

Universidade Federal de  
Santa Catarina

Programa de Pós-  
Graduação em  
Biotecnologia e  
Biociências

[http://www.biotecnologia.  
ufsc.br/](http://www.biotecnologia.ufsc.br/)

Campus Universitário  
Reitor João David  
Ferreira Lima

Florianópolis- SC

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-  
graduação em Biotecnologia e Biociências,  
Departamento de Microbiologia, Imunologia e  
Parasitologia, do Centro de Ciências  
Biológicas da Universidade Federal de Santa  
Catarina, como requisito para obtenção do  
Título de Mestre em Biotecnologia e  
Biociências.

Orientador: Carlos José de Carvalho Pinto  
Coorientadora: Luísa Damazio Rona Pitaluga

Florianópolis, 2016

PADRONIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE SARCOPHAGIDAE DE INTERESSE  
FORENSE NA REGIÃO DA GRANDE FLORIANÓPOLIS – SC-BR  
Mayara Thais Fernandes

PADRONIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE  
SARCOPHAGIDAE DE INTERESSE FORENSE NA REGIÃO DA  
GRANDE FLORIANÓPOLIS – SC-BR

Mayara Thais Fernandes

O objetivo desse  
trabalho foi  
padronizar as  
técnicas de  
identificação  
molecular de moscas  
da Família  
Sarcophagidae com o  
intuito de desenvolver  
um método mais  
rápido e confiável de  
identificação dessas  
espécies.

Orientador:

Carlos José de  
Carvalho Pinto

Coorientador:

Luísa Damazio Rona  
Pitaluga



Mayara Thais Fernandes

**PADRONIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE  
SARCOPHAGIDAE DE INTERESSE FORENSE NA REGIÃO DA  
GRANDE FLORIANÓPOLIS – SC - BRASIL**

Dissertação submetida ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Junho de 2016.

Orientador: Prof. Dr. Carlos José de Carvalho Pinto

Co-orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Luísa Damazio Rona Pitaluga

Florianópolis  
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Fernandes, Mayara Thais  
PADRONIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE  
SARCOPHAGIDAE DE INTERESSE FORENSE NA REGIÃO DA GRANDE  
FLORIANÓPOLIS - SC - BRASIL / Mayara Thais Fernandes ;  
orientador, Carlos José de Carvalho Pinto ; coorientadora,  
Luísa Damazio Rona Pitaluga. - Florianópolis, SC, 2016.  
82 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós  
Graduação em Biotecnologia e Biociências.

Inclui referências

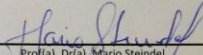
1. Biotecnologia e Biociências. 2. Entomologia Forense.  
3. Sarcophagidae. 4. Biologia Molecular. 5. Insetos. I.  
Carvalho Pinto, Carlos José de. II. Damazio Rona Pitaluga,  
Luísa. III. Universidade Federal de Santa Catarina.  
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências.  
IV. Título.

"Identificação molecular de Sarcophagidae de interesse forense"

Por

Mayara Thais Fernandes

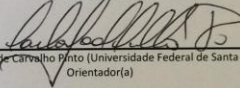
Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (15/PPGBT/2016) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências - UFSC.



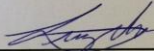
Prof(a), Dr(a), Mario Steindel

Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências

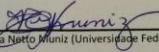
Banca examinadora:



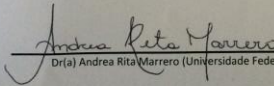
Dr(a) Carlos José de Carvalho Pinto (Universidade Federal de Santa Catarina)  
Orientador(a)



Dr(a) Luiz Carlos de Pinho (Universidade Federal de Santa Catarina)

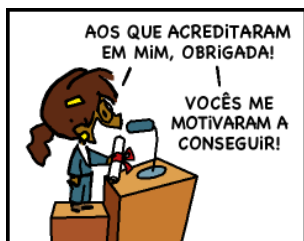


Dr(a) Yara Cozza Netto Muniz (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr(a) Andrea Rita Marrero (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 16 de Junho de 2016.



*Alexandre Beck*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à UFSC onde cursei Ciências Biológicas e agora a pós-graduação em Biotecnologia e Biociências.

Aos órgãos de Fomento Capes e CNPq que financiaram esse estudo.

Aos funcionários do LAMEB, em especial à Camille e a Vanessa, que sempre me ajudaram com tudo que precisei.

Aos professores e alunos do Laboratório de Protozoologia, por terem me permitido utilizar o Lab e me auxiliado em muitos experimentos. Um agradecimento especial à Carime Lessa que muitas vezes parou seus experimentos para me ajudar a solucionar meus problemas. Agradecimento especial também à Dra. Patrícia Stocco e ao Dr. Edmundo Grisard, que me orientaram durante boa parte da minha graduação e me permitiram utilizar os equipamentos e reagentes do Laboratório, muito do que eu aprendi em ciência foi com vocês.

Ao pessoal do LAPOGE onde realizei boa parte dos meus experimentos, alunos e professores, muito obrigada por serem tão prestativos e atenciosos.

Aos meus colegas do LTH pela paciência e compreensão, principalmente nessa reta final.

Ao meu Orientador Dr. Carlos José de Carvalho Pinto, por aceitar me orientar no TCC e agora no Mestrado e por sempre me acalmar, me manter motivada e focada. Você é um exemplo para mim.

A Dra. Luísa Damazio Rona Pitaluga, minha co-orientadora, por toda a ajuda, por todas as conversas e dancinhas. Você também é um exemplo pra mim.

As minhas amigas de graduação, amigas pro resto da vida, Amanda Firmino, Bruna Scheid (Chê), Camille Ribeiro (Mille), Gabriela Karasiak (Gabi), Leili Hausmann e Rafaela Grecco (Rafa), vocês moram no meu coração! Obrigada por tudo!

A minha namorada, Amanda Soares, que me acompanhou de madrugada nos experimentos, que me aturou nos momentos de estresse da elaboração dessa Dissertação, que me acalmou e me levou pra comer gordice e ver filme quanto eu estava arrancando os cabelos. Obrigada por ser essa pessoa maravilhosa, Te amo.

Aos meus familiares por respeitarem meu isolamento durante a escrita, e minha ausência durante os experimentos. Mas especialmente aos meus pais, Vera Lúcia da Silva Fernandes e Jorge José Fernandes, por sempre me apoiarem e sempre acreditarem em mim, muitas vezes muito mais que eu mesma. Amo vocês, vocês são verdadeiros exemplos.



“O insucesso é apenas uma oportunidade  
para recomeçar de novo com mais inteligência.”  
Henry Ford



## RESUMO

A entomologia forense tem se mostrado muito importante no Brasil e no mundo. Cada vez mais academia e institutos de perícia têm visto a importância dessa ciência na resolução de casos judiciais. Em medicina legal, a maior parte dos estudos é focado na família Calliphoridae, no entanto, temos observado que a família Sarcophagidae é tão frequente em cadáveres humanos quanto os califorídeos. Entre os motivos dos sarcófagídeos não estarem entre as espécies mais estudadas, acreditamos que a dificuldade de identificação morfológica seja o principal deles, isso porque as chaves dicotômicas são em sua maioria voltadas apenas aos machos, sendo necessária a exposição do aparelho genital dessas moscas. Dessa forma, esse trabalho teve como objetivo traçar o perfil molecular de machos da família Sarcophagidae, a fim de possibilitar futuras identificações por métodos moleculares das principais espécies de Sarcophagidae encontradas na Grande Florianópolis. Para isso os machos coletados foram identificados pelos métodos taxonômicos convencionais. Posteriormente foi feita a padronização das técnicas de extração de DNA e PCR. O gene utilizado para as análises foi COI, por ser o padrão em estudos de *Barcode*. Por fim, foram estabelecidos os padrões de caracterização molecular das espécies por RFLP-PCR e sequenciamento. Os métodos apresentados se mostraram eficientes para a identificação molecular de 8 das 10 espécies coletadas.

**Palavras-chave:** Sarcophagidae. Entomologia Forense. Identificação Molecular.

## ABSTRACT

Forensic entomology has been very important in Brazil and worldwide. Increasingly universities and crime scene labs have seen the importance of this science in solving court cases. In forensic medicine, most studies are focused on the Calliphoridae family, however, we have observed that the Sarcophagidae family is so often in human bodies as the blowflies. Among the reasons of sarcophagídeos are not among the most studied species, we believe that the morphological identification of difficulty is the main one, because this dichotomous keys are mostly directed only to males, requiring exposure of the genital tract of these flies. Thus, this study aimed to trace the molecular male profile of Sarcophagidae family in order to enable future identification by molecular methods of the main species found Sarcophagidae on great Florianópolis. For this the collected males were identified by conventional taxonomic methods. After, the standardization of DNA extraction and PCR techniques. The gene used for the analyzes was COI, to be the standard in studies with *Barcode*. Finally, patterns of molecular characterization of the species RFLP-PCR and sequencing were established. The methods presented were effective for molecular identification to 8 of the 10 species collected.

**Keywords:** Sarcophagidae. Forensic Entomology. Molecular identification.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Esquema representando genericamente o ciclo de vida de Diptera, sendo que a família Sarcophagidae não possui a fase de ovos por ser vivípara. 34
- Figura 2:** Esquema do processo desenvolvido por Sanger (sequenciamento manual) à esquerda, e sequenciamento automatizado pelo método de Sanger (à direita).....38
- Figura 3:** Representação gráfica da enzima Citocromo C oxidase presente na membrana interna das mitocôndrias. ....39
- Figura 4:** Método de extração da Musculatura Torácica. **A)** Mosca Fixada. **B)** Quantidade média de material obtido. **C)** Visão geral do método. ....45
- Figura 5:** Representantes das 10 espécies identificadas nesse trabalho. **A)** *Microcerella halli*. **B)** *Oxysarcodexia admixta*. **C)** *O. paulistanensis*. **D)** *O. riograndensis*. **E)** *O. thornax*. **F)** *Peckia chrysostoma*. **G)** *Peckia intermutans*. **H)** *Retrocitomyia fluminensis*. **I)** *Sarcodexia lambens*. **J)** *Sarcofahrtiopsis cuneata*. **K)** Detalhe do aparelho genital de *O. paulistanensis*. **L)** Detalhe do aparelho genital de *Peckia chrysostoma*. **M)** Detalhe do aparelho genital de *Peckia intermutans*. ....54
- Figura 6:** Gel de Agarose 1% sob corrente constante de 100mV, corado com GelRed para verificação da eficiência dos 3 pares de iniciadores testados. **1 e 2:** Amostras amplificadas com os iniciadores HCO2198-May e LCO1490-May. **3:** Controle Negativo das reações com os iniciadores das colunas 1 e 2. **4 e 5:** Amostras amplificadas com os iniciadores HCO2198-L e LCO1490-L. **6:** Controle Negativo das reações com os iniciadores das colunas 4 e 5. **7 e 8:** Amostras amplificadas com os iniciadores HC02198 e LCO1490. **9:** Controle Negativo das reações com os iniciadores das colunas 7 e 8. **10:** Marcador de peso molecular 100pb. ....56
- Figura 7:** Gel de Agarose 1% sob corrente constante de 100mV, corado com GelRed mostrando os produtos da PCR dos testes dos métodos de Extração. **A)** Para todos os métodos foram utilizadas 3 pernas de cada animal. **1 e 2:** Tampão SQ; **3 e 4:** Kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen) com maceração; **5 e 6:** extração por Kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen) sem maceração; **7 e 8:** Tampão SQ novo com maceração; **9 e 10:** Tampão SQ novo sem maceração; **11:** Controle Negativo; **12:** Marcador de peso molecular 100pb. **B)** Para todos os métodos foi utilizada a musculatura torácica. **1 a 4:** Método Fenol/Clorofórmio; **5 e 6:** Tampão SQ modificado; **7:** extração por Kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen); **8:** Controle Negativo; **9:** Marcador de peso molecular 100pb. ....57

**Figura 8:** Gel de Agarose 1% sob corrente constante de 100mV, corado com GelRed mostrando a diferença na amplificação de DNA de *S. lambens* extraído de 3 pernas (Colunas **1 a 4**) e Musculatura torácica (**5 a 7**). **8)** Controle positivo (amostra cuja amplificação era certa, DNA extraído das pernas sem maceração utilizando Kit DNeasy Blood and Tissue). **9)** Controle negativo. **10)** Marcador de peso molecular 100pb. ....58

