entomologia forense, procurando associar suas proposições aos casos em que ele trabalhou. Uma das conclusões apresentadas pelo autor diz respeito ao processo de sucessão ecológica que ocorrerá no cadáver ao longo dos estágios de decomposição (Mégnin, 1894).

No final do século XX, duas publicações de grande impacto nos estudos forenses foram lançados. *Entomology and Legal Medicine* de Marcel Leclercq, publicado em 1969 e *A Manual of Forensic Entomology* de Kenneth Smith, publicado em 1986. Os dois livros ganharam importância na Entomologia Forense por apresentarem a preocupação de aproximarem os entomologistas dos profissionais criminalistas (Pujol-Luz *et al.*, 2008)

No Brasil, os primeiros trabalhos envolvendo entomologia forense foram publicados por Oscar Freire e Roquete-Pinto. Em 1908, o médico-legal Oscar Freire apresentou à Sociedade Médica do Estado da Bahia a primeira coleção de insetos de importância forense do Brasil (Frasson 2006). Em 1914, Oscar Freire publica na Gazeta Médica da Bahia o levantamento das espécies por eles

encontradas em Salvador, na Ilha de Bom Jesus dos Passos (64 Km da capital) e na vila de Santa Luzia (elevada a categoria de cidade desde 1933, situando-se a 524 Km de Salvador). Postumamente, em 1923 a obra completa de Oscar Freire foi publicada na Revista de Medicina sob o título de “Fauna cadavérica brasileira” (Freire, 1914a; Freire 1914b; Freire, 1923; Pujol-Luz 2008).

No mesmo ano (1908) em que Oscar Freire apresentou a sociedade médica baiana sua coleção de insetos forense, Roquete-Pinto publicou (em novembro) na revista “A Tribuna Médica” o seu estudo sobre a Fauna cadavérica do Rio de Janeiro (Roquete-Pinto, 1908). Ainda nesse artigo o autor ilustrou a dificuldade de se adaptar o modelo rígido de sucessão ecológica proposto por Pierre Mégnin ao que se observava nos trópicos:

*(...)Antes de ir além, devo notar aqui a incerteza desses fatos na zona tropical. O período de três meses que decorre com essas espécies na Europa basta e sobra, no Rio de Janeiro. Assim eu tenho visto que pude identificar Lucilia, gênero este que só aparece naquela região e acreditando em Mégnin, no fim do terceiro mês (Roquete-Pinto, 1908).*

Nos vinte anos seguintes aos trabalhos iniciais de entomologia forense no país, Herman Lüderwaldt, Samuel Pessôa e Frederico Lane procuraram apresentar a fauna necrófaga de escarabeídeos do Estado de São Paulo (revisto por Pujol *et al.*, 2008). Entre as décadas de 1940 e 1970 muito poucos trabalhos foram desenvolvidos na área. Apenas ao final dos anos 1970 é que novos grupos começaram a se organizar, o principal coordenador dessa nova fase das pesquisa forense brasileira foi o Dr. Arício Xavier Linhares. Sob a coordenação dele J. H.

Guimarães registrou em 1978, a introdução no país de três espécies de *Chrysomya* do velho mundo: *Chrysomya chloropyga*; *C. megacephala*; e *C. albiceps* (Thyssen, 2000)

A década de 90, assim como nos anos anteriores, ficou marcada por trabalhos desenvolvidos nas regiões sul-sudeste do país. Nesse período se destacaram os estudos de Oliveira-Costa (1999) e Oliveira-Costa & Mello-Patiu (2004) sobre o padrão de sucessão de espécies necrófagas no Estado do Rio de Janeiro.

A partir da primeira década do século XXI a entomologia forense conseguiu se dispersar para outras áreas do território brasileiro. Grupos de pesquisa começaram a se desenvolver nos estados do Rio Grande do Norte, Pernambuco, Amazonas e no Distrito federal (Pujol-Luz *et al.*, 2008). Sob a coordenação do Dr. José Roberto Pujol-Luz, a Universidade de Brasília começou a atuar em parceria com a Polícia Federal em casos de importância criminal. No ano de 2006, o autor e seus colaboradores publicam na *Journal Forensic Science* um estudo de caso envolvendo a identificação do IPM de 26 corpos na Amazônia brasileira. Em 2007 sob a coordenação de Pujol-Luz o Centro Regional de Entomologia Forense do Distrito Federal (Cref/DF-UNB) foi responsável por estimar o IPM da jovem Isabela Tainara Faria desaparecida e encontrada morta mais de 45 dias depois (Figura 3).



Figura 3: Identificação do tempo de morte de Isabela Tainara, através do uso de artrópodes de importância forense. (Disponível em <http://www.ibsweb.com.br/seminario-abpc/files/palestras/IB-21092010-Entomologia-3Aula.pdf>; acesso em 22/12/2012).

Apesar do crescimento no número de entomólogos forenses no Brasil, as pesquisas ainda são incipientes, muito pelo fato de que os trabalhos produzidos nas universidades ainda hoje estejam muito distantes dos setores investigativos de nosso poder judicial. No intuito de propiciar maiores investimentos para a área, o governo do então presidente Lula criou a Rede Nacional de Entomologia Forense – ReNEF (vinculada a Secretaria Nacional de Segurança Pública do Ministério da Justiça), composto por pesquisadores e peritos dos estados do Amapá, Amazonas, Bahia, São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná e Distrito Federal. O desenvolvimento e estímulo de pesquisas em entomologia forense, a elaboração de mais parcerias entre universidades e polícias, além da padronização de técnicas, são considerados os objetivos primordiais do ReNEF (Pujol-Luz *et al.*, 2008).

## 2.3 Fauna Decompositora

Durante o processo de decomposição de um cadáver, inúmeros artrópodes são atraídos para a carcaça, não obstante, nem todos correspondem a espécies necrófagas. Por essa razão, as espécies que são encontradas na entomofauna cadavérica são divididos em quatro grupos: necrófagas, predadoras ou parasitoides, onívoras e acidentais (Oliveira-Costa, 2008)

As espécies necrófagas se alimentam diretamente do substrato em decomposição. Os dípteros e coleópteros são considerados os dois principais grupos de importância forense, com destaque para Calliphoridae, Sarcophagidae e Muscidae (figura 4) dentre os dípteros, Silphidae, Scarabaeidae e Staphylinidae nos coleópteros. Os dípteros atuam preferencialmente nas fases iniciais dos processos de decomposição, atraídos além do odor de putrefação fresca, por estímulos visuais, umidade, pela presença de carnes moles, bem como compostos ricos em amônia e sulfito. (Souza, 1994)

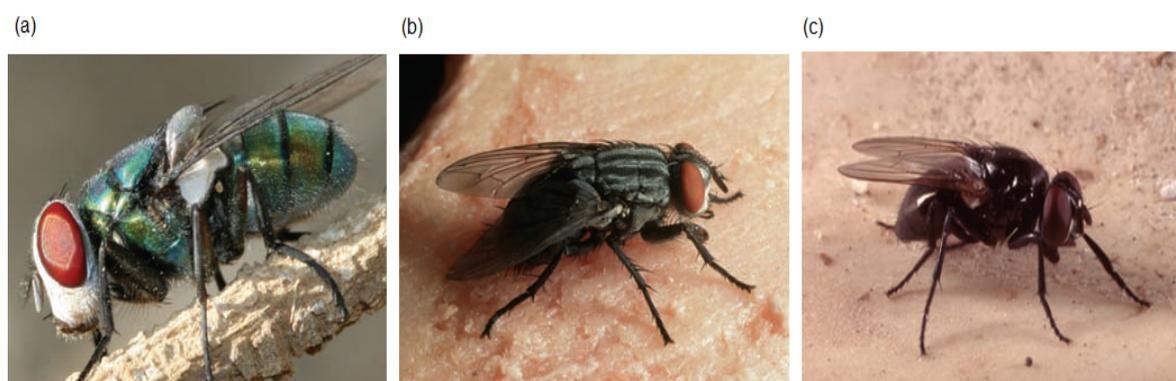


Figura 4: Principais dípteros de importância forense. a) Família Calliphoridae. b) Sarcophagidae. c) Muscidae. Fonte: Byrd and Castner (2010)

Os coleópteros, por sua vez, são encontrados prioritariamente nas fases finais do processo de decomposição, atraídos pelos odores decorrentes do

processo de fermentação burítica e posterior ressecamento do substrato. Em muitos casos coleópteros podem ser encontrados em fases mais recentes, Cruz and Vasconcelos (2006) descrevem a presença de Staphylinidae nos primeiros estágios da decomposição, contudo, nessa fase os coleópteros tendem a se alimentar dos insetos necrófagos que apareceram para decompor o cadáver, deixando então de atuarem (durante esse período) como insetos necrófagos.