**Figura 9:** Gel de Agarose 1% sob corrente constante de 100mV, corado com GelRed para verificar o efeito da temperatura na produção do fragmento desejado. **1)** 48°C. **2)** 50°C. **3)** 52°C. **4)** 54°C. **5)** 56°C. **6)** 58°C. **7)** Marcador de peso molecular 100pb. ....59

**Figura 10:** Gel em Agarose 1% sob corrente constante de 100mV, corado com GelRed mostrando os produtos da PCR para 8 espécies abordadas nesse estudo. **1 a 4)** *M. halli*. **5 a 8)** *P. chrysostoma*. **9 a 12)** *O. admixta*. **13 a 15 e 17)** *O. paulistanensis*. **18 a 21)** *O. thornax*. **22 a 25)** *S. cuneata*. **26 e 27)** *R. fluminensis*. **28 a 31)** *O. riograndensis*. **16 e 32)** Marcador de peso molecular 100pb. ....61

**Figura 11:** Gel em Agarose 1% sob corrente constante de 100mV, corado com GelRed mostrando os produtos da PCR para 2 espécies abordadas nesse estudo. **1 e 2)** *O. riograndensis*. **3 a 8)** *P. intermutans*. **9)** Controle negativo. **10)** Marcador de peso molecular de 100pb. ....62

**Figura 12:** Gel de Agarose 1% sob corrente constante de 100mV, corado com GelRed para verificar os produtos da PCR em gradiente de temperatura. **1)** 56°C. **2)** 58°C. **3)** 60°C. **4)** 62°C. **5)** 64°C. **6)** Controle Negativo. **7)** Marcador de peso molecular 100pb. ....63

**Figura 13:** Gel de Agarose 1% sob corrente constante de 100mV, corado com brometo de Etídeo. **1 e 2):** Amostras precipitadas com Isopropanol; **3):** Marcador de peso molecular 100pb; **4 e 5):** Amostras purificadas do gel por Kit GFX PCR Dna and Gel Band Purification Illustra (GE). ....64

**Figura 14:** Gel de Poliacrilamida 10% sob corrente constante de 80mV, corado com Brometo. **1)** Marcador de peso molecular 100pb; **2 a 5)** Digestões com BSA, sendo **2)** *R. fluminensis*; **3)** *S. cuneata*; **4)** *P. intermutans* e **5)** Controle Negativo. **6 a 9)** Digestão sem BSA, sendo **6)** *R. fluminensis*; **7)** *S. cuneata*; **8)** *P. intermutans* e **9)** Controle negativo. ....65

**Figura 15:** Resultado das digestões em Géis de Poliacrilamida 10% sob corrente constante de 80mV, corados com brometo. **1 a 3)** *M. halli*. **4)** *O. admixta*. **5 e 6)** *O. thornax*. **7)** Controle negativo. **8)** Marcador de peso molecular 100pb. ....66

**Figura 16:** Resultado das digestões em Géis de Poliacrilamida 10% sob corrente constante de 80mV, corados com brometo. **1)** *O. riograndensis*. **2 e 3)** *P. intermutans*. **4)** *R. fluminensis*. **5 e 6)** *S. cuneata*. **7)** Controle negativo. **8)** Marcador de peso molecular 100pb. ....66

**Figura 17:** Resultado das digestões em Géis de Poliacrilamida 10% sob corrente constante de 80mV, corados com brometo. **1)** *M. halli*. **2)** *O. paulistanensis*. **3)** *P. chrysostoma*. **4 e 5)** *S. lambens*. **6)** Controle negativo. **7)** Marcador de peso molecular 100pb. ....67

**Figura 18:** Resultado das digestões em Gel de Poliacrilamida 10% sob corrente constante de 80mV, corado com brometo. **1 e 2)** *R. fluminensis*. **3 e 4)** *S. cuneata*. **5)** Marcador de peso molecular 100pb. ....68

**Figura 19:** Resultado das digestões das 8 espécies em Gel de Poliacrilamida 10% sob corrente constante de 80mV, corado com brometo. **1)** Produto de PCR não digerido. **2 e 3)** *S. lambens*. **4 e 5)** *S. cuneata*. **6)** *R. fluminensis*. **7 e 8)** *P. intermutans*. **9 e 10)** *O. thornax*. **11)** *O. riograndensis*. **12)** *O. paulistanensis*. **13 e 14)** *M. halli*. **15)** Marcador de peso molecular 100pb. ....68

**Figura 20:** Árvore filogenética das sequencias de Sarcophagidae construída pelo método Neighbor-Joining e distância Jukes-Cantor-p. Os números acima dos ramos são os valores de bootstrap baseados em 1000 replicações. ....71

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Iniciadores utilizados nesse trabalho, sendo LCO1490 e HCO2198 os iniciadores para COI de Metazoários proposto por Folmer (1994); LCO1490-L e HCO2198-L os utilizados para COI de Sarcophagidae nos trabalhos de Nelson (2007) e Meiklejohn (2011). Os iniciadores LCO1490-May e HCO2198-May foram os desenhados para esse estudo. Em destaque os sítios onde foram feitas degenerações. ....44

**Tabela 2:** Composição do Mix de Sequenciamento de acordo com o protocolo estabelecido pelo LaMEB.....50

**Tabela 3:** Quantidade de machos de cada espécie e local de coleta. **Cadáver Humano:** machos que nasceram das larvas colonizando uma carcaça humana na cidade de Florianópolis e coletada pelos peritos do IGP. **PEST:** Coletas feitas com rede *Shannon* no Parque Estadual da Serra do Tabuleiro em 2012 com um porco inteiro como isca. **UFSC:** coletas feitas com armadilha PET no terreno do CCB-UFSC. ....52

**Tabela 4:** Número de cortes e tamanho aproximado dos fragmentos obtidos após digestão dos produtos de PCR pela TaqI.....69

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

IPM – Intervalo Pós Morte

UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina

LAMEB – Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia

LTH – Laboratório de Transmissores de Hematozoários

LAGEV – Laboratório de Genética Evolutiva

LAPOGE – Laboratório de Polimorfismos Genéticos

MIP – Departamento de Microbiologia, Parasitologia e Imunologia

PEST – Parque Estadual da Serra do Tabuleiro

UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro

EF – Entomologia Forense

TA – Temperatura Ambiente

IGP – Instituto Geral de Perícias





# Sumário

<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>27</b>
1.1 ENTOMOLOGIA FORENSE MÉDICO-LEGAL.....	27
1.2 ENTOMOLOGIA FORENSE NO BRASIL.....	29
1.3 PARCERIA ENTRE PERÍCIA E ACADEMIA.....	30
1.4 FAUNA CADAVERÍCA.....	31
1.4.1 <i>Famílias de Interesse Forense</i> .....	31
1.4.2 <i>Família Sarcophagidae</i> .....	33
1.4.3 <i>Sarcophagidae em cadáveres Humanos</i> .....	34
1.5 IDENTIFICAÇÃO DE SARCOPHAGIDAE.....	34
1.6 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR.....	35
1.6.1 <i>RFLP-PCR</i> .....	35
1.6.2 <i>Sequenciamento</i> .....	36
1.6.3 <i>Enzima Citocromo C Oxidase I</i> .....	39
1.7 JUSTIFICATIVA.....	40
1.8 OBJETIVOS.....	40
1.8.1 <i>Objetivo Geral</i> .....	41
1.8.2 <i>Objetivos Específicos</i> .....	41
<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>42</b>
2.1 COLETA DE ADULTOS.....	42
2.2 IDENTIFICAÇÃO DOS MACHOS.....	42
2.3 DESENHO DE INICIADORES.....	43
2.3.1 <i>Busca de sequências no GeneBank e Literatura</i> .....	43
2.3.2 <i>Alinhamento de Sequências e Desenho de Iniciadores</i> .....	44
2.4 EXTRAÇÃO DE DNA.....	45
2.4.1 <i>Tampão SQ</i> .....	46
2.4.2 <i>Tampão SQ modificado</i> .....	46
2.4.3 <i>Fenol/Clorofórmio</i> .....	46
2.4.4 <i>Kit DNeasy Blood &amp; Tissue Kit (Qiagen)</i> .....	47
2.5 PADRONIZAÇÃO DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)....	47
2.6 SEQUENCIAMENTO.....	48
2.6.1 <i>Preparação das Amostras</i> .....	48
2.6.1.1 <i>Precipitação por Isopropanol</i> .....	48
2.6.1.2 <i>Purificação da Banda do Gel</i> .....	48
2.6.2 <i>Dosagem do DNA</i> .....	49
2.6.3 <i>Sequenciamento</i> .....	49

2.7 BUSCA POR SÍTIOS PARA ENZIMAS DE RESTRIÇÃO .....	50
2.9 ANÁLISES FILOGENÉTICAS .....	51
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>52</b>
3.1 IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DE SARCOPHAGIDAE .....	52
3.2 DESENHO DE INICIADORES .....	55
3.3 EXTRAÇÃO DE DNA.....	56
3.4 PADRONIZAÇÃO DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) .....	58
3.5 AMPLIFICAÇÕES DE COI DAS 10 ESPÉCIES ESTUDADAS.....	59
3.6 SEQUENCIAMENTO .....	62
3.7 SÍTIOS DE RESTRIÇÃO .....	64
3.8 FILOGENIA .....	69
<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>72</b>
<b>SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....</b>	<b>72</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>74</b>

## INTRODUÇÃO

### 1.1 ENTOMOLOGIA FORENSE MÉDICO-LEGAL

A Entomologia é a ciência que estuda os insetos, sendo que sua vertente forense utiliza esses conhecimentos na resolução de casos judiciais, sejam estes ligados a infestações em imóveis, em alimentos ou no que compete à medicina legal, como casos de morte, abandono e maus tratos, por exemplo (Oliveira-Costa, 2008).

A primeira vez que foi relatada a utilização de insetos como uma ferramenta para solução de um crime foi feito por na China por Sung Tz'u (1186 - 1249). No livro *A expiação dos males (The washing away of wrongs)* o autor relata que havia ocorrido uma morte por golpes de foice em um campo de arroz e, como não havia testemunhas do ocorrido, o investigador pediu que todos os funcionários mostrassem suas foices. A atração de moscas por uma delas (aparentemente limpa) levou os investigadores ao assassino, que confessou o crime após interrogatório (Tz'u, 1854; Benecke, 2001; Frasson *et al.*, 2006).

Na França ocorreram dois dos eventos mais importantes no estabelecimento dessa modalidade como ciência. Em 1855 Louis Bergeret relatou pela primeira vez a utilização de insetos na estimativa do intervalo pós morte (IPM) (Benecke, 2001). Ele relata que em 1850, como médico no hospital de Arbois, ele recebeu o cadáver de uma menina, recém-nascida, encontrada morta durante a reforma de uma lareira. Ao analisar o corpo mumificado pelas condições do local (seco e sem entrada de ar), diversas perguntas foram levantadas por Bergeret, como há quanto tempo àquela criança estava morta. Registros indicavam que a residência havia sido ocupada por 4 famílias durante os 3 anos que precederam a descoberta. Apesar de mumificada a pele, os órgãos internos da menina haviam sido completamente consumidos por larvas, o que impossibilitava a determinação do IPM por métodos clínicos de medicina-Legal. Porém ele conseguiu identificar larvas de mariposas, bem como moscas adultas mortas dentro de suas pupas presentes no cadáver. Com base no desenvolvimento das 2 espécies encontradas, Bergeret estimou que a criança havia morrido há 2 anos, o que fez com que os atuais moradores fossem inocentados e a culpa recaísse sobre a ocupante da casa em 1848. As conclusões de Bergeret foram fundamentais durante o inquérito policial que conduziu até a mãe da criança, autora do crime, e auxiliou a fomentar a acusação durante o julgamento que culminou com sua condenação (Bergeret, 1855).

Outro grande nome da Entomologia Forense é Jean Pierre Mégnin, veterinário e entomólogo, que publicou diversos trabalhos nas mais variadas áreas de conhecimento, mas foi graças às suas obras analisando a fauna cadavérica que ele ficou conhecido mundialmente. Considerado o pai da Entomologia Forense, seu livro “A fauna dos Cadáveres” (*La faune des cadavres* no título original) publicado em 1884 conta, de forma extremamente rica, o que ocorre com corpos em decomposição, estejam eles enterrados ou não, os estágios pelos quais eles passam e qual a fauna relacionada em cada fase do processo (Benecke, 2001). Mégnin acompanhou a decomposição de vários cadáveres humanos conseguindo estabelecer uma ordem cronológica para os acontecimentos, e verificou a existência de um padrão de sucessão, ou seja, algumas espécies eram atraídas pelos tecidos frescos e em fase inicial de decomposição, enquanto outras chegavam mais tardiamente. Com base nesse padrão, ele garantia ser possível estimar o tempo em que o indivíduo estava disponível para a colonização por insetos necrófagos. Esse livro foi resultado de anos de pesquisa e é considerada a obra de introdução da Entomologia médico-legal como ciência (Benecke, 2001; Gupta & Setia, 2004).

Apesar de existir um certo padrão tanto nas etapas de decomposição do cadáver, como na fauna presente em cada fase, diversos estudos mostram que fatores abióticos, como temperatura e umidade (Souza & Linhares, 1997; Campobasso *et al.*, 2001; Carvalho & Linhares, 2001; Cruz-Vázquez *et al.*, 2004; Gupta & Setia, 2004; Ferraz *et al.*, 2010; Pinheiro *et al.*, 2012; Azevedo & Krüger, 2013 ), alteram diretamente no processo de transformação da carcaça. Esses mesmos fatores também interferem na diversidade de espécies, e estudos populacionais mostram que o nicho ecológico, é responsável pela manutenção, ou não, de adaptações, resultando, por exemplo, em ciclos de vida mais longos em locais com temperaturas mais baixas, ou mais curtos em locais quentes (Chen *et al.*, 1990).

Além disso, países tropicais possuem maior diversidade de espécies, independente do grupo taxonômico (Signor, 1990; Barbieri, 2016), fazendo com que o conhecimento da fauna associada a carcaças seja essencial nos estudos de Entomologia Forense (EF), pois é esperado que a fauna cadavérica se altere em decorrência do local de estudo. Por isso, estudos regionais são importantes no estabelecimento de padrões de colonização e sucessão (Carvalho *et al.*, 2004; Gupta & Setia, 2004; Leccese, 2004; Rosa *et al.*, 2011; Vasconcelos & Araujo, 2012 ).

## 1.2 ENTOMOLOGIA FORENSE NO BRASIL

No Brasil as pesquisas em Entomologia Forense se iniciaram em 1908 com os trabalhos de Oscar Freire na Bahia e Edgard Roquette Pinto no Rio de Janeiro (Pujol-luz *et al.*, 2008) que, inspirados por Ménézin (1894), buscaram adequar os estudos com fauna cadavérica para as condições climáticas brasileiras. Ambos realizaram seus primeiros estudos em cadáveres humanos e, Oscar Freire conclui que, nos trópicos, a sucessão da fauna em cadáveres não ocorre como descrita por Ménézin, pois sofria influência da competição entre as espécies colonizadores sobre cadáver, bem como pelas características do local. (Pessôa, 1940 ; Pujol-luz *et al.*, 2008).

Oscar Freire sempre viu na Ordem Diptera um grande potencial para estudos de estimativa de IPM, principalmente devido ao hábito necrófago das larvas, fazendo fortes críticas aos trabalhos de Herman Lüderwaldt, Samuel Pessôa e Frederico Lane que focaram suas pesquisas nos coleópteros encontrados em carcaças (Pujol-luz *et al.*, 2008).

As críticas de Freire são corroboradas, hoje, por diversos trabalhos que mostram que não se pode comparar estudos realizados em países de clima temperado, com estudos brasileiros. Isso porque nosso país, por ser tropical, possui uma diversidade e abundância de fauna e flora muito superior às dos países de clima frio (Richards & Goff, 1997; Oliveira-Costa & Mello-Patiu, 2004; Fernandes, 2014).

Oscar Freire faleceu em 1923, tendo a compilação de seu trabalho sobre a fauna cadavérica brasileira publicado postumamente e intitulado “Fauna Cadavérica Brasileira” (Pujol-luz *et al.*, 2008).

Após os trabalhos de Oscar Freire houve um lapso nos estudos sobre insetos necrófagos no Brasil com excessão de Pessôa & Lane (1941) sobre os besouros de interesse forense de São Paulo.

Foi apenas com o trabalho de Monteiro-Filho & Penereiro (1987), que as pesquisas em Entomologia Forense voltam a ser publicadas no Brasil. A parti deste trabalho, inúmeros estudos sobre ecologia, biologia e taxonomia foram realizados, de forma que esse conhecimento serviu, e ainda serve, de base para estudos mais aprofundados sobre fauna cadavérica, em especial de Diptera (Pujol-Luz *et al.*, 2008).

A criação e fortalecimento de grupos regionais de entomologia forense são importantes pois, como foi citado anteriormente, as populações respondem de forma diferente às características do meio em que estão inseridas sendo fundamental o desenvolvimento de trabalhos

nas mais variadas condições para que a acurácia dos dados seja cada vez maior.

### 1.3 PARCERIA ENTRE PERÍCIA E ACADEMIA

Muito mais que a relevância acadêmica do conhecimento da fauna cadavérica regional, as pesquisas em EF tem como principal objetivo ser uma ferramenta auxiliar na resolução de crimes (Catts & Goff, 1992; Oliveira-Costa & Mello-Patiu, 2004; Carvalho *et al.*, 2004; Kosmann *et al.*, 2011; Iancu *et al.*, 2015), sendo assim, as parcerias entre os institutos de pesquisa e a perícia são essenciais.

No Brasil, a responsável pelo estabelecimento desse contato foi a Doutora Janyra Oliveira-Costa, que além de ser Professora na Universidade Castelo Branco (UCB/RJ) e Pesquisadora na UFRJ (Universidade Federal do Rio de Janeiro) é Perita do Instituto de Criminalística naquele Estado. Oliveira-Costa se tornou uma referência nacional, não apenas por seu trabalho nas supracitadas instituições, mas também pela produção do livro “Entomologia Forense – Quando os insetos são vestígios” onde tanto a biologia quanto o papel do entomólogo forense na perícia criminal são ricamente abordados.

Em congressos na área muito se comenta da importância dessa parceria e tanto peritos quanto pesquisadores possuem interesse que essa se fortaleça cada vez mais. Se por um lado os trabalhos acadêmicos utilizam modelos animais para representar o que ocorre com cadáveres humanos fornecem dados sobre a fauna de insetos necrófagos em diferentes ambientes e o tempo de desenvolvimento das espécies (Catts & Goff, 1992). A perícia, que tem acesso aos cadáveres humanos, pode, por outro lado, corroborar se as espécies de insetos encontradas em vertebrados humanos ou não são as mesmas, se espécies que os visitam sem deixar imaturos e quais delas conseguem acessar corpos de difícil acesso, por exemplo em porta-malas ou dentro de sacos plásticos.

Dessa forma, a junção dessas informações norteia os estudos realizados, focando nas espécies mais frequentes na região, e em troca, essas pesquisas auxiliam a enriquecer os laudos periciais, acrescentando informações como estimativa do IPM através de dados entomológicos, DNA do agressor em insetos hematófagos, movimentação do cadáver, abandono ou maus tratos, entre outras.

Em 2014 foi firmada uma parceria entre o Instituto Geral de Perícias da Secretaria de Segurança do Estado de Santa Catarina (IGP/SC) e a Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Desde então, recebemos as larvas que colonizam cadáveres em toda grande

Florianópolis, que compreende uma micro-região de mais de 7.000 Km<sup>2</sup> e 22 municípios (GRANFPOLIS, 2016). Isso nos permite conhecer a fauna cadavérica nessas cidades e direcionar nossos estudos nas espécies mais frequentes e, em troca, fornecemos laudos com a estimativa do IPM mínimo.

## 1.4 FAUNA CADAVERICA

Segundo Lee Goff, famoso entomólogo havaiano, todo inseto sobre um cadáver possui interesse forense, mas nem todos são capazes de auxiliar nas investigações, isso porque nem todas as espécies encontradas sobre um corpo estão, de fato, utilizando aquele recurso para seu desenvolvimento. Keh (1985) e Daly e colaboradores (1998) classificaram a entomofauna cadavérica em 4 grupos.

1) Acidentais – que são encontrados ocasionalmente sobre a carcaça, apenas por essa estar em sua área de passagem. Esses insetos não estão interessados no cadáver ou na fauna a ele associada.

2) Parasitas e Predadores – se beneficiam da fauna associada, seja se alimentando ou a parasitando.

3) Onívoros – que se alimentam tanto do cadáver quanto da fauna associada.

4) Necrófagos – são aqueles que efetivamente utilizam a carcaça em algum momento do seu ciclo de vida.

Esse último grupo é o de maior relevância para estudos forenses pois os imaturos necrófagos não se alimentam de tecidos vivos de maneira que o conhecimento do tempo de vida do imaturo nos permite estimar o tempo mínimo em que o cadáver está morto à disposição desses insetos.

Dentre os necrófagos, os de maior relevância pertencem às Ordens Coleoptera e Diptera (Shewell, 1987; Richards & Goff, 1997; Souza & Linhares, 1997; Carvalho *et al.*, 2000; Leccese, 2004; Barbosa *et al.*, 2009; Rosa *et al.*, 2011; Kosmann *et al.*, 2011; Vascolcelos & Araujo, 2012).

### 1.4.1 Famílias de Interesse Forense

Diptera está entre as mais diversas ordens de insetos, essa diversidade não está restrita ao número de espécies (cerca de 150.000), mas também em sua interação com outras espécies (como o Homem) e quanto aos seus hábitos de vida e alimentares. Tal variabilidade foi responsável pela colonização, por parte desses insetos, de todos os



continentes, incluindo a Antártida, considerado um dos ambientes mais inóspitos da Terra (Courtney *et al.*, 2009). Esse grupo compreende os mosquitos (subordem Nematocera) e as moscas (Subordem Brachycera) (Pape *et al.*, 2011) sendo que essas últimas são mais relevantes na Entomologia Forense por possuir diversas espécies necrófagas.

São holometábolos, ou seja, possuem metamorfose completa entre os imaturos e adultos (Courtney *et al.*, 2009). As larvas são desprovidas de pernas, e comumente não competem com os adultos por recursos alimentares, muitas vezes ocupando habitats diferentes. A maior parte do grupo apresenta 4 estágios principais: Ovo (presentes em quase todas as famílias e cuja duração pode variar de algumas horas a semanas), larvas (normalmente 3 instares em Brachycera, mas alguns apresentam mais), Pupa (presente em todos os Diptera) e Adulto (estágio reprodutivo). Os ovos são depositados sobre, ou muito próximos do, habitat das larvas. Ao eclodirem, as larvas se alimentam continuamente, nessa fase há o maior ganho de biomassa dos indivíduos (Courtney *et al.*, 2009), os imaturos alimentam-se continuamente até atingirem tamanho e peso necessários para a pupação ou até que esse se esgote, nesse caso a fase de pupa é precoce, podendo acarretar em moscas menores, inférteis ou mesmo inviabilizar a emergência do adulto (Denlinger & Zdárek, 1994).

Apesar das variações regionais, 5 famílias são presentes em qualquer estudo forense com Diptera pelo mundo, são elas: Calliphoridae, Sarcophagidae, Muscidae, Fanniidae e Phoridae (Marchiori *et al.*, 2000; Oliveira-Costa, Mello-Pattiu e Lopes, 2001; Rosa, 2007; Anjos, 2009; Carvalho & Queiroz, 2010; Fernandes, 2014).

De forma geral, os estudos são realizados com a família Calliphoridae, por diversos fatores que vão desde a clareza na identificação de machos e fêmeas, até a prevalência em cadáveres e facilidade de criação de imaturos em laboratório.

No entanto a dificuldade na identificação e no processo de criação das espécies em condições laboratoriais, não impede a ocorrência desses em carcaças (Wells *et al.*, 2001; Cherix *et al.*, 2012), como foi observado por nossa equipe tanto em trabalhos de levantamento e sucessão (com modelos animais) quanto em cadáveres humanos (através da parceria com o IGP).

Nos casos que recebemos larvas do IGP, percebemos que dentro das 5 principais famílias, àquelas que colonizam carcaças humanas em maior ocorrência são as famílias Calliphoridae e Sarcophagidae.

### 1.4.2 Família Sarcophagidae

Descrita em 1881 por Hagen, possui cerca de 3100 espécies em 400 gêneros (Piwczynski *et al.*, 2014; Vairo, Moura e Mello-Patiu, 2015) e estão divididas em 3 subfamílias: Miltogramminae, Paramacronychiinae e Sarcophaginae (Pape *et al.*, 2012; Piwczynski *et al.*, 2014). No Brasil são 329 espécies, em 41 gêneros (Mello-Patiu, 2015).