Espécies predadoras ou parasitoides encontram-se presentes na fauna cadavérica não pelo substrato em decomposição, mas sim pelas espécies que vão procurar colonizar o cadáver. Espécies incorporadas nesse grupo se alimentam dos ovos, larvas e pupas dos invertebrados presentes no local. O grupo dos onívoros diz respeito ao grupo de insetos que podem se alimentar tanto do material em decomposição quanto dos seus colonizadores. É nesse grupo que formigas e vespas são inseridas. O último dos grupos corresponde a artrópodes que são encontrados de maneira eventual, utilizando a carcaça como uma extensão de seu ambiente, com o intuito de ter abrigo ou alguma proteção, como por exemplo, Lepidópteros e Aracnídeos (Souza, 1994)

Em decorrência de sua maior frequência em todos os estágios da decomposição os artrópodes dos tipos necrófagos e predadores são os que denotam maior atenção dos estudos de entomologia forense. Principalmente os dípteros necrófagos, membros da família dos Califorídeos, popularmente rotulados de moscas varejeiras (Cruz & Vasconcelos 2006)

A família Calliphoridae corresponde a um dos mais importantes grupos responsáveis pela ciclagem de nutrientes, pois a maioria das espécies da família possuem hábitos necrófagos. Mais da metade dos seus gêneros é restrita ao velho mundo, no Brasil a família é representada por 14 gêneros. (Thyssen, 2000).

Além da sua importância como agente decompositor os califorídeos possuem importante papel médico-sanitário, uma vez que são responsáveis por invadirem tecidos e órgãos de homens e animais causando lesões conhecidas como Míases que podem ser cutâneas, cavitárias ou intestinais. (Moretti & Thyssen, 2006; Oliveira, 2004; Rego & Fraiha, 1982; Guimarães, Papavero & Prado). Várias espécies de califorídeos possuem elevado poder de adaptação ao ambiente urbano sendo atraídos por fezes e lixos e atuando como agentes patogênicos (Iacopini, 2006; Ribeiro, 2003; Souza, 1997). Morfologicamente califorídeos apresentam coloração metálica com tons azulados, esverdeados, violáceos ou cúpricos e aparelho bucal do tipo lambedor bem desenvolvido. Possuem tamanho que varia de 4 a 16 milímetros, caliptra bem desenvolvida e escudo com duas ou três faixas. Diferem dos Muscidae por apresentarem uma fila de cerdas merais e dos Sarcophagidae pela coloração metálica e por apresentarem 2 ou 3 cerdas notopleurais (Papavero *et al*; 2002).

#### **2.4 *Chrysomya megacephala***

Os membros da espécie *C. megacephala* (Figura 5) possuem um elevado poder adaptativo, sendo capazes de colonizar diversos ambientes. Seu elevado grau de sinantropismo (Nuorteva, 1963; Ferreira & Lacerda 1993; Iacopini 2006), aliado à presença frequente em substratos em processo de decomposição, tornam essa espécie uma das mais estudadas nas pesquisas de entomologia forense. Apresentam ainda importância médico-sanitária uma vez que são também responsáveis por causarem míases e por atuarem como vetores mecânicos de diversos patógenos (D' Almeida & Almeida, 1998; Godoy *et al.*, 1997).



Figura 5: Vista dorsal de um espécime de *Crysomya megacephala*.

Naturais da Australásia (Austrália, Nova Zelândia, Nova Guiné) e da Ásia, a espécie encontra-se em franca expansão ao longo do globo, muito em decorrência do fluxo contínuo de animais e pessoas de um continente para o outro. No Continente africano os primeiros relatos da presença de *C. megacephala* ocorreram em Gana e no Senegal (1977), nos estudos de Kurahashi (1978). Também em 1977, foram encontradas em Capetown (África do Sul), após um levantamento das espécies colonizadoras de carcaças no litoral sul africano. (Willians & Villet 2006)

Segundo Willians & Villet (2006) uma espécie depositada no Natal Museum em 1971 foi a posteriori identificada por Zumpt em 1979, indicando que a espécie teria se dispersado anos antes. Ao procurar levantar hipóteses sobre a maneira como *C. megacephala* pode ter chegado à África do Sul, os autores argumentam que a espécie pode ter adentrado no país graças aos desembarques de pessoas, animais e produtos vindos da República do Maurício (ilha localizada no oceano Índico onde *C. megacephala* é relatada desde 1962) nos portos sul-africanos. Em seguida, esses califorídeos teriam se dispersado rapidamente para o resto do

país, já que são capazes de percorrer em menos de uma década mais de 3.000 Km.

Na Europa continental os relatos são ainda mais recentes, a primeira citação à espécie ocorreu no sudoeste da Espanha em 2001 (Rognes, 2004). Entre 2007 e 2008 Castro & Garcia (2009) identificaram 23 espécimes de *C. megacephala* em Lisboa-Portugal.

Nas Américas a espécie foi encontrada pela primeira vez no sudeste do Brasil no município de São Paulo. Guimarães *et al.* (1978), informa o a introdução de três espécies do gênero *Chrysomya* no Brasil: *Chrysomya chloropyga*, *Chrysomya albiceps* e *Chrysomya megacephala*, as duas primeiras sendo encontradas nos Estados do Paraná e em São Paulo e a última restrita (na época da publicação) ao Estado de São Paulo. No ano seguinte ao estudar o padrão de dispersão dessas espécies Guimarães *et al.* (1979) aponta que *Chrysomya chloropyga*, *Chrysomya albiceps* correspondem às espécies com maior poder de dispersão. *C. chloropyga* chegou a ser encontrada no Estado do Pará (Figura 6)



Figura 6: Dispersão do gênero *Chrysomya* no Brasil segundo Guimarães *et al.* (1979).

Apesar de possuir um menor poder de dispersão quando comparada com suas congêneres, *Chrysomya megacephala* apresentou um maior capacidade adaptativa ao ambiente urbano, concentrando sua população nos Estados de São Paulo e Rio de Janeiro.

Ao procurar as origens das introduções do gênero *Chrysomya* no Brasil Guimarães *et al.* (1979) argumenta que as espécies podem ter sido conduzidas através de navios que transportavam animais e pessoas de Angola para o Brasil, em baixas condições sanitárias (Figura 7). É importante explicar que durante os anos de 1975 e 1976, em decorrência da Revolução dos Cravos (Portugal) e de uma possível independência angolana, um grande número de moradores de Angola procurou fugir desse clima de instabilidade e migraram para o Brasil. Esse evento pode explicar a introdução de *Chrysomya chloropyga*, *Chrysomya albiceps*, haja vista que essas espécies se encontravam bem estabelecidas no continente africano antes da introdução no território brasileiro. Não obstante, a evidência de *C. megacephala* no continente africano ocorre de maneira concomitante a observação de Guimarães 1978 no Estado de São Paulo, o que enfraquece a adoção dessa hipótese de introdução para os membros dessa espécie.

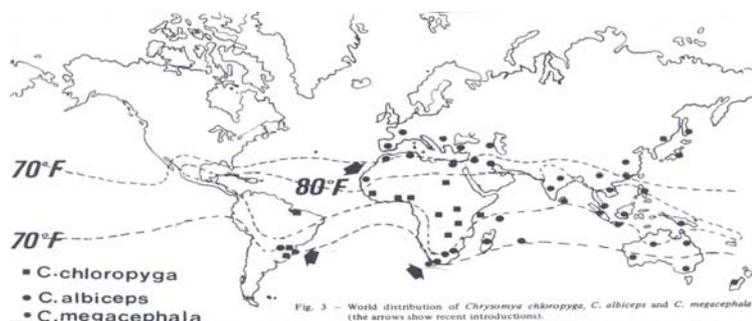


Figura 7: Distribuição geográfica (até 1979) dos membros do gênero *Chrysomya*, introduzidos no país. Fonte: Guimarães *et al.*,(1979).