Ao contrário do que o nome sugere, nem todos os representantes desse grupo são necrófagos, alguns deles são parasitóides de outros insetos, outros são coprófagos e algumas espécies ainda parasitam ovos de vertebrados (Shewell, 1987; Pape *et al.*, 2012). A subfamília com maior representatividade nos trópicos é a Sarcophaginae, além disso, esse grupo possui a maioria das espécies de interesse forense no Brasil e no mundo (Pape *et al.*, 2012; Piwczynski *et al.*, 2014; Vairo, Moura e Mello-Patiu, 2015), por esse motivo, focaremos os estudos nessa subfamília.

São moscas de tamanhos bem variados (2,5 a 25mm), sendo que a grande maioria tem mais de 5mm de comprimento, apresentam 3 listras pretas no mesonoto, padrão de coloração manchada, listrada ou em xadrez no abdome (Shewell, 1987; Pape & Dahlem, 2010; Vairo, Moura e Mello-Patiu, 2015).

Apesar de apresentar algumas espécies ovovivíparas, a maioria delas é vivípara, ou seja, o embrião se desenvolve ainda no interior da fêmea, que por sua vez deposita diretamente as larvas sobre a carcaça em decomposição (Shewell, 1987; Pape *et al.*, 2012). Os imaturos se alimentam continuamente, passando por 3 instares larvais, até atingirem tamanho e peso suficiente para abandonarem a dieta e se abrigarem para a pupação (Figura 1).

Acredita-se que o surgimento de Sarcophagidae seja mais recente, tendo se diversificado no Cretáceo inferior no final da era Mesozóica (Pape *et al.*, 2012). A filogenia desse grupo ainda não está bem compreendida, de forma que nem a quantidade de gêneros é bem determinada. Isso porque, os gêneros e subgêneros apresentam muitas simplesiomorfias o que os torna grupos parafiléticos, ao invés de táxons monofiléticos, como seria desejado para o estabelecimento de uma árvore filogenética robusta (Pape *et al.*, 2012). Até onde se sabe, não existem registros fósseis dessas moscas (Shewell, 1987; Pape *et al.*, 2012), mas diversos estudos moleculares vêm tentando estabelecer a história evolutiva desse grupo (Zehnerm *et al.*, 2004; Cainé, 2010; Tan *et al.*, 2010; Meiklejohn *et al.*, 2011; Rodrigues, 2011; Jordaens *et al.*,

2013; Meiklejohn *et al.*, 2013a; Meiklejohn *et al.*, 2013b; Amorim *et al.*, 2014; Piwczynski *et al.*, 2014).

**Figura 1:** Esquema representando genericamente o ciclo de vida de Diptera, sendo que a família Sarcophagidae não possui a fase de ovos por ser vivípara.



Fonte: modificado de <http://ciencia.hsw.uol.com.br/mosca4.htm>.

### 1.4.3 Sarcophagidae em cadáveres Humanos

Diversos estudos na região mostram que a família Sarcophagidae é a segunda mais abundante e frequente, tanto em carcaças suínas (Juk, 2013; Fernandes, 2014; Torres, 2016), quanto com iscas de outros vertebrados (Nunes, 2014; Sobrinho, dados não publicados).

### 1.5 IDENTIFICAÇÃO DE SARCOPHAGIDAE

Diferentemente do que ocorre em famílias como Calliphoridae, as espécies de Sarcophagidae, especialmente àquelas da subfamília Sarcophaginae, são extremamente similares quanto ao padrão de coloração e pilosidade do corpo (Shewell, 1987; Pape & Dahlem, 2010; Vairo, Moura e Mello-Patiu, 2015). Dessa forma, apenas algumas

espécies podem ser identificadas exclusivamente por caracteres externos, sendo necessário recorrer à identificação dos genitais masculino e feminino, sendo que o processo de exposição das peças masculinas é muito mais simples, fazendo com que a maioria das chaves dicotômicas seja voltada para os machos (Pape & Dahlem, 2010). Ainda assim, as chaves de identificação de gênero ou espécie são bastante restritas, normalmente não contemplam todas as espécies e apresentam alto grau de dificuldade em decorrência da complexidade das peças a serem observadas, além da constante mudança na nomenclatura e conceitos confusos (Pape & Dahlem, 2010; Barros *et al.*, 2008; Vairo *et al.*, 2011).

Outro fator que dificulta a identificação é a exposição do aparelho genital, uma vez que as peças são extremamente sensíveis e geralmente estão recolhidas na hora da morte desses indivíduos. Sendo assim, é necessário expor com cuidado o aparelho, tarefa que requer prática, cuidado e condições de armazenamento adequadas.

Para facilitar a exposição, esses animais devem ser eutanasiados com éter ou em freezer -20°C. Logo após a morte deve-se expor os genitais com pinças de ponta extremamente finas e auxílio de alfinetes entomológicos. Os indivíduos devem então ser fixados e armazenados em gavetas entomológicas (Pape & Dahlem, 2010).

## 1.6 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

Tendo em vista as dificuldades acima apontadas, e o fato de que o objetivo de visitar a carcaça, para essas espécies, é ofertar aos descendentes um recurso farto para seu desenvolvimento, e que por isso, as fêmeas são as mais comumente encontradas (Vairo, Moura e Mello-Patiu, 2015), surgiu à necessidade de desenvolver métodos alternativos para identificar esses animais. Com o desenvolvimento de novas técnicas confiáveis e a redução do custo das mesmas, a identificação pelo DNA ficou muito mais acessível.

### 1.6.1 RFLP-PCR

De forma simplificada, a técnica denominada “Restriction fragment length polymorphism” que pode ser traduzida como “análise do polimorfismo do tamanho de fragmento de restrição” utiliza enzimas de restrição para gerar fragmentos de DNA, produzindo um padrão que pode ser visualizado em gel de agarose, ou poliacrilamida, podendo ser

utilizado para identificação de espécies (Schroeder *et al.*, 2003; Thyssen *et al.*, 2005; Rasmussen, 2012).

Encontradas em bactérias, as nucleases de restrição têm função de proteção para esses organismos, clivando o DNA viral e impedindo que esse infecte a célula (Alberts *et al.*, 2002). Cada enzima reconhece uma sequência específica de 4 a 8 nucleotídeos e cliva o DNA nesse sítio, formando fragmentos de tamanhos determinados. A descoberta da existência dessas enzimas em 1970 por Werner Arber revolucionou os estudos em Biologia Molecular por ser um método eficaz, reprodutível, rápido e de baixo custo (Thyssen *et al.*, 2005). A importância dessa técnica na engenharia genética rendeu aos pesquisadores Werner Arber, Daniel Nathans e Hamilton Smith o Prêmio Nobel de Medicina ou Fisiologia em 1978 pela descoberta da enzima de restrição e sua aplicação em problemas de genética molecular (*The Nobel Prize in Physiology or Medicine*, 1978).

Além de sua relevância na identificação de espécies, esse método pode ser utilizado para verificar polimorfismos, pois a mudança de 1 nucleotídeo, quando localizado no sítio de restrição, é suficiente para que a enzima não consiga fazer o reconhecimento e corte naquele local, gerando um padrão de fragmentação diferente do esperado (Rasmussen, 2012).

Atualmente existem mais de 100 enzimas de restrição isoladas de diferentes espécies de bactérias (Nicholl, 2008), de forma que foi necessário o desenvolvimento de um sistema de nomenclatura para essas proteínas. De forma geral temos 3 letras seguidas de um número romano referente à identificação da enzima, sendo que a primeira letra faz referência ao gênero e as duas seguintes ao epítipo específico (Nicholl, 2008), ex: TaqI (Primeira enzima de restrição isolada do organismo *Thermus aquaticus*). Alguns casos podem apresentar uma quarta letra, referente à cepa, ex: EcoRI (*Escherichia coli* RY13 I).

Por ser um método barato, simples e reprodutível, a RFLP-PCR é uma ótima ferramenta de identificação molecular de espécies, podendo ser utilizada nas fêmeas e imaturos das amostras que são de difícil identificação morfológica. Esse método pode ser realizado nos Institutos de Perícias agilizando ainda mais a produção de laudos técnicos que envolvem a identificação de insetos necrófagos.

## 1.6.2 Sequenciamento

No final da década de 70, foram desenvolvidos 2 métodos de determinar a sequência de nucleotídeos que compunham um fragmento de DNA, era o início do Sequenciamento, processo que revolucionou a ciência moderna.

Walter Gilbert e Allan Maxam desenvolveram o método químico de degradação das bases, que consistia em utilizar reagentes químicos para degradar bases nitrogenadas específicas (Genome News Network, 2016; Nicholl, 2008). Um método semelhante foi desenvolvido pelo Inglês Frederick Sanger, mas ao invés de degradar a sequência, ele utilizou nucleotídeos marcados (ddNTP - didesoxinucleotídeos) e nucleotídeos não marcados (dNTP - desoxinucleotídeos), de forma que cada vez que a enzima DNA polimerase insere um ddNTP, a transcrição daquele fragmento finaliza, pois a marcação é feita na extremidade 3', de forma que a porção deixa de ficar disponível para ligação com a próxima base nitrogenada (Sanger *et al.*, 1977).

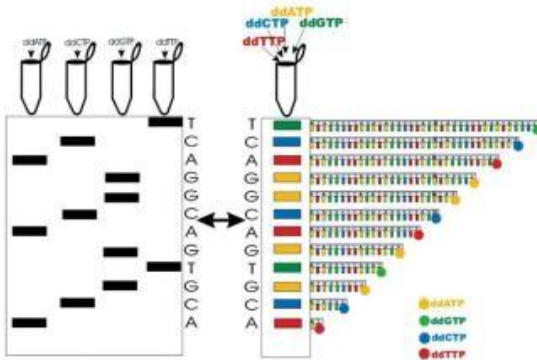
No final dos dois processos, é formada uma biblioteca genômica, ou seja vários fragmentos de diferentes tamanhos. A montagem dessa informação era feita em se aplicando os produtos em gel de Poliacrilamida com concentração de 12% (Sanger *et al.*, 1977). A figura 2 mostra de forma esquemática o método manual de Sanger e como ele é utilizado atualmente de forma automatizada.

Sabendo que a eletroforese em gel tem por finalidade separar fragmentos por tamanho (quanto menor o fragmento mais ele migra) (Nicholl, 2008) e com as informações fornecidas pelos nucleotídeos marcados, era feita uma leitura de baixo para cima e a sequência ia sendo montada, manualmente (Figura 2).

Gilbert e Sanger receberam o prêmio Nobel de química em 1980 pelo desenvolvimento de suas técnicas (The Nobel Prize In Chemistry, 1980), sendo a proposta de Sanger a mais utilizada nos anos que se seguiram.

Contudo, o processo, apesar de efetivo, era extremamente trabalhoso e limitava o tamanho dos fragmentos a serem sequenciados. Mas em poucos anos os avanços tecnológicos permitiram a automatização de praticamente todas as etapas. Muitos dos aparelhos atuais ainda utilizam o método de Sanger, no entanto, desde 2005 os sequenciadores de nova geração entraram no mercado, trazendo um método muito mais eficiente, rápido e barato (Carvalho & Silva, 2010).

**Figura 2:** Esquema do processo desenvolvido por Sanger (sequenciamento manual) à esquerda, e sequenciamento automatizado pelo método de Sanger (à direita).



Fonte: Zimmer *et al.*, 2003.

Com o avanço das tecnologias de sequenciamento, houve também uma enormidade de dados sendo gerados, genomas inteiros foram traçados, de forma que o conhecimento genético e evolutivo deu um salto até então inimaginável.

Apesar do grande foco que se tem, atualmente, nas novas tecnologias de sequenciamento, é importante sempre termos conhecimento da biologia e taxonomia do organismo que trabalhamos, pois as ferramentas moleculares sempre nos trarão respostas, mas cabe a nós, pesquisadores, formularmos as perguntas corretamente, de forma que as respostas se aproximem ao máximo da realidade.

Um bom caminho para atingirmos a parcimônia necessária nesse tipo de trabalho é a junção de várias áreas de conhecimento, como genética, taxonomia, geologia, etc. É também muito importante que os genes escolhidos para contar essa história sejam bons marcadores, ou seja, tenham sua composição geral bem conservada, mas possuam diferenças pontuais entre as espécies (Harvey *et al.*, 2003; Hebert *et al.*, 2003).