Azeredo-Espin & Pavan (1983) ao observarem as características dos cariótipos das três espécies de *Chrysomya* introduzidas no país, chegam à conclusão de que *C. chloropyga* e *C. albiceps* apresentam uma maior similaridade com populações naturais do continente africano. No entanto, *C. megacephala* apresentou um cariótipo mais parecido com o de espécies coletadas no Japão, levando a crer que essa espécie fora introduzida no Brasil a partir de um evento distinto de suas espécies congêneres.

No tocante a suas características morfológicas, *C. megacephala* possui tórax de coloração metalizada, cabeça hiperdesenvolvida, tergitos abdominais, com faixas pretas transversas, nervura medial angulosa, nervura radial dorsalmente pilosa e ventralmente sem pelos, caliptra com pelos dorsais e espiráculo de cor cinza (Figura 8). Os machos ainda possuem olhos com facetas superiores mais largas que as inferiores. Possuem um ciclo de vida dividido em 4 fases: Ovo, Larva, Pupa e Inseto adulto. A fêmea é comumente realiza a postura de seus ovos no substrato em decomposição, apresentando uma produção média de duzentos ovos. A larva possui três instares, que possuem duração total de 3 dias, com um período pupal de 3,5 dias.

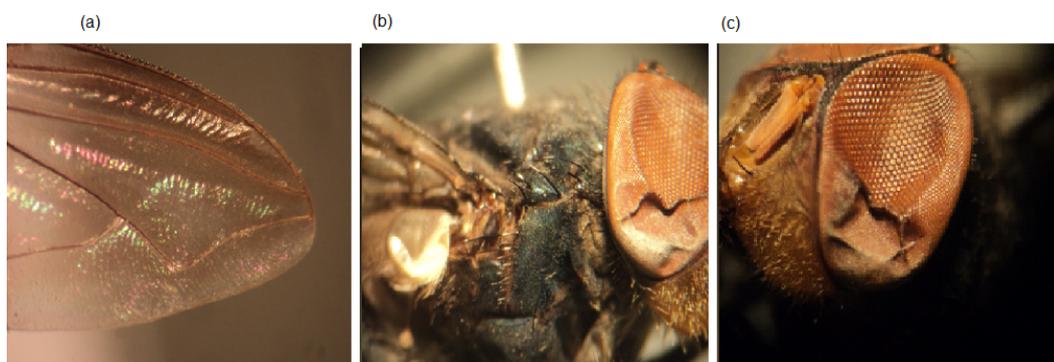


Figura 8: Características morfológicas de *C. megacephala*. a) Nervura mediana distintamente angulosa. b) Espiráculo torácico de cor cinza. c) Machos com diferenças entre as facetas oculares.

## 2.5 Biologia Molecular

Um dos problemas associados ao estudo de insetos para fins forenses, diz respeito à identificação morfológica dos espécimes encontrados nas cenas de crime. Muitas espécies de califorídeos são indistinguíveis em estágios imaturos, mesmo na fase adulta alguns caracteres morfológicos são de difíceis distinções: Pequenas variações de cor nos espiráculos, tamanho dos palpos, presença ou ausência de pelos parasquamal, são alguns exemplos de observações que necessitam da expertise do profissional responsável pela identificação.

No Brasil, além da carência de profissionais aptos na caracterização morfológica da entomofauna cadavérica, o tempo que essa identificação demanda também serve como um obstáculo a maior utilização da entomologia para fins forenses. Com o intuito de auxiliar os taxonomistas, estudos na área de biologia molecular têm sido desenvolvidos visando diminuir o intervalo entre a coleta dos espécimes e sua identificação, bem como permitir a identificação de insetos mesmo quando esses possam estar mutilados (Kosmann, 2009)

No tocante aos marcadores moleculares, o DNA mitocondrial (mtDNA) tem se apresentado como o mais frequente em estudos envolvendo identificação da origem de espécies, filogeografia, genética de populações e evolução molecular (Zhang & Hewitt, 1997; Ward *et al.*, 2005). Dentre as características que propiciam a elevada utilização do mtDNA em estudos moleculares destacam-se: o fato do mtDNA ser uma molécula haplóide que é adquirida por herança materna não possuindo íntrons, elementos transponíveis, duplicações ou realizando crossing overs (Wells & Stevens 2008). O mtDNA possui um tamanho aproximado de 17 kpb, apresentando somente 37 genes, sendo 13 subunidades de proteínas relacionadas a fosforilação oxidativa (*COI*; *COII*; *COIII*; *CYTB*; *ATP6*; *ATP8*; *ND1*;

*ND2; ND3; ND4; ND4L; ND5; ND6*); duas unidades de RNAs ribossomais: (16S e 12S) e 22 tRNAs.

Outra característica importante é o mecanismo de reparo pouco preciso quando comparado ao sistema de reparo do DNA nuclear, promovendo no mtDNA um número de até dez vezes mais mutações. Essa elevada taxa de mutação acarreta uma maior chance da geração de marcadores espécie-específicos, fundamentais para a filogenia de espécies próximas. Além destes fatores, cada célula possui centenas de milhares de mitocôndrias (Stevens, Wall & Wells, 2002).

O tamanho relativamente pequeno do mtDNA, quando comparado a outros genomas, facilita seu sequenciamento completo, representando ao mesmo tempo um maior número de caracteres do que o da maioria dos genes únicos utilizados atualmente em estudos filogenéticos. Sequências mitocondriais completas foram utilizadas em alguns trabalhos de filogenia de artrópodes, desde análises intraespecíficas com linhagens de *Drosophila melanogaster* (Ballard, 2000) a estudos mais amplos envolvendo o filo Arthropoda (Cameron *et al.*, 2004).

Entre os genes mitocondriais, o gene *COI* vêm sendo mais utilizado em análises filogenéticas pelo fato do mesmo ser flanqueado por sequências conservadas, o que o torna relativamente fácil de ser isolado e analisado; os iniciadores universais para este gene são bem estabelecidos, permitindo a amplificação do mesmo em quase todos os filos animais (Wells & Stevens 2008); possui um sinal filogenético maior que os demais genes mitocondriais (Sahls & Nyblom 2000) e possui uma maior variação na terceira posição de seus códons, ainda que mudanças nas seqüências de aminoácidos ocorram mais lentamente que nos demais genes do DNAm (Hebert *et al.* 2003b).

Em 2003 Paul Hebert propõe a utilização de um fragmento de gene *COI* na identificação de espécies; surgia o *DNA Barcoding Projects*, que logo passou a se chamar *Consortium for the Barcoding of Life* (CBOL). A premissa do projeto consiste na ideia de que espécies diferentes devem apresentar para esse fragmento uma variação superior a 3%. A partir do CBOL foi criada a plataforma BOLD (*The Barcode of Life Database*), um banco de dados criado com o intuito de aglutinar informações que vão desde as técnicas de coleta adotadas até a avaliação e validação do fragmento de um fragmento como sendo DNA *Barcode*. (Kosmann, 2009)



Figura 9: Representação esquemática do gene *COI*, segundo Hwa Tan *et. al.*(2009).

No Brasil a identificação de organismos mediante a utilização de DNA *Barcode* tem atraído cada vez mais pesquisadores, que unindo esforços conseguiram, com o apoio do CNPq (investiu 5,4 milhões de reais no projeto), tirar do papel a Rede de Pesquisa de Identificação Molecular da Biodiversidade Brasileira (BR-BoL) que possui como meta a catalogação de 120.000 exemplares de 24.000 espécies. A rede é dividida em 10 projetos, sendo que a identificação molecular de biodiversidade de invertebrados terrestres será realizada na Universidade Estadual de Campinas, sob a coordenação da Dra. Ana Maria Lima de Azeredo-Espin.

Além da identificação de espécies de importância forense, as técnicas de biologia molecular tem possibilitado a estruturação de populações de insetos de

importância forense. Vern & Chua (2010) analisando 32 indivíduos de *C. megacephala* em 11 localidades na Malásia conseguiu separar os indivíduos em três grupos mais proximamente relacionados. Azeredo-Espin & Lassinger (2006) utilizando DNA nuclear e mitocondrial procuraram observar a variabilidade genética. Stevens (2003) utilizando sequências da subunidade ribossomal 28 S e de fragmento dos genes *COI* e *II* procura elaborar uma árvore filogenética dos membros da família Calliphoridae e defendendo que a estreita associação de famílias e subfamílias a regiões particulares do globo estejam relacionados com longos períodos de isolamento, geologicamente corresponderia ao Cretáceo Superior, no final da quebra do supercontinente Gondwana.

Tendo em vista a recente introdução do Gênero *Chrysomya* no continente americano e o uso frequente do Dna Barcode nas análises moleculares o presente trabalho se propõe a testar a eficácia desse fragmento de *COI* nas análises de genética de populações de *Chrysomya megacephala* de duas localidades pernambucanas.

### **3. Objetivos**

**3.1** Avaliar a eficácia do fragmento do gene COI (DNA *Barcode*) nos estudos populacionais de *Chrysomya megacephala*.

### **3.2 Específicos**

**1.** Promover o levantamento dos dípteros caliptrados de importância forense nos municípios de Brejo da Madre de Deus e Tamandaré.

**2.** Estabelecer a caracterização molecular (utilizando o gene COI) de espécimes de *C. megacephala* encontrados nas duas localidades pernambucanas.

**3.** Caracterizar a diversidade intrapopulacional e interpopulacional dos espécimes de *C. megacephala* encontrados nas localidades estudadas.

## 4. Material e Métodos

### 4.1 Área de Estudo e Procedimento Experimental

Os espécimes utilizados neste trabalho foram coletados dos municípios pernambucanos de Brejo da Madre de Deus ( $8^{\circ}08'45''\text{S}$ ,  $36^{\circ}22'16''\text{W}$ ) e Tamandaré ( $08^{\circ}45'35''\text{ S}$ ,  $35^{\circ}06'17''\text{W}$ ), localizados, respectivamente, nas mesorregiões do Agreste Pernambucano e da Mata Pernambucana (Figura 9). As coletas foram realizadas durante o ano de 2010, tendo como substrato vísceras de *Sus scrofa domesticus*. A isca foi acondicionada no interior da armadilha do tipo Ferreira (1978) modificada (Figura 10). No intuito de evitar danos à morfologia dos dípteros que poderiam prejudicar uma posterior identificação, foi utilizado acetato de etila (utilizando um chumaço de algodão embebido com a substância), substância com baixa toxicidade para o homem e efetiva contra os insetos pelo tempo necessário até sua morte.



Figura 10: Mesorregiões do Estado de Pernambuco. Vermelho e amarelo representam os locais de coleta, vermelho Brejo da Madre de Deus, amarelo Tamandaré. Disponível em: Governo do Estado de Pernambuco. Acesso: 22/12/2012

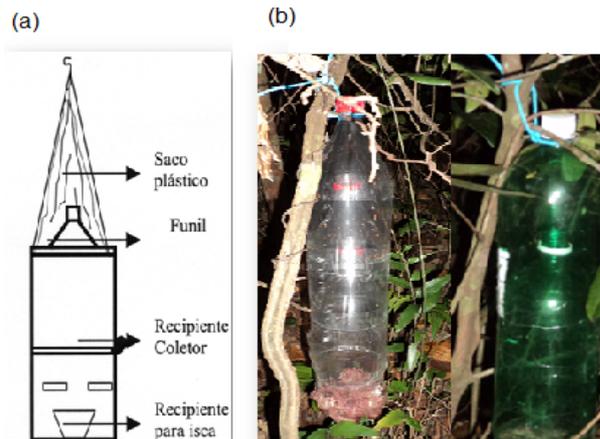


Figura 11: Armadilha utilizada nas coletas. a) Armadilha original proposta por Ferreira (1978). b) Armadilha modificada (não a apresenta o saco plástico e possui mais camadas coletoras). Fonte: Ferreira (1978)

## 4.2 Identificação do Material

Após as coletas, o material foi levado para o Laboratório de Bioinformática e Biologia Evolutiva (LABBE/UFPE), onde os espécimes foram triados em famílias e os califorídeos foram identificados ao nível específico utilizando as chaves taxonômicas propostas por Carvalho & Ribeiro (2000) e Mello (2003). Depois de identificados todos os exemplares foram depositados em microtubos com etanol a 70%. Aos microtubos foram adicionadas etiquetas com a identificação da espécie, o local coletado, a data e o pesquisador que realizou a coleta. Todo material encontra-se preservado em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  no LABBE. Para as análises de genética molecular foram separados 50 exemplares de *C. megacephala* referentes as localidades de Brejo da Madre de Deus (30 espécimes) e Tamandaré (20 espécimes).

## 4.3 Extração de DNA

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

#### **4.4 Amplificação dos fragmentos de *COI***

A região de DNA mitocondrial utilizada foi à porção final da citocromo oxidase subunidade I (*COI*), correspondente à região do DNA *Barcode*. A amplificação dessa região foi realizada a partir de um conjunto de primers universais para *COI* (Nelson *et al.* 2007). Para a amplificação foram utilizados 1,5µL de cada primer (forward e reverse), 7,5µL de água livre de nuclease, 12,5µL de Green Master mix (Promega) e finalmente 2µL de DNA, totalizando 25 µL de solução de PCR. Os ciclos de temperatura de PCR, realizado no termociclador consistiram em um passo de desnaturação inicial de 94°C por dois minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 46°C por 30 segundos, e alongação a 72°C por 2 minutos. O último ciclo foi seguido de uma incubação a 72°C por cinco minutos para completar quaisquer fitas parcialmente sintetizadas. . Uma alíquota (5µL) de cada um dos produtos

amplificados foi separada por eletroforese em gel de agarose. Um Ladder (Promega) de 100 bp de DNA foi utilizado como padrão de peso molecular. As amostras foram purificadas com o kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega), segundo as instruções do fabricante.

#### **4.5 Sequenciamento**

As reações de sequenciamento bidirecional foram realizadas com o kit BigDye Terminator v3.1 Matrix Standard (Applied Biosystems) e o sequenciamento foi executado pelo sequenciador automático ABI 3130 (Applied Biosystems). Cada amostra foi sequenciada por duas vezes e a qualidade das reações foi avaliada com o auxílio do programa Pregap4 (STADEN, 1996) com base nos valores de Phred40 (Ewing et al., 1998). As sequências de consenso foram obtidas utilizando o programa Gap4 (STADEN, 1996) e depositadas no GenBank.

#### **4.6 Análise de Dados**

As sequências de consenso foram submetidas ao BLASTx (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para confirmação do posicionamento taxonômico das mesmas. Depois de comprovado que os fragmentos utilizados correspondiam ao gene em questão, foi realizado um alinhamento de sequências utilizando o algoritmo Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) presente no software MEGA v. 5.0 (TAMURA, 2011). Os índices de divergência genética intra-populacionais e índices de diferenciação genética inter-populacionais foram estimados através do programa DNAsp v. 5.0



## 5. Resultados

A identificação dos exemplares apontou uma elevada representatividade de duas espécies do gênero *Chrysomya*: *C. megacephala* e *C. albiceps*, essas espécies típicas de ambiente urbano, corresponderam a 72,3 % dos espécimes coletados em Brejo da Madre de Deus e 97% no município de Tamandaré (Tabela 1). Isoladamente *C. megacephala* correspondeu a 26,5 % em Brejo da M. de Deus e 83,2% em Tamandaré, a maior representatividade dessa espécie foi o fator preponderante para que ela fosse escolhida para os estudos de biologia molecular. As outras espécies encontradas no municípios de Brejo da Madre de Deus foram: *C. putoria*, *Cochliomyia macellaria* e *Cochliomyia hominivorax*, *Chloroprocta idioidea*, *Phaenicia eximia*, *P. cuprina*. Em Tamandaré as outras espécies encontradas foram: *C. putoria*, *Ch.idioidea*, *Co. macellaria* e *Co. hominivorax*, entretanto apresentavam uma frequência muito baixa, representando apenas 2,9% do total.(figura 11)