Isso levou diversos pesquisadores a buscarem marcadores e em 2003, um projeto ganhou força ao propor uma espécie de código de barras genético (*Barcode of Life*, 2015). Como uma chave dicotômica procura características diferenciais para separar as espécies biológicas, o *Barcode* tem a pretensão de determinar as regiões do genoma que são relevantes na identificação de cada táxon (Hebert *et al.*, 2003).

O gene que codifica para subunidade I da enzima Citocromo C oxidase (COI) é amplamente utilizado para identificar uma grande gama

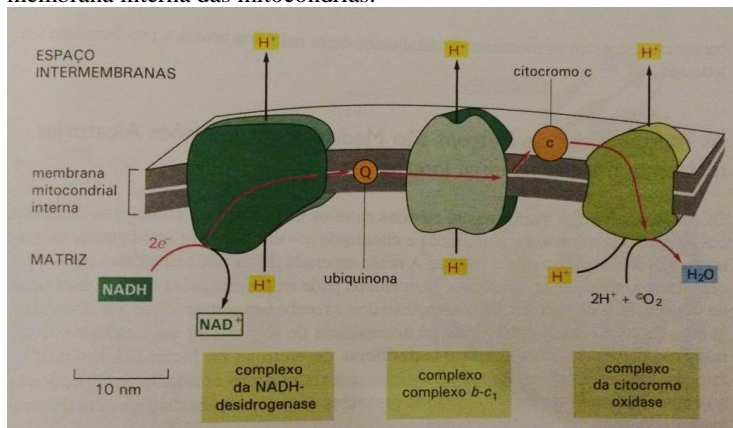
de espécies sendo muito utilizado para identificação molecular de insetos (Hebert *et al.*, 2003), embora outros possam ser utilizados.

### 1.6.3 Enzima Citocromo C Oxidase I

Presente na membrana interna da mitocôndria, é a última enzima da cadeia transportadora de elétrons (Figura 3), sendo responsável pela formação da água através da oxidação de quatro moléculas de Citocromo C e redução de uma molécula de Oxigênio (Marques, 2015), processo fundamental para a sobrevivência da célula e, conseqüentemente, do organismo. Sendo assim, é essencial que ela se mantenha extremamente conservada nos táxons mais abrangentes (Hebert *et al.*, 2003).

Formada por 8 a 13 subunidades, a maioria hidrofóbica, sendo que apenas as subunidades I, II e III são codificadas por DNA mitocondrial (Marques, 2015).

**Figura 3:** Representação gráfica da enzima Citocromo C oxidase presente na membrana interna das mitocôndrias.



Fonte: Alberts *et al.*, 2002.

A mitocôndria é uma organela bem peculiar, pois devido à sua origem endossimbionte ela ainda conserva DNA circular próprio, diferente do encontrado no núcleo da célula, que contém genes para sua maquinaria interna. Sua transferência é, quase exclusivamente, materna, o que permite traçar uma linha de hereditariedade. Essa organela está presente em células eucariontes, normalmente em grande número, pois é responsável pela respiração celular (Alberts *et al.*, 2002).



O código genético é degenerado, o que significa que temos diferentes códons (trincas de bases nitrogenadas) codificando para o mesmo aminoácido. Isso é importante pois a duplicação do material genético é passível de erros. Embora existam muitas formas de reparação, algumas mudanças podem passar despercebidas, permitindo maior variabilidade de sequências entre indivíduos de espécies diferentes, mas tende a se manter mais similar dentro da espécie (Alberts *et al.*, 2002).

Por estarem presentes em grande número nas células, as mitocôndrias tem altas taxas de replicação, o que potencializa a possibilidade de ocorrerem essas diferenças pontuais entre as sequências de um mesmo gene em espécies distintas (Alberts *et al.*, 2002).

O gene da COI em moscas da família Sarcophagidae possui aproximadamente 1500pb (pares de base) (Jordaens *et al.*, 2012), e está localizado na porção pesada (heavy strand) do DNA mitocondrial (Guo *et al.*, 2014), sendo que o *Barcode* padrão é de aproximadamente 650pb (Jordaens *et al.*, 2012), tendo sido escolhido para padronizar o método de identificação molecular nesse trabalho.

## 1.7 JUSTIFICATIVA

A família Sarcophagidae é a segunda mais frequente em cadáveres humanos na Grande Florianópolis. No entanto, seu desenvolvimento é lento, o que causa um atraso significativo na produção de laudos técnicos. Além disso, geralmente só é possível de realizar a identificação de machos dessa família, mas houve casos em que apenas fêmeas emergiram das pupas coletadas nos cadáveres humanos e enviada para a UFSC, o que inviabilizou a identificação específica e conseqüentemente a confecção de um laudo.

Sendo assim, esse trabalho visa desenvolver um método que seja confiável, reprodutivo e economicamente viável para a identificação molecular de indivíduos da família Sarcophagidae, independente de sexo ou fase de vida.

Além disso, esse método visa acelerar o processo de identificação de imaturos, o que culmina na celeridade dos laudos periciais.

## 1.8 OBJETIVOS

### **1.8.1 Objetivo Geral**

Identificar as principais espécies de Sarcophagidae de relevância forense para a região da grande Florianópolis através de métodos moleculares.

### **1.8.2 Objetivos Específicos**

- Identificar morfologicamente os machos de Sarcophagidae encontrados em cadáveres humanos, carcaça de porco e armadilhas de carne em decomposição.
- Padronizar o método de extração de DNA dos machos das espécies contidas no estudo.
- Padronizar a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para amplificação do gene COI de Sarcophagidae.
- Caracterizar por RFLP-PCR os machos da família Sarcophagidae.
- Obter as sequências de COI para as espécies.
- Verificar as relações filogenéticas das espécies de Sarcophagidae.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 COLETA DE ADULTOS

Foram utilizados três métodos de coleta de adultos de Sarcophagidae: rede *Shannon* modificada (Shannon, 1939), armadilha do tipo PET (Barcelos, 2013) e coleta em cadáveres humanos.

A maior parte do material foi coletado durante o desenvolvimento do Trabalho de Conclusão de Curso da autora, em fevereiro de 2013 utilizando-se como isca um porco (*Sus scrofa*) de aproximadamente 10Kg. Na ocasião, o animal foi colocado morto em uma gaiola de metal e sobre essa foi pendurada uma armadilha do tipo *Shannon*, o experimento foi realizado em região de Restinga arbórea na sede do Parque Estadual da Serra do Tabuleiro (Palhoça – SC).

As coletas eram realizadas diariamente, sendo que todos os adultos presos na armadilha eram capturados e eutanasiados com Acetato de Etila. Após a coleta, os insetos foram separados em placas, identificados e estocados em freezer -20°C.

As coletas em carcaças humanas foram feitas pelos peritos do IGP de Florianópolis. Quando encontrados cadáveres humanos colonizados por larvas, essas eram coletadas e encaminhadas ao LTH onde parte do material era fixado em água fervente e armazenado em álcool 70%. O restante do material era mantido em carne bovina em decomposição até a emergência do adulto, que era então eutanasiado, identificado e mantido em freezer -20°C. Com a identificação da espécie, era feita a estimativa do IPM mínimo e um laudo era gerado e encaminhado ao IGP. Através dessa parceria foi possível obter espécimes de Sarcophagidae, que foram utilizados nesse estudo. As amostras foram obtidas durante o ano de 2014.

Por fim, com o intuito de ampliar o número de espécies para esse estudo, foram colocadas armadilhas do tipo PET nas proximidades da UFSC durante os meses de Janeiro a Maio de 2015. As armadilhas utilizaram carne moída bovina em decomposição. Os adultos foram separados, identificados e mantidos em freezer -20°C.

### 2.2 IDENTIFICAÇÃO DOS MACHOS

Para identificação dos machos foi preciso expor o aparelho genital de cada indivíduo, esse processo foi realizado com a ajuda de um alfinete entomológico (Pape & Dahlem, 2010). Após a exposição, os machos foram identificados e voltaram para o freezer (-20°C). Parte do

material foi devidamente montado e catalogado na coleção entomológica do Laboratório de Transmissores de Hematozoários do MIP/CCB/UFSC.

A identificação foi realizada com a chave dicotômica publicada por Vairo e colaboradores (2011) e duas espécies, que não puderam ser identificadas com a chave, foram levadas para o Museu Nacional do Rio de Janeiro para identificação pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cátia Antunes de Mello-Patiu.

## 2.3 DESENHO DE INICIADORES

### 2.3.1 Busca de sequências no GeneBank e Literatura

Foi feita uma busca no GeneBank para sequências COI das espécies identificadas nesse estudo. No entanto, a maioria dos estudos moleculares com Sarcophagidae é realizada fora do Brasil, e dessa forma, visam a fauna característica dos países onde os trabalhos são realizados e que são, em sua maioria, diferentes das encontradas aqui.

Sendo assim, foi feita uma busca na literatura por iniciadores já utilizados para amplificação de COI de Sarcophagidae.

Verificamos que os iniciadores mais utilizados em estudos desse tipo, haviam sido propostos por Folmer e colaboradores (1994), Nelson *et. al.* (2007) e Meiklejohn *et. al.*, (2011), sendo o primeiro um par de iniciadores para COI de Metazoários e os outros dois específicos para a família Sarcophagidae (Tabela 1).

**Tabela 1:** Iniciadores utilizados nesse trabalho, sendo LCO1490 e HCO2198 os iniciadores para COI de Metazoários proposto por Folmer (1994); LCO1490-L e HCO2198-L os utilizados para COI de Sarcophagidae nos trabalhos de Nelson (2007) e Meiklejohn (2011). Os iniciadores LCO1490-May e HCO2198-May foram os desenhados para esse estudo. Em destaque os sítios onde foram feitas degenerações.

Nome	Sequência	Fonte
<b>LCO1490</b>	5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3'	Folmer, 1994
<b>HCO2198</b>	5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'	Folmer, 1994
<b>LCO1490-L</b>	5'-GGTC <b>WACW</b> AATCATAAAGATATTGG-3'	Meiklejohn, 2011 e Nelson, 2007
<b>HCO2198-L</b>	5'-TAAACTTC <b>WGGR</b> TG <b>W</b> CCAA <b>R</b> AATCA-3'	Meiklejohn, 2011 e Nelson, 2007
<b>LCO1490-May</b>	5'-TCTC <b>WACW</b> AATCATAAAGATATTGG-3'	Este estudo
<b>HCO2198-May</b>	5'-TAAACTTC <b>WGGR</b> TG <b>WCCR</b> A <b>R</b> AATCA-3'	Este estudo

*Fonte: Arquivo Pessoal*

### 2.3.2 Alinhamento de Sequências e Desenho de Iniciadores

As sequências obtidas através da busca nos bancos de dados do NCBI foram alinhadas com o programa CLUSTALW2 a fim de encontrar as regiões de maior similaridade que serviram de base para o desenho dos iniciadores, de forma que esses fossem capazes de amplificar a região do COI de todas as espécies desse estudo.

O programa CLUSTALW2 também foi utilizado para testar a ligação dos pares de iniciadores nas sequências obtidas do banco de dados.

Os novos iniciadores foram desenhados com base naqueles utilizados em estudos anteriores, para isso foram feitas degenerações pontuais a fim de potencializar a eficiência e especificidade da PCR. O desenho dos iniciadores foi feito de forma manual, e a degeneração seguiu os padrões estabelecidos pela IUPAC (Bioinformatics, 2016).

Para a escolha dos iniciadores utilizados no trabalho, foi feita uma PCR com DNA extraído por Kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen), as mesmas amostras foram submetidas, separadamente, aos 3 pares de iniciadores. O produto foi verificado em gel de Agarose 1%, corado com GelRed aplicado diretamente às amostras e visualizado com luz UV no aparelho ChemiDocMP da Bio-Rad disponível no LaMEB (Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia – CCB/UFSC).

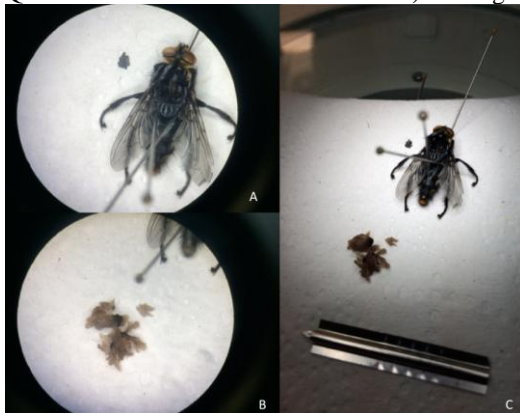
## 2.4 EXTRAÇÃO DE DNA

Para a extração do DNA foram testados quatro métodos, cada um utilizando duas partes do corpo: musculatura torácica e 3 pernas de um dos lados do animal.