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

ESPÉCIES	Brejo da M. de Deus	FA	FR	Tamandaré	FA	FR	Total	FA	FR
<b>C. megacephala</b>	143	0,27	26,5	723	0,832	83,2	866	0,62	61,5
<b>C. albiceps</b>	247	0,46	45,8	120	0,138	13,8	367	0,26	26,1
<b>C. putoria</b>	16	0,03	3,0	3	0,003	0,3	19	0,01	1,3
<b>Ch. Idioidea</b>	3	0,01	0,6	3	0,003	0,3	6	0,00	0,4
<b>Co.macelaria</b>	75	0,14	13,9	12	0,014	1,4	87	0,06	6,2
<b>Co.hominivorax</b>	52	0,10	9,6	8	0,009	0,9	60	0,04	4,3
<b>P. eximia</b>	2	0,00	0,4	0	0,000	0,0	2	0,00	0,1
<b>P. cuprina</b>	1	0,00	0,2	0	0,000	0,0	1	0,00	0,1
<b>Total</b>	539	1	100	869	1	100	1408	1	100,0

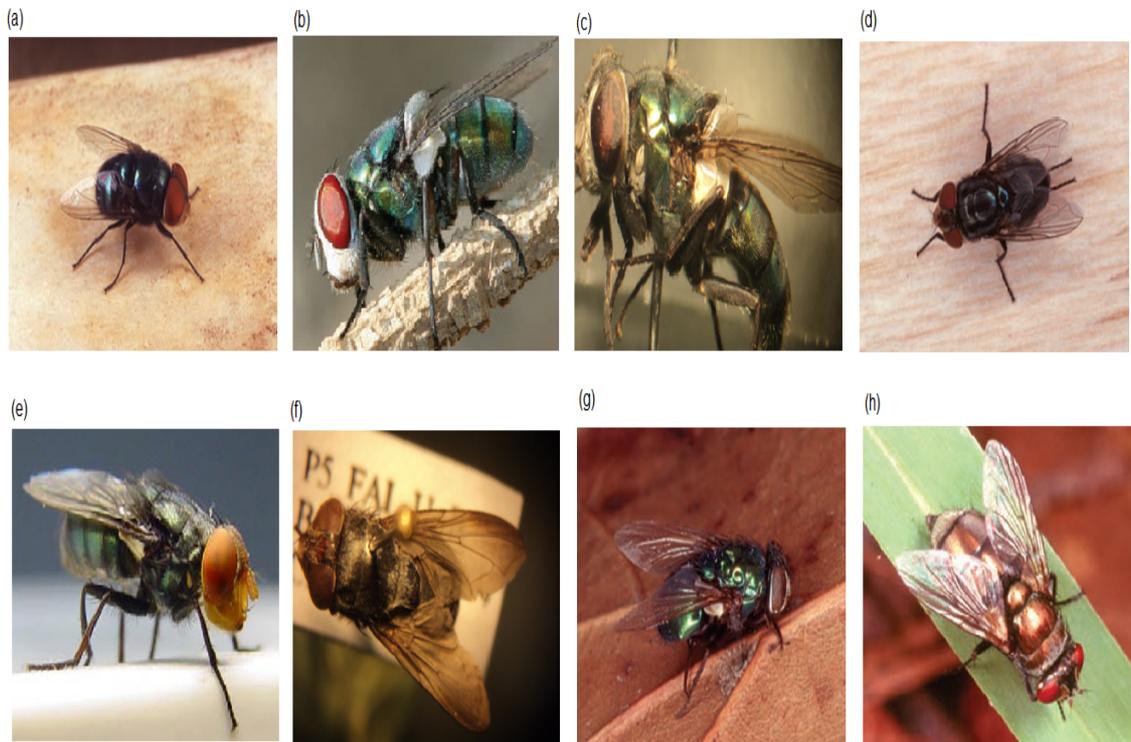


Figura 11: Espécies encontradas nos municípios de Brejo da M. de Deus e Tamandaré. a) *C. megacephala*. b) *C. albiceps*. c) *C. putoria*. d) *Co. macellaria*. e) *Co. hominivorax* f) *Choloprocta ideoidea*. g) *P. eximia* h) *P. cuprina*.

Como resultado obtivemos 50 sequências nucleotídicas de um fragmento do gene da subunidade I da citocromo oxidase (*COI*). As sequências pertencentes a indivíduos de Tamandaré – PE (localizada no litoral pernambucano à aproximadamente 104 km ao sul de Recife) e Brejo da Madre de Deus (cidade do agreste situada à aproximadamente 202 km a oeste de Recife). Os cromatogramas das sequências apresentaram picos bem definidos e valores de confiança (Phred) iguais ou superiores a 30 (Figura 12). O comprimento total do amplificado foi de 587 nucleotídeos. Todas as sequências apresentaram altíssima similaridade com sequências do gene *COI* de *Chrysomya megacephala*

depositadas no Genbank, indicando que os amplificadores pertencem ao gene em questão.

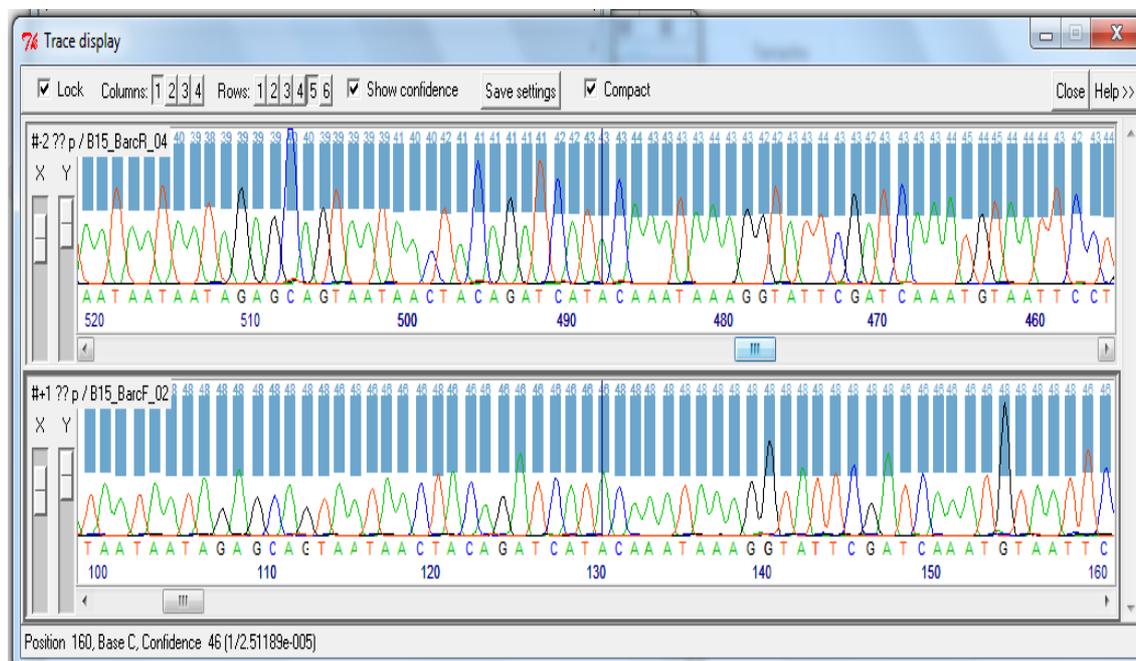


Figura 12: Elaboração da sequência consenso formado pelos primer forward e reverso utilizando o Staden 1.6.

As sequências da população de Tamandaré apresentaram apenas dois sítios polimórficos, nas posições 490 e 566, constituindo assim apenas três haplótipos. Os sítios polimórficos ocorreram apenas em uma sequência cada. Tornando a frequência elevada de apenas um haplótipo e conseqüentemente um valor baixo da diversidade haplotípica: 0,186. Em decorrência do baixo número e sítios polimórficos, a diversidade nucleotídica também apresentou um valor baixo: 0,00032. O número médio de diferenças nucleotídicas foi de apenas 0,19. Os tipos de mutações observadas nesta população foram transições entre pirimidinas nos dois sítios. Porém no sítio 490 o nucleotídeo mais frequente foi a citosina e na posição 566 o nucleotídeo mais comum foi a timina.

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

**Tabela 02: Análise molecular das populações (avaliação dos sítios polimórficos, da diversidade haplotípica, nucleotídica, número médio de diferenças e o tipo de mutação) de Tamandaré e Brejo da Madre de Deus.**

Localidades	Sítios Polimórficos	Diversidade Haplotípica	Diversidade Nucleotídica	Número Médio de Diferenças N.	Tipo de Mutação
<b>Tamandaré</b>	2 (490 e 566)	0,186	0,00032	0,19	Transições Pirimidinas (490 Timina, 566 Citosina)
<b>Brejo da M. de Deus</b>	1 (490)	0,069	0,00012	0,069	Transições Pirimidinas (490 Timina)
<b>Tamandaré + Brejo M.D.</b>	2 (490 e 566)	0,117	0,00020	0,118	Transições Pirimidinas

Quando as duas populações foram unidas e tratadas como únicas obtivemos valores dos índices de polimorfismo genético inferiores aos da população de Tamandaré. A diversidade haplotípica nesta condição foi 0,117, já a diversidade nucleotídica foi 0,00020 e o número médio diferenças nucleotídicas foi 0,118. O índice de fixação de polimorfismo *Fst* que serve para quantificar o nível de diferenciação genética entre duas populações, foi estimado para as populações de Tamandaré e Brejo da Madre de Deus, o valor observado apresentou-se

negativo, porém é válido ressaltar que não existe diferença genética negativa, portanto convencionou-se colocar o limite inferior deste índice como zero. Tal resultado está de acordo com o baixo nível de polimorfismo genético encontrado nas duas populações, o que as torna muito similares.

## 6. Discussão

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

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

Outra característica que favorece a predominância dessas espécies diz respeito à capacidade de predação interespecífica da larva de *C. albiceps* (em terceiro instar). Parte dos recursos alimentares explorados por moscas-varejeiras são de natureza efêmera, tais como substrato em decomposição e fezes, criando

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

A recente introdução dessa espécie no continente americano (Guimarães *et al.*, 1979) pode vir a explicar a baixa variabilidade do gene *COI* encontrada nas populações brasileiras. Não foi encontrada nenhuma barreira física significativa que poderia isolar uma população e promover um processo evolutivo diferenciado, se as populações não estão sobre processo de alopatria elas também não estariam sofrendo um processo de divergência genética nas mesmas regiões geográficas (simpatria).

Ainda que o fragmento de *COI* (DNA *Barcode*) seja utilizado com frequência na identificação de espécies, principalmente depois do surgimento do *Consortium for the Barcoding of Life* (Kosmann, 2009; Stoeckle *et al.* 2005), os resultados encontrados no presente trabalho evidenciaram a ineficácia do marcador em detectar a diferenciação genética intraespecífica de populações introduzidas recentemente, além de procurar esclarecer as possíveis justificativas para o baixo polimorfismo genético entre as populações. Segundo Stoeckle *et al.* (2005), as

limitações inerentes a aplicação de DNA *Barcode* estariam relacionadas a grupos que apresentem uma baixa diversidade gênica em suas sequências (como é o caso de *C. megacephala* de Brejo da Madre de Deus e Tamandaré), resolução de espécies com divergência recente e a detecção de híbridos.

Nelson *et al.* (2012), Bruhn (2011), Hwa Tan (2009) e Harveya *et al.* (2008) avaliaram o grau de divergência genética entre as sequências de *COI* de *C. megacephala* e as de outras espécies. Hwa Tan (2009), ao realizar a comparação intraespecífica para *C. megacephala*, detectou uma variação nucleotídica superior àquela encontrada nas populações de Pernambuco. Enquanto que no trabalho de Hwa Tan (2009) com populações nativas do da Malásia, a divergência encontrada foi de 0,33%, nas populações de Brejo da Madre de Deus e Tamandaré os valores encontrados foram 0,012% e 0,032%, respectivamente. A discrepância entre os valores pode ser explicada pelo fato de que no estudo de Hwa Tan (2009) as sequências utilizadas são provenientes de seis localidades na Malásia. É importante lembrar que *C. megacephala* é originária da Australásia então o estudo supracitado estaria trabalhando com populações nativas dessa espécie, que sendo assim possuíram um tempo maior para a divergência nucleotídica do que as populações brasileiras (introduzidas no país por volta de 1975).

Vern & Chua (2010), trabalhando também com um fragmento de *COI*, detectou 107 sítios informativos de parcimônia ao analisar 32 sequências de *C. megacephala* advindas de diferentes localidades da Malásia. Através desses resultados foi possível elaborar uma árvore de máxima parcimônia, separando as sequências em três grupos distintos. A impossibilidade de se estabelecer análise semelhante para os resultados obtidos nas duas localidades pernambucanas pode decorrer da existência de um efeito fundador nas populações brasileiras que

teria produzido uma quebra acentuada na variabilidade genética dessas quando comparadas a população em relação à população original.

## 7. Conclusões

- O levantamento dos califórídeos de importância forense nas duas localidades apontou uma frequência relativa de mais de 60% de *C. megacephala*, ilustrando o seu potencial de adaptação a ecótopos diferentes.
- Os dados moleculares não permitiram a associação das sequências a um ambiente geográfico específico, fato este que decorreu da incapacidade do marcador em estimar a diferenciação genética de populações que divergiram há pouco tempo.
- A baixa divergência molecular entre as populações provavelmente decorre do fato das espécies terem sido introduzidas recentemente, configurando assim, um efeito do tipo fundador.
- A diferenciação genética entre as populações de *C. megacephala* pode vir a contribuir com o sistema judicial ao oferecer respostas sobre possíveis deslocamentos de cadáver. A inaptidão do gene Citocromo oxidase I em estabelecer a divergência genética entre as populações de Tamandaré e Brejo da Madre de Deus estimula o desenvolvimento de novos trabalhos envolvendo abordagens multigênicas com o intuito de clarificar essa divergência.

## 8. Referências Bibliográficas

- Amendt J, Campobasso C, Gaudry E, Reiter C, LeBlane H and Hall M (2007) Best practice in forensic entomology - standards & guidelines. *Int J L Med* 121: 90–104.
- Arnold N, Peper H, Bandick K, Kreikemeier M, Karow D, Teegen B and Jonat W (2002) Establishing a control population to screen for the occurrence of nineteen unclassified variants in the BRCA1 gene by denaturing high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 782:99-104.
- Azeredo-Espin AML and Lessinger AC (2006) Genetic approaches for studying myiasis-causing flies: molecular markers and mitochondrial genomics *Genetica* 126:111–131
- Azeredo-Espin AML and Pavan C (1983) Karyotypes and possible regions of origin Three Species Of Calliphoridae (Diptera) Recently Introduced in Brazil. *Rev. Brasil. Genet.* VI,4,619-638
- Ballard, JW (2000). Comparative genomics of mitochondrial DNA in members of the *Drosophila melanogaster* subgroup. *J Mol Evol.* Jul;51(1):48-63.
- Benecke M (2001) A brief history of forensic entomology. *Forensic Sci Int* 120: 2–114
- Bergeret, M (1855) Infanticide Momification naturelle du cadavre. *Annales d'Hygiène* 4: 442–452.
- Biavati GM, Santana FHA and Pujol-luz JR (2010). A Checklist of Calliphoridae Blowflies (Insecta, Diptera) Associated with a Pig Carrion in Central Brazil. *J Forensic Sci.* 1:1-4
- Bruh T (2011) Sequence & analysis of the mitochondrial DNA control region of nine Australian species of the genus *Chrysomya* (Diptera Calliphoridae). Thesis Collection – University of Wollongong.
- Byrd JH and Castner JL (2001) Insects of forensic importance, p. 43 - 80. In: Byrd, J.H. & J.L. Castner (eds). *Forensic Entomology: The Utility of Arthropods in Legal Investigations*. Boca Raton. CRC Press LLC. 418p.
- Carvalho CJB and Mello-Patiu CA (2008) Key to the adults of the most common forensic species of Diptera in South America. *Rev Bras Entomol* 52: 390-406.