Para a padronização dos métodos foram utilizadas as espécies *R. fluminensis* e *S. cuneata* pois havia mais indivíduos. Após a padronização, foi utilizado até 4 indivíduos de cada espécie para as análises. Os espécimes utilizados nesse estudo estão armazenados em freezer -20°C para contraprova.

As pernas foram retiradas com pinça entomológica de ponta fina. Para a extração da musculatura torácica os machos foram fixados em isopor coberto com papel toalha; com uma lanceta descartável o tórax era aberto, deixando expostos os músculos que eram retirados da cavidade com auxílio de pinças entomológicas de ponta extra-fina (figura 4). Tanto o papel de revestimento do isopor quanto as lancetas eram descartadas após a extração do tecido (músculo ou pernas) de cada indivíduo e as pinças eram lavadas após cada extração com Hipoclorito de Sódio, seguido de detergente e água corrente abundante para evitar contaminação.

**Figura 4:** Método de extração da Musculatura Torácica. **A)** Mosca Fixada. **B)** Quantidade média de material obtido. **C)** Visão geral do método.



Fonte: Arquivo pessoal.

### 2.4.1 Tampão SQ

O método de extração com tampão SQ consiste em uma reação salina de lise celular acoplado à ação da Proteinase K. O tampão é composto por 250µl de Tris-HCl pH 8,2 10mM, 100µl de EDTA 2mM, 50µl de Triton Absoluto X-100 em uma concentração final de 0,2% e 24,6 ml de Água Destilada.

Em microtubos de centrifugação de 1,5ml foi colocado o tecido (3 pernas ou musculatura torácica) e acrescentado 20µl do tampão SQ. Procedeu-se a maceração do material até que esse estivesse praticamente todo desfeito. Posteriormente, acrescentou-se 180µl do tampão SQ e 2µl de Proteinase K (20mg/ml) e os tubos foram deixados overnight à 37°C em banho-maria. No dia seguinte, os tubos foram deixados à 100°C por 10 min a fim de desnaturar a proteinase K. Após esse período, os tubos foram centrifugados por 30s para sedimentação do material a 13400rpm e as amostras foram mantidas em freezer -20°C.

### 2.4.2 Tampão SQ modificado

Como o método SQ não funcionou adequadamente, foram feitas algumas modificações. O protocolo inicial foi proposto para extração de DNA de mosquitos, e como a massa das amostras das moscas era muito maior que aquela proposta originalmente, o volume do tampão foi aumentado para manter a proporção.

Sendo assim, no protocolo aqui sugerido foi utilizado 50µl de tampão SQ para maceração das amostras. Após maceração, foi acrescentado 450µl de tampão SQ, 5µl de Proteinase K (20mg/ml) e 10µl de NaCl a 0,9%. Posteriormente o material foi incubadas à 60°C, e os tubos foram mantidos sob agitação constante (800rpm) em Thermomixer compact (Eppendorf). Após a incubação, os tubos foram mantidos à 100°C por 20 min para desnaturar a Proteinase K.

### 2.4.3 Fenol/Clorofórmio

Paralelamente a sugestão de uma modificação no protocolo de extração de DNA com tampão SQ, foram feitas extrações pelo método Fenol/Clorofórmio.

Para lise da Amostra o material foi macerado com 20µl de tampão de Lise (500µl de Tris HCl pH7,4, 10mM, 2,5 ml de EDTA 25mM pH8, 500µl NaCl 10mM, 5ml de SDS (10%) para uma concentração final de 1% e 41,5ml de Água Destilada) até que o tecido

estivesse desfeito. Posteriormente foi adicionado mais 480µl de tampão de Lise e 20µl Proteinase K (20mg/ml), mantendo as amostras à 37°C em banho-maria overnight.

Para a extração do DNA foi acrescentado 500µl de fenol equilibrado, misturou-se por inversão durante 10 min seguido de centrifugação por 10 min à 14000x g em temperatura ambiente. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e adicionou-se 500µl de fenol/clorofórmio (1:1). Os tubos foram misturados por inversão por 10 min e depois foram centrifugados à 14000x g por 10 min em temperatura ambiente. A fase aquosa foi novamente transferida para um novo tubo, foi acrescentado 500µl de Clorofórmio e misturado por inversão durante 10 min, seguido de centrifugação como nos passos anteriores. Após a centrifugação, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo onde foi adicionado 500µl de Isopropanol (100%) gelado e as amostras foram mantidas à -20°C por 1 hora. Após esse tempo, os tubos foram centrifugados por 30 min à 14000x g em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado, o Pellet foi lavado 2 vezes com 500µl de Etanol (70%) gelado e centrifugado por 10 min em temperatura ambiente. Os tubos foram deixados à 37°C até ficarem completamente secos e o pellet foi suspenso em 50µl de Água DEPC. As amostras foram tratadas com 1µl de RNase (20mg/ml) por 1h a 37°C. Por fim, foi feita a quantificação de DNA no picodrop (Eppendorf) e as amostras foram estocadas à -20°C.

#### **2.4.4 Kit DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen)**

Por fim, foi testado o Kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen) seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante, sendo que a incubação inicial com tampão ATL (fornecido pelo Kit) foi feita overnight sob agitação constante de 600rpm no Thermomixer compact (Eppendorf) à 56°C.

### **2.5 PADRONIZAÇÃO DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)**

Foi utilizada a enzima *Taq* DNA Polimerase recombinante (Invitrogen) e as concentrações indicadas na bula do fabricante. Basicamente foi utilizado 2,5µl de Tampão de Reação sem MgCl<sub>2</sub> (10x) (Invitrogen), 1µl de MgCl<sub>2</sub> (50mM) (Invitrogen), 0,5µl dNTPs (10mM), 2µl de cada um dos iniciadores (10µM cada), 0,5µl de *Taq* (2,5 unidades) e 15,5µl de Água milli-Q.



Para a reação de PCR foi utilizada 5 min à 94°C para a desnaturação inicial, 35 ciclos de 45s à 94°C, 1 min à 58°C, 90s à 72°C e 7 min a 72°C para a extensão final.

A melhor temperatura de ligação foi obtida após PCR com gradiente de temperatura (48, 50, 52, 54, 56 e 58°C).

Os produtos da reação foram verificados em gel de Agarose diluído à 1% em tampão TAE (40mM Tris, 20mM Ácido Acético e 1mM EDTA) e o marcador de peso molecular utilizado foi o de 100pb. Foi utilizado GelRed para a visualização e fotodocumentação no aparelho ChemiDocMP (Bio-rad).

## 2.6 SEQUENCIAMENTO

### 2.6.1 Preparação das Amostras

Antes de realizar o sequenciamento propriamente dito, foi necessário preparar as amostras, afim de reduzir/eliminar produtos inespecíficos que pudessem interferir na qualidade das sequências. Para isso, dois métodos foram testados, i) Precipitação por Isopropanol e ii) Purificação da banda do gel por Kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification (Illustra-GE).

#### 2.6.1.1 Precipitação por Isopropanol

Em 25µl do produto da PCR, adicionou-se 60µl de Isopropanol 100% e as amostras foram centrifugadas a 13400 rpm por 30 min em centrífuga minispin (Eppendorf). O sobrenadante foi descartado e o tubo foi invertido em papel absorvente até secar completamente. Foi então adicionado 160µl de Etanol 70% gelado e os tubos centrifugados novamente a 13400rpm por 5 min. Repetiu-se o processo de descarte do sobrenadante e secagem da amostra e as amostras foram mantidas em estufa à 37°C por aproximadamente 20 min, ou até que o tubo estivesse completamente seco. Posteriormente foi adicionado 17µl de água DEPC e incubado por 1h à temperatura ambiente, agitando levemente os tubos ocasionalmente. Por fim, o material foi estocado à -20°C.

#### 2.6.1.2 Purificação da Banda do Gel

Foi utilizado o Kit de extração de banda do Gel da Illustra GE (Kit GFX PCR DNA and gel band purification), o protocolo sugerido pelo fabricante com algumas modificações. Utilizando uma régua e um transiluminador, as bandas de interesse foram cortadas do gel e inseridas

em microtubos de 1,5ml que foram pesados separadamente. Para cada 10mg de material, foram adicionados 10 $\mu$ l de Capture Buffer 3 e os tubos foram invertidos algumas vezes e incubados à 60°C por aproximadamente 20 min, ou até que a agarose estivesse completamente dissolvida.

Durante esse período, foram separadas tantas colunas de purificação quanto o número de amostras. Essas colunas foram depositadas sobre microtubos próprios (ambos disponíveis no Kit) e identificados adequadamente.

Após a completa dissolução da agarose, o líquido foi transferido para a coluna de purificação com auxílio de micropipetadores e mantido 5 min à temperatura ambiente. Os tubos foram então centrifugados por um minuto a 13400rpm, o líquido foi descartado e foi adicionado 500 $\mu$ l de Wash Buffer e centrifugado por 1 min a 13400rpm. Novamente o líquido foi descartado e foi realizada uma centrifugação extra (1 min a 13400 rpm) com a tampa aberta, sem nenhum líquido sobre a coluna de purificação, a fim de retirar o restante do álcool contido na mesma. Por fim, a coluna foi colocada sobre um novo tubo devidamente identificado e adicionou-se 17 $\mu$ l de água DEPC, deixando 5 min à temperatura ambiente e centrifugando após esse período (1 min a 13400rpm). Os tubos foram estocados à -20°C até o uso.

### **2.6.2 Dosagem do DNA**

A quantidade de DNA presente nos tubos foi dosada no equipamento Picodrop (Eppendorf) e sua concentração bem como as relações A260/280 e A260/230 foram anotadas para verificar a qualidade das amostras. Aquelas que apresentavam mais de 5 ng/ $\mu$ l foram selecionadas para sequenciamento.

### **2.6.3 Sequenciamento**

O sequenciamento foi realizado com o protocolo padrão do Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LaMEB), descrito a seguir.

O DNA de cada amostra foi pipetado na placa de PCR devidamente identificada. O mix foi preparado de acordo com o número e o volume das amostras (tabela 2) e foi adicionado o BigDYE 3.1, sempre cuidando para deixar a placa envolta em papel alumínio durante o transporte para evitar a perda da fluorescência. O mix foi adicionado na placa e centrifugou-se por 30s para sedimentação das amostras. O

sequenciamento foi realizado em um equipamento modelo ABI3500 (Applied Biosystems) que utiliza o método de Sanger.

A ciclagem utilizada foi de 96°C por 1min, 35 ciclos de 96°C por 15s, 50°C por 15s e 60°C por 4min. No final da amplificação novamente centrifugamos as placas por 30s. A placa foi então coberta em papel alumínio e levada ao freezer -20°C.

Após a PCR foi feita uma nova precipitação adicionando-se 2,5 µl de EDTA (125mM) e 25 µl de etanol 100%, a placa foi homogeneizada por inversão 4 vezes e foi centrifugada por 45 min a 4000rpm a 20°C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o excesso foi absorvido com papel apropriado, foi adicionado 150 µl de etanol 70% em temperatura ambiente, a placa foi então centrifugada à 4000rpm por 15 min, novamente o sobrenadante foi descartado e o excesso recolhido com papel absorvente. A placa foi centrifugada invertida por 30s a 300rpm e deixada para secar completamente por 15 min à 37°C. Por fim, a placa foi selada, envolta em papel alumínio e mantida à 4°C até o momento da aplicação.

**Tabela 2:** Composição do Mix de Sequenciamento de acordo com o protocolo estabelecido pelo LaMEB.

Mix	Quantidade para 1 amostra
<b>Primer</b>	0,5µl (10pmol/µl)
<b>Tampão 5x Sequencing</b>	1,5µl
<b>BigDYE 3.1</b>	1,0µl
<b>DNA (50ng/ µl)</b>	1 a 7 µl
<b>Água milliQ DEPC</b>	q.s.p. 10µl

Fonte : *Protocolo LaMEB.*

## 2.7 BUSCA POR SÍTIOS PARA ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

Como todas as espécies de interesse possuem mesmo tamanho do amplicon, as amostras tiveram suas sequências analisadas e submetidas à ferramenta NEBcutters do site BioLabs (NEB, 2016) em busca de sítios para enzimas de restrição.