- Castro CP and Garcia MD (2009) First record of *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) (Diptera, Calliphoridae) from Portugal. *Graellsia* 65(1): 75-77
- D'Almeida JM and Almeida JR (1998) Nichos Tróficos Em Dípteros Caliptrados, No Rio De Janeiro-RJ. *Rev Brasil Biol*, 58(4): 563-570
- D'almeida JM and Mello RP (1995) Eficiência de variadas dietas na criação de *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) e *Chrysomya putoria* (Wiedemann, 1818) (Diptera: Calliphoridae) sob condições de laboratório. *Entomol Vect* 2 (5). p. 95-105.
- Erzinçlioglu YZ (1983) The application of entomology to Forensic Medicine. *Medicine Science & the Law* 23: 228-230.
- Ferreira MJM (1978) Sinantropia de dípteros muscóides de Curitiba, Paraná. I. Calliphoridae. *Rev. Bras. Biol.*, 38: 445-454.
- Frasson LP, Rossi-Jr J, Leite FLG and Krohling W (2006). A história da Entomologia Forense e sua importância na elucidação de questões judiciais. *Natureza on line* 4(2): 77-79  
[http://www.naturezaonline.com.br/natureza/conteudo/pdf/07\\_FrassonLPetal.pdf](http://www.naturezaonline.com.br/natureza/conteudo/pdf/07_FrassonLPetal.pdf) (January 4, 2013)
- Freire O (1914a). Algumas notas para o estudo da fauna cadavérica da Bahia. *GMBahia* 46: 110–125.
- Freire O (1914b). Algumas notas para o estudo da fauna cadavérica da Bahia. *GMBahia* 46: 149–162.
- Freire O (1923). Fauna cadavérica brasileira. *Revista de Medicina* 3-4: 15–40.
- Godoy WAC, Von Zuben CJ, Reis SF, Von Zuben FJ (1997) The spatial dynamics of native and introduced blowflies (Dipt., Calliphoridae). *J Appl Ent* 121:305-309.
- Graphodatsky AS, Trifonov VA and Stanyon R (2011) The genome diversity and karyotype evolution of mammals. *Mol Cytogen* 4:1-16.
- Aguiar-Coelho VM and Milward-Azevedo EMV (1995). Associação entre larvas de *Chrysomya megacephala* (Fabricius), *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) e *Cochliomyia macellaria* (Fabricius) (Calliphoridae, Díptera) sob condições de laboratório. *Vet Bras Zool* 12 (4): 991-1000
- Guimarães JH, Papavero N and Prado AP (1983). As Miíases na Região Neotropical. *Rev. Bras. Zool.* 1(4):239-416.

- Guimarães RR and Guimarães RR (2003) Armadilhas Usadas Para Coleta De Dípteros Muscóides (Insecta: Diptera). Bol SEA 33:281 – 283.
- Guimarães JH, Prado AP and Linhares AX (1978) Three newly introduced blowfly species in Southern Brazil (Diptera: Calliphoridae). Rev Bras Entomol 22: 53-60.
- Guimarães JH, Prado AP and Buralli GM (1979) Dispersal and distribution of three newly introduced species of *Chrysomya* Robineau-Desvoidy in Brazil (Diptera, Calliphoridae). Rev Bras Entomol 23: 245-255.
- Hall RD (2001) Perceptions and status of forensic entomology, p. 1 - 18. In: Byrd, J.H. and J.L. Castner (eds). Forensic Entomology: The Utility of Arthropods in Legal Investigations. Boca Raton. CRC Press LLC.418p
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL and Waard J.R (2003a) Biological identifications through DNA barcodes. Proceedings of the Royal Society of London Proc Biol Sci. 270: 313-321.
- Hwa-Tan S, Aris EM, Surin J, Omar B, Kurahashi H, Mohammed Z (2009) Sequence variation in the Cytochrome oxidase subunit I and II genes of two comonly found blow fly species *Chrysomya megacephala* (fabricius) and *Chrysomya rufifacies* (Macquart) (Diptera: Caliphoridae) in Malasya. Trop Biomed. 26(2): 173-181.
- Iacopini TC (2006). Binomia de Dípteros das Famílias Calliphoridae e Sarcophagidae de Interesse Forense Associado a Carcaças de Suínos no Município de Patrocínio-MG. Universidade do Cerrado-Patrocínio. 59p
- Kosmann C (2009) Código de barras (DNA Barcode) de dípteros de interesse forense. Cecília Kosmann. Dissertação (mestrado)- Universidade Federal do Curitiba,2009
- Marchiori CH, Castro MEV, Paiva TCG, Teixeira FF and Silva CG(2000) Dípteros muscóides de importância médica e veterinária e seus parasitóides em Goiás. Arq Bras Med Vet Zootecnia 52:350–3.
- Mégnin P (1894) La Faune des cadavres. Paris: Encyclopédie Scientifique dès Aide- Memoire.
- Mello R P (2003). Chave para identificação das formas adultas das espécies da família Calliphoridae (Diptera, Brachycera, Cyclorrapha) Encontradas no Brasil. Entomol Vect 10 (2): 255-268.

- Moretti TC and Thyssen PJ (2006). Miíase primária em coelho doméstico causada por *Lucilia eximia* (Diptera: Calliphoridae) no Brasil: relato de caso. Arq Bras Med Vet Zootec 58: 28-30.
- Nelson LA et al. (2012). Beyond barcoding: A mitochondrial genomics approach to molecular phylogenetics and diagnostics of blowflies (Diptera: Calliphoridae). Gene 511 131–142.
- Nuorteva P (1963), Sinanthropy of blowflies (Dipt. Calliphoridae) in Finland. Ann Entomol Fenn 29: 1-49.
- Oliveira JTM et al. (2004) Ocorrência De Miíases Humanas Na Região Da Baixada Fluminense, Estado Do Rio De Janeiro, Brasil Entomol Vect 11 (1): 85-102, 2004
- Oliveira-Costa J (2008) A entomologia forense e suas aplicações, p. 39. In: Oliveira-Costa, J. (ed). Entomologia Forense: Quando os insetos são vestígios. Campinas. Millennium Editora. xix + 420p.
- Pujol-Luz, J R, Arantes L C, Constantino R (2008). Cem anos da Entomologia Forense no Brasil (1908-2008). Rev Bras de Entomol 52:485-492
- Rego JPM and Fraiha H (1982). Miíases Humanas na Amazônia - II: Miíase Anal. Considerações a propósito de um caso. Rev. Fund. SESP. 27 (1):7-11.
- Ribeiro, NMD (2003). Comparação entre a decomposição e a sucessão entomológica em carcaças de suínos expostas em área de cerrado e mata ciliar, no Sudeste Brasileiro. Universidade Estadual de Campinas, São Paulo. Dissertação de Mestrado. 64p.
- Rognes K (2004). Fauna Europaea: Diptera, Calliphoridae. Fauna Europaea version 1.1, <http://www.faunaeur.org> (December 15, 2012)
- Sahls G and Nyblom K (2000) Phylogenetic analysis of the genus *Cheilosia* (Diptera, Syrphidae) using mitochondrial COI sequence data. Mol Phylogenet Evol 15: 235-241.
- Seolin-Dias L, Santarém VA, Almeida MSR, Medina AO, Silva AV(2009). Biodiversidade de moscas Calliphoridae no lixão urbano de presidente prudente, São Paulo, Brasil. Arq Inst Biol 76:659-663,
- Souza AM and Linhares AX (1997) Diptera and Coleoptera of potential forensic importance in southeastern Brazil: relative abundance and seasonality. Med Vet Entomol 11(1). p. 8-12.

- Souza AM (1994) Sucessão entomológica na decomposição de carcaça animal, com ênfase nas famílias Calliphoridae e Sarcophagidae (Diptera) [dissertation]. Campinas (SP): Unicamp,
- Stevens JR (2003) The evolution of myiasis in blowflies (Calliphoridae). *Int J Parasitol* 33:1105–1113.
- Stevens JR, Wall R and Wells JD (2002) Paraphyly in Hawaiian hybrid blowfly populations and the evolutionary history of anthropophilic species. *Insect Mol Biol* 11: 141-148.
- Stoeckle M, Waggoner PE and Ausubel JH (2005) Barcoding Life, Illustrated. Goals, Rationale, Results. ppt v1.3. [http://phe.rockefeller.edu/PDF\\_FILES/BLIllustrated26jan04print%20v1-3.pdf](http://phe.rockefeller.edu/PDF_FILES/BLIllustrated26jan04print%20v1-3.pdf) (January 02, 2013)
- Thompson JD, Higgins DG and Gibson TJ (1994) Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673– 4680
- Thyssen PJ (2000) Decomposição e sucessão entomológica em carcaças de suínos (*Sus scrofa L.*) de tamanhos diferentes: estudos em ambiente de mata natural na região de Campinas –SP. 2000. 85f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas
- Vasconcelos SD, Araujo MSC (2012) . Necrophagous Diptera and Coleoptera in Northeastern Brazil: State of the Art and Challenges for the Forensic Entomologist. *Rev Bras Entomol* 56:7-14
- Vern CY and Chua TH (2010) Genetic Variation In *Chrysomya Megacephala* In Malaysia Using cytochrome Oxidase I Gene (Diptera: Calliphoridae) disponível em: <http://goo.gl/9fQOC> (December 23, 2012).
- Ward RD, Zemlak TS, Innes BH, Last PR, Hebert PD (2005). DNA barcoding Australia's fish species. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 360: 1847-1857.
- Wells JD and Stevens JR (2008). Application of DNA-based methods in forensic entomology. *Annu Rev Entomol* 53: 103-120.
- Zhang DX and Hewitt G (1997) Insect mitochondrial control region: a review of its structure, evolution and usefulness in evolutionary studies. *Biochem Syst Ecol* 25: 99-120.

## 9. Curriculum vitae (Lattes)

Dados pessoais

Nome Tiago Levi Diniz Lima

Filiação José Geraldo de Lima e Maria de Fátima Diniz Lima

Nascimento 21/02/1989 - caruaru/PE - Brasil

Carteira de Identidade 6043138 SDS - PE - 14/03/2008

CPF 072.164.814-29

---

Formação acadêmica/titulação

2012 Mestrado em Ciência Política.

Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil

Título: Primavera Árabe: Um resquício de terceira onda, ou uma incipiente quarta onda democrática?

Orientador: Ricardo Borges Gama Neto

2010 Mestrado em Genética.

Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil

Título: Genética de populações de dípteros caliptrados de interesse forense

Orientador: Dr. Valdir de Queiroz Balbino

Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

2010 Graduação em Ciência Política/ Relações Internacionais.

Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil

2006 - 2009 Graduação em Ciências Biológicas Bacharelado.

Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil

Título: Estrutura genética de populações de *Lutzomyia longipalpis* (DIPTERA: PSYCHODIDAE), vetor da *Leishmania infantum chagasi*

Orientador: Valdir de Queiroz Balbino Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

---

Formação complementar

2011 - 2011 Curso de curta duração em Direito Constitucional.

Instituto Teotônio Vilela, ITV, Brasil

2011 - 2011 Curso de curta duração em Introdução à Teoria Política.

Instituto Teotônio Vilela, ITV, Brasil

2011 - 2011 Extensão universitária em Introdução a democracia em Robert Dahl.

Núcleo de Teoria Democrática- Pós Graduação Ciência Política-UFPE, NTD (PGCP-UFPE), Brasil

2011 - 2011 Curso de curta duração em Gestão em Comércio no Exterior e Logística.

Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil

2011 - 2011 Curso de curta duração em Teoria da Ciência Política.

Instituto Teotônio Vilela, ITV, Brasil

2010 - 2010 Curso de curta duração em Identificação de Insetos Necrófagos(calliphoridae).

Universidade de Brasília, UNB, Brasília, Brasil

2010 - 2010 Curso de curta duração em Gestão Ambiental e Desenvolvimento Sustentável.

Fundação Getúlio Vargas Online, FGV, Brasil

2010 - 2010 Curso de curta duração em Metodologia da Pesquisa.

Fundação Getúlio Vargas Online, FGV, Brasil

2010 - 2010 Curso de curta duração em III Curso Genética e Bio. Mol. de Insetos Vetores.

FIOCRUZ-Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, CPQAM, Brasil

2007 - 2007 Curso de curta duração em Identificação leveduras por sequenciamento de DNA.

Sociedade Brasileira de Micologia, SBM, Brasil

Atuação profissional

1. Núcleo de Estudos de Política Comparada e Relações Internacionais - NEPI

---

Vínculo institucional

2012 - Atual Vínculo: Colaborador , Enquadramento funcional: Mestrado,  
Regime: Parcial

2. Instituto Teotônio Vilela/Pernambuco - ITV/PE

---

Vínculo institucional

2012 - Atual Vínculo: Colaborador , Enquadramento funcional: Relações  
Públicas, Regime: Parcial

3. Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

---

Vínculo institucional

2010 - Atual Vínculo: Colaborador , Enquadramento funcional: Mestrado ,  
Carga horária: 40, Regime: Integral

4. Laboratório de Bioinformática e Biologia Evolutiva - LABBE

---

## Vínculo institucional

2010 - Atual Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Bolsista CNPq,  
Regime: Dedicção exclusiva

---

## Áreas de atuação

1. Mensuração de Democracia
2. Estrutura e Transformação do Estado
3. Atitude e Ideologias Políticas
4. Sistemas Governamentais Comparados
5. Genética Animal
6. Entomologia Forense

---

## Projetos

Projetos de pesquisaProjetos de pesquisa

2012 - Atual Mensurando Regimes Políticos: avaliando as diferentes metodologias. Descrição: Este projeto tem como objetivo analisar as diversas metodologia de mensuração de democracia.

Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (2); Mestrado acadêmico (1);

Integrantes: Tiago Levi Diniz Lima; Ricardo Borges Gama Neto (Responsável); Audálio José Pontes Machado; Taciana Rodrigues Targino Limeira

2010 - Atual Genética e Biologia Molecular de Dípteros Necrófagos

Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa

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

Integrantes: Tiago Levi Diniz Lima FIGUEIREDO-JUNIOR, C. A. S; BALBINO, V. Q (Responsável); Hercília Maria Barbosa dos Santos

Prêmios e títulos

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

Produção bibliográfica

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)

1. SANTOS, H. M. B., LIMA, T. L. D., FIGUEIREDO-JUNIOR, C. A. S, KOSMANN, C., Pujol-Luz, J.R., BALBINO, V. Q

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

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

2. MEDEIROS, S, GOMES, R, BATISTA, M. V. A, CUNHA, W, GOMES, L., LIMA, T. L. D., FERREIRA, T.A.E., BALBINO, V. Q

SANDFLYDATABASE: DEVELOPMENT OF AN INTEGRATED PLATFORM OF BIOLOGICAL AND MOLECULAR DATA OF SANDFLIES (DIPTERA: PSYCHODIDAE) OF MEDICAL AND VETERINARY IMPORTANCE In: IV Workshop de Genética e Biologia Molecular de Insetos Vetores de Doenças Tropicais, 2010, Recife-PE.

Anais do IV Workshop de Genética e Biologia Molecular de Insetos Vetores de Doenças Tropicais Recife, 13 a 17 de setembro 2010. , 2010.

Apresentação de trabalho e palestra

1. LIMA, T. L. D.

Entomologia Forense, 2011. (Conferência ou palestra, Apresentação de Trabalho)

## Produção técnica

### Demais produções técnicas

1. BATISTA, M. V. A, FIGUEIREDO-JUNIOR, C. A. S, LIMA, T. L. D., SANTOS, M.A.O, FÉLIX, P.T., COSTA-JUNIOR, C. R. L, BALBINO, V. Q

Bioinformática Ferramentas e Aplicações, 2011. (Extensão, Curso de curta duração ministrado)

## Eventos

### Participação em eventos

1. ITV Conjuntura- Marco Regulatório da Indústria do Petróleo: Constituição e Federação, 2011. (Encontro)

2. ITV Conjuntura- Terrorismo Internacional, 2011. (Encontro)

3. ITV Conjuntura- Eleições Americanas: Como funciona o sistema, 2011. (Encontro)

4. ITV Conjuntura- Mecanismos Constitucionais de Combate a Corrupção, 2011. (Encontro)

5. ITV Conjuntura- Sistema brasileiro de eleições para Deputados e Vereadores, 2011. (Encontro)

6. IV Workshop de Genética e Biologia Molecular de Insetos Vetores e Doenças Tropicais, 2010. (Congresso)

Organização de evento

1. BATISTA, M. V. A, FIGUEIREDO-JUNIOR, C. A. S, LIMA, T. L. D., SANTOS, M.A.O, COSTA-JUNIOR, C. R. L, FÉLIX, P.T., BALBINO, V. Q  
Bioinformática Ferramentas e Aplicações, 2011. (Outro, Organização de evento)

2. BATISTA, M. V. A, CARDOSO, M. V, COSTA-JUNIOR, C. R. L, FIGUEIREDO-JUNIOR, C. A. S, LIMA, T. L. D., SANTOS, M.A.O, BALBINO, V. Q, BRANDAO, S. II Curso de Bioinformática: Análise de Dados Moleculares, 2011.  
(Outro, Organização de evento)