Foram analisados todos os resultados a fim de encontrar o mínimo de enzimas que permitissem identificar as espécies através da digestão do produto da PCR. Os parâmetros analisados para a escolha das enzimas foram: número de cortes no amplicon e tamanho dos fragmentos após a digestão.

## 2.8 RFLP

Essa técnica é dividida em 3 etapas. Inicialmente é feita uma PCR para amplificar o fragmento de DNA de interesse, no caso o barcoding de COI. Após verificação da amplificação em gel de agarose (1%), procede-se a purificação por Isopropanol das amostras amplificadas. Por fim, é feita a digestão dessas amostras com enzimas de restrição.

A reação de digestão da enzima de restrição foi realizada na presença de BSA (12,3 µl de Água Milli-Q, 2 µl de Tampão 10x, 0,2 µl de BSA, 0,5 µl de TaqI e 5,0 µl de produto de PCR purificado) e ausência de BSA (12,5 µl de Água Milli-Q, 2µl de Tampão 10x, 0,5µl de TaqI e 5,0 µl de produto de PCR purificado).

O resultado da digestão foi verificado em gel de poli(acrilamida) 10% (11ml de sopa primitiva, 125µl de APS e 12,5µl de TEMED) e visualizado em fotoiluminador.

## 2.9 ANÁLISES FILOGENÉTICAS

As Sequências obtidas foram verificadas no programa Codon Code Aligner v.6.0.2 onde foram concatenadas e editadas quando necessário. Foi utilizada a ferramenta BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool de nucleotídeos) para comparar as sequências obtidas com aquelas depositadas no GeneBank a fim de verificar a identidade das mesmas.

Posteriormente as sequências foram alinhadas no ClustalW2 e editadas no programa BioEdit v.7.2.5 Após edição, o alinhamento foi analisado no programa MEGA 5, que gerou a árvore filogenética.

Foi utilizado o método Neighbor-Joining e distância Jukes-Cantor com teste de Bootstrap com 1000. Foram utilizadas as seguintes sequências de COI disponíveis no GeneBank: GQ409358.1 (*Sarcophartiopsis cuneata*), GQ223335.1 e GQ409345.1 (*Peckia intermutans*), AF259515.1 e GQ223333.1 (*Peckia chrysostoma*), GQ409357.1 (*Sarcodexia lambens*), JQ246695.1 e JQ246695.1 (*Oxysarcodexia thornax*), HM102299.1 (*Drosophila melanogaster*) sendo esse último utilizado como grupo externo.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DE SARCOPHAGIDAE

Ao todo foram identificados 220 indivíduos pertencentes a 10 espécies da família Sarcophagidae (Tabela 3).

**Tabela 3:** Quantidade de machos de cada espécie e local de coleta. **Cadáver Humano:** machos que nasceram das larvas colonizando uma carcaça humana na cidade de Florianópolis e coletada pelos peritos do IGP. **PEST:** Coletas feitas com rede *Shannon* no Parque Estadual da Serra do Tabuleiro em 2012 com um porco inteiro como isca. **UFSC:** coletas feitas com armadilha PET no terreno do CCB-UFSC.

Espécie	Nº de Machos	Local de coleta
<i>Microcerella halli</i>	3	Cadáver Humano
<i>Oxysarcodexia admixta</i>	8	PEST
<i>O. paulistanensis</i>	6	PEST
<i>O. riograndensis</i>	3	PEST
<i>O. thornax</i>	15	PEST
<i>Peckia chrysostoma</i>	25	PEST
<i>P. intermutans</i>	3	UFSC
<i>Sarcodexia lambens</i>	60	PEST
<i>Sarcofahrtiopsis cuneata</i>	2	PEST
<i>Retrocitomyia fluminensis</i>	95	PEST
<b>Total</b>	220	

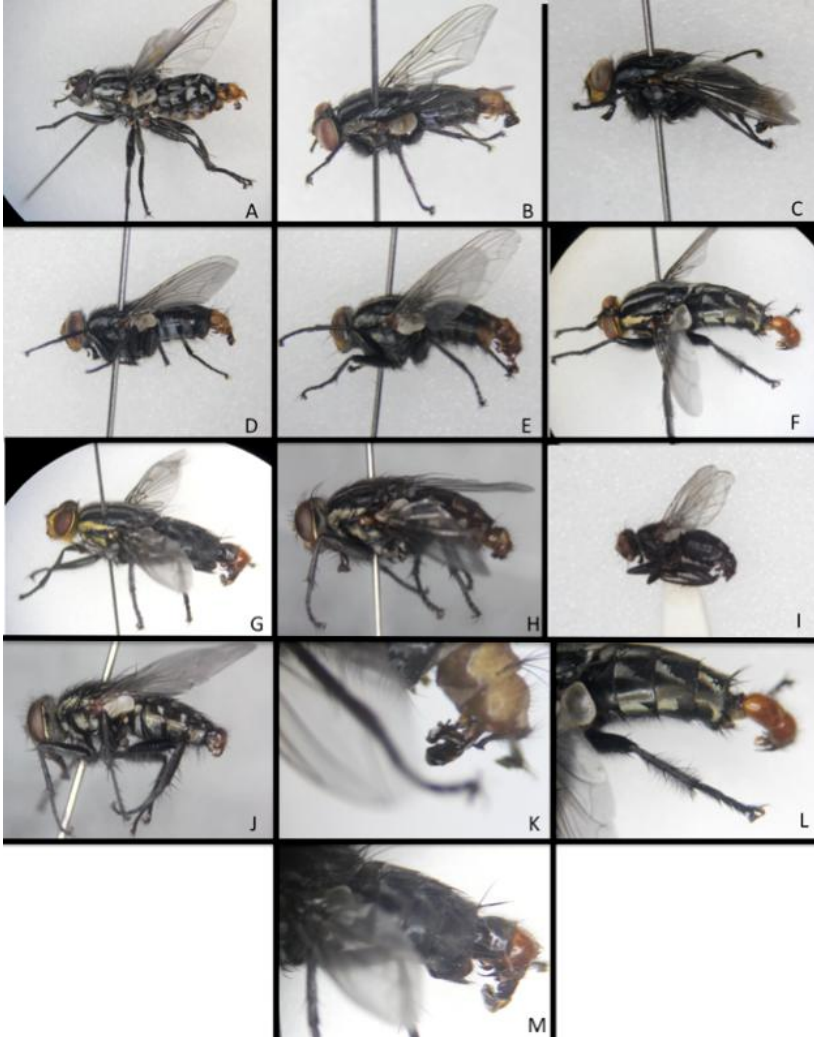
Colonizando uma carcaça humana, na cidade de Florianópolis, encontramos machos de *Microcerella halli* (Fig 5A) o que apesar de ser esperado (Nassu *et al.*, 2014), ainda não havia sido registrado. Nas coletas de 2013 na carcaça de porco (*Sus scrofa*) foram identificadas as espécies: *Oxysarcodexia admixta*, *O. paulistanensis*, *O. riograndensis*, *O. thornax*, *Peckia chrysostoma*, *Retrocitomyia fluminensis*, *Sarcodexia lambens* e *Sarcofahrtiopsis cuneata* (Fig 5- B, C, D, E, F, H, I e J) Dessas, apenas *R. fluminensis* e *S. cuneata* não estavam presentes na chave, tendo sido identificadas pela professora Dra. Cátia Antunes de Mello-Patiu em visita ao Museu Nacional do Rio de Janeiro. Ainda obtivemos *Peckia intermutans* (Fig 6G) e *M. halli* nas armadilhas colocadas na UFSC.

O número de fêmeas nos 3 tipos de coleta foi muito superior ao de machos, o que é esperado pois são as fêmeas fecundadas as mais atraídas pela carne em decomposição, uma vez que esse substrato é

essencial para o desenvolvimento de seus descendentes (Vairo, Moura e Mello-Patiu, 2015).

Todas as espécies identificadas estão frequentemente associadas a carcaças de vertebrados (Barros *et al.*, 2008; Moretti *et al.*, 2009; Vairo *et al.*, 2011; Alves *et al.*, 2014), o que era esperado.

**Figura 5:** Representantes das 10 espécies identificadas nesse trabalho. **A)** *Microcerella halli*. **B)** *Oxysarcodexia admixta*. **C)** *O. paulistanensis*. **D)** *O. riograndensis*. **E)** *O. thornax*. **F)** *Peckia chrysostoma*. **G)** *Peckia intermutans*. **H)** *Retrocitomyia fluminensis*. **I)** *Sarcodexia lambens*. **J)** *Sarcophahrtiopsis cuneata*. **K)** Detalhe do aparelho genital de *O. paulistanensis*. **L)** Detalhe do aparelho genital de *Peckia chrysostoma*. **M)** Detalhe do aparelho genital de *Peckia intermutans*.



Fonte: Arquivo Pessoal.

### 3.2 DESENHO DE INICIADORES

Sequências do COI de 5 das 10 espécies de sarcophagidae foram conseguidas através das buscas no GeneBank (*O. thornax*, *S. lambens*, *P. chrysostoma*, *P. intermutans* e *S. cuneata*). Esse pequeno número de sequências se deve ao fato de que muitas das espécies utilizadas no presente trabalho são endêmicas do Brasil e os estudos em biologia molecular de Sarcophagidae são mais representativos em outros países, como China.

Com base nessas sequências, foram feitos BLASTn contra o banco de dados do NCBI, mas novamente, não obtivemos sequências das demais espécies. Assim sendo, utilizamos as poucas sequências disponíveis para alinhar e buscar os melhores sítios de ligação dos iniciadores.

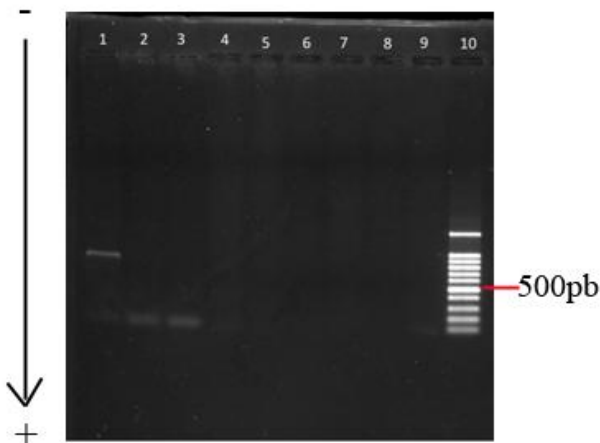
Os iniciadores foram construídos com base em estudos anteriores e foram alinhados nas sequências. Observamos que esses iniciadores estavam em regiões de alta similaridade entre as espécies, de forma que o sítio poderia se manter o mesmo, mas seriam necessárias algumas degenerações para aumentar sua eficiência.

Assim sendo, analisamos manualmente os sítios de ligação dos iniciadores nos alinhamentos das sequências obtidas no GeneBank. Para isso, utilizamos os iniciadores disponíveis na literatura (Nelson *et. al.*, 2007; Meiklejohn *et. al.*, 2011) como modelo e colocando os códigos de degeneração quando parte das sequências apresentava um nucleotídeo e outra parte apresentava outro, o resultado foi apresentado anteriormente nesse trabalho (Tabela 1).

Para determinar qual par de iniciadores seria utilizado no estudo, foi feita uma PCR com cada uma das três opções (Figura 6), tendo sido escolhido aquele desenhado para esse trabalho, pois foram aqueles que se mostraram mais eficientes na amplificação de *R. fluminensis*, cuja sequência não foi encontrada no banco de dados.



**Figura 6:** Gel de Agarose 1% sob corrente constante de 100mV, corado com GelRed para verificação da eficiência dos 3 pares de iniciadores testados. **1 e 2:** Amostras amplificadas com os iniciadores HCO2198-May e LCO1490-May. **3:** Controle Negativo das reações com os iniciadores das colunas 1 e 2. **4 e 5:** Amostras amplificadas com os iniciadores HCO2198-L e LCO1490-L. **6:** Controle Negativo das reações com os iniciadores das colunas 4 e 5. **7 e 8:** Amostras amplificadas com os iniciadores HCO2198 e LCO1490. **9:** Controle Negativo das reações com os iniciadores das colunas 7 e 8. **10:** Marcador de peso molecular 100pb.



Fonte: Arquivo pessoal

### 3.3 EXTRAÇÃO DE DNA

Na figura 7 podemos observar os resultados obtidos da extração de DNA com tampão SQ (Figura 7A), tampão SQ modificado (Figura 7B), fenol/clorofórmio (Figura 7B) e Kit DNeasy Blood & tissue (Qiagen). Na figura 8 é possível verificar a diferença na amplificação do DNA quando utilizamos as pernas e a musculatura torácica.

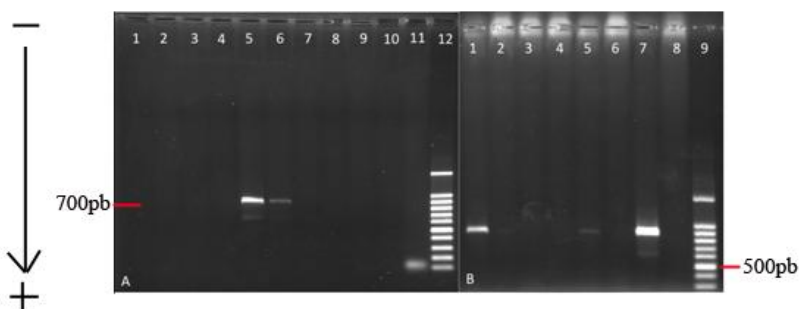
Observamos que o tampão SQ não foi eficiente para a extração de DNA, tanto das pernas (macerasdas ou não) quanto da musculatura torácica. Os métodos que utilizaram o tampão SQ modificado e fenol/clorofórmio foram capazes de extrair o DNA de algumas amostras, mas não de outras, e apenas o método 4 foi regular para todas as amostras, sendo assim, esse foi escolhido, pois apresenta maior reprodutibilidade e eficiência.

Também observamos maior intensidade de banda nas extrações provenientes da musculatura torácica, o que se acredita ser em razão do

elevado número de mitocôndrias presentes nesse tecido pela necessidade de energia para o batimento das asas, principal forma de locomoção desses animais.

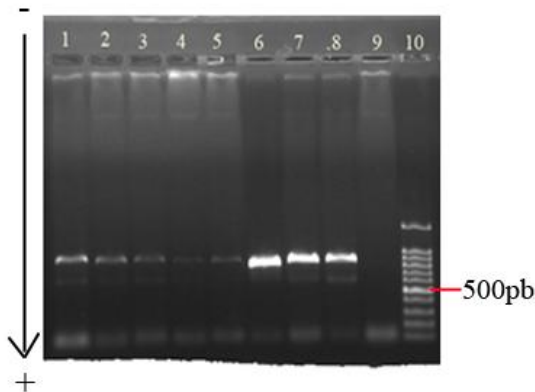
Com base nesses resultados, foi padronizado o método de extração por Kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen) sendo a musculatura torácica o tecido escolhido para a extração.

**Figura 7:** Gel de Agarose 1% sob corrente constante de 100mV, corado com GelRed mostrando os produtos da PCR dos testes dos métodos de Extração. **A)** Para todos os métodos foram utilizadas 3 pernas de cada animal. **1 e 2:** Tampão SQ; **3 e 4:** Kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen) com maceração; **5 e 6:** extração por Kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen) sem maceração; **7 e 8:** Tampão SQ novo com maceração; **9 e 10:** Tampão SQ novo sem maceração; **11:** Controle Negativo; **12:** Marcador de peso molecular 100pb. **B)** Para todos os métodos foi utilizada a musculatura torácica. **1 a 4:** Método Fenol/Clorofórmio; **5 e 6:** Tampão SQ modificado; **7:** extração por Kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen); **8:** Controle Negativo; **9:** Marcador de peso molecular 100pb.



*Fonte: Arquivo pessoal.*

**Figura 8:** Gel de Agarose 1% sob corrente constante de 100mV, corado com GelRed mostrando a diferença na amplificação de DNA de *S. lambens* extraído de 3 pernas (Colunas **1 a 4**) e Musculatura torácica (**5 a 7**). **8)** Controle positivo (amostra cuja amplificação era certa, DNA extraído das pernas sem maceração utilizando Kit DNeasy Blood and Tissue). **9)** Controle negativo. **10)** Marcador de peso molecular 100pb.



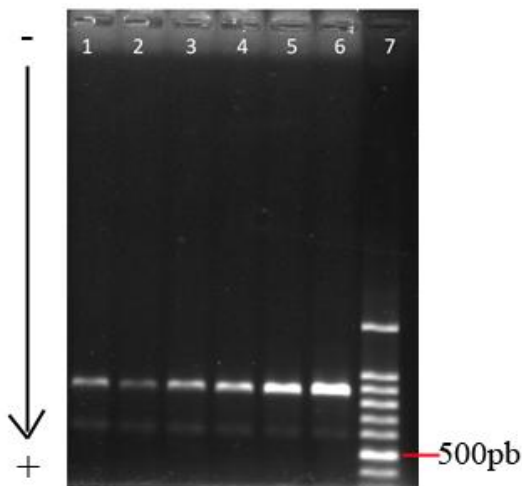
Fonte: Arquivo Pessoal.

### 3.4 PADRONIZAÇÃO DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Como os iniciadores possuíam valores muito distintos de ligação (48,6°C senso e 55,6°C anti-senso), foi feita uma PCR com gradiente de temperatura (48, 50, 52, 54, 56, 58), cujo resultado pode ser observado na figura 9, onde é visível que a 58°C obtivemos maior quantidade do produto.

A visualização em gel nos fornece dados quantitativos da amostra, isso porque o GelRed se intercala na molécula de DNA e ao ser excitado emite uma fluorescência visível em luz UV (ultra-violeta), sendo assim, quanto maior a intensidade dessa fluorescência, maior a quantidade de moléculas de GelRed se intercalou ao DNA e consequentemente, mais DNA temos na amostra, visto que os volumes e as concentrações eram os mesmos em todas elas.

**Figura 9:** Gel de Agarose 1% sob corrente constante de 100mV, corado com GelRed para verificar o efeito da temperatura na produção do fragmento desejado. 1) 48°C. 2) 50°C. 3) 52°C. 4) 54°C. 5) 56°C. 6) 58°C. 7) Marcador de peso molecular 100pb.



Fonte: Arquivo Pessoal.

### 3.5 AMPLIFICAÇÕES DE COI DAS 10 ESPÉCIES ESTUDADAS

Após a padronização da PCR, procedeu-se a amplificação de COI das 10 espécies identificadas (*M. halli*, *O. admixta*, *O. paulistanensis*, *O. riograndensis*, *O. thornax*, *P. chrysostoma*, *P. intermutans*, *R. fluminensis*, *S. cuneata* e *S. lambens*) e verificou-se que todas apresentavam o mesmo tamanho do amplicon (Figuras 8, 10 e 11) de acordo com o esperado (Wells *et al.*, 2001; Hebert *et al.*, 2003; Rodrigues, 2011; Meiklejohn *et al.*, 2013a; Piwczynski *et al.*, 2014), com exceção de um indivíduo de *P. intermutans* que apresentou um fragmento um pouco maior, o que pode ser em decorrência de alguma variação intra-específica.

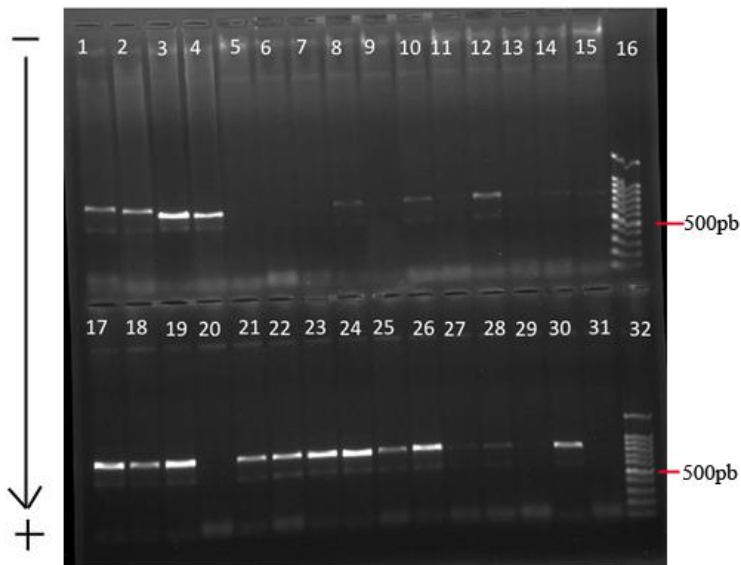
Nas figuras 8, 10 e 11 também é possível verificar que existe sempre uma banda um pouco menor, em todas as amostras, o que significa que nossos iniciadores estão reconhecendo alguma outra sequência de DNA. Para verificar o que poderia estar sendo amplificado, buscamos no GeneBank o genoma mitocondrial das espécies, mas, assim como o COI para a maioria das espécies, essa informação não

estava disponível. Entretanto, conseguimos encontrar o genoma mitocondrial de *Ravina pernix* (KM676414) (Guo *et al.*, 2014) e *Helicophagella melanura* (KP091687) idêntico ao de *Sarcophaga melanura* (NC\_026112.1) (Zhang *et al.*, 2014). Foi feito o alinhamento dessas sequências e dos iniciadores no ClustalW2, mas como o genoma é muito grande, o alinhamento foi feito a cada 700 bases, repetindo as últimas 70 bases quando as sequências alinhavam no final do fragmento observado, mas novamente, os iniciadores alinharam bem apenas na região referente ao gene da Citocromo C Oxidase sub unidade I. Houve alinhamentos ao logo das aproximadamente 15200 bases, no entanto esse alinhamento não era superior a 7 bases.

Entretanto, como não foi possível encontrar o genoma de nenhuma das 10 espécies desse estudo, pensamos que variações interespecíficas pudessem estar atrapalhando o alinhamento e, portanto, a determinação do fragmento amplificado. Sendo assim, buscamos na literatura trabalhos que nos dessem um direcionamento de o que estaria sendo amplificado com base no tamanho do fragmento (aproximadamente 550pb) e verificamos que independente da espécie, os genes mitocondriais de Sarcophagidae possuem aproximadamente os mesmos tamanhos (Fu *et al.*, 2014; Guo *et al.*, 2014, Zhang *et al.*, 2014). Sendo assim, aventamos que os genes ATP6 e COII, que tem aproximadamente aquele tamanho, pudessem estar sendo amplificados, mas os testes *in silico* mostraram que os iniciadores utilizados não seriam capazes de amplificar esses genes, o que nos leva a crer que possa ser um fragmento do DNA genômico desses indivíduos que esteja sendo amplificado.

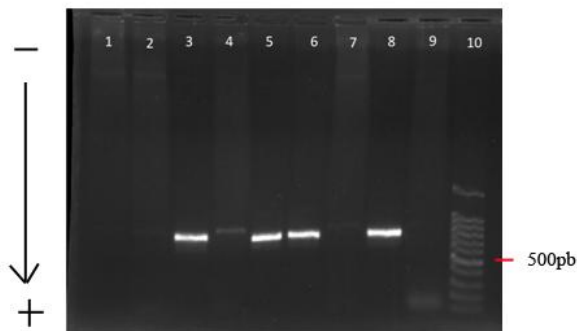
Não foi possível amplificar o COI das espécies *Oxysarcodexia admixta* e *Peckia chrysostoma*, isso pode ter ocorrido pela baixa especificidade dos iniciadores, sendo assim, seria interessante o desenho de iniciadores mais específicos para essas espécies.

**Figura 10:** Gel em Agarose 1% sob corrente constante de 100mV, corado com GelRed mostrando os produtos da PCR para 8 espécies abordadas nesse estudo. **1 a 4)** *M. halli*. **5 a 8)** *P. chrysostoma*. **9 a 12)** *O. admixta*. **13 a 15 e 17)** *O. paulistanensis*. **18 a 21)** *O. thornax*. **22 a 25)** *S. cuneata*. **26 e 27)** *R. fluminensis*. **28 a 31)** *O. riograndensis*. **16 e 32)** Marcador de peso molecular 100pb.



Fonte: Arquivo Pessoal.

**Figura 11:** Gel em Agarose 1% sob corrente constante de 100mV, corado com GelRed mostrando os produtos da PCR para 2 espécies abordadas nesse estudo. **1 e 2)** *O. riograndensis*. **3 a 8)** *P. intermutans*. **9)** Controle negativo. **10)** Marcador de peso molecular de 100pb.



Fonte: Arquivo Pessoal.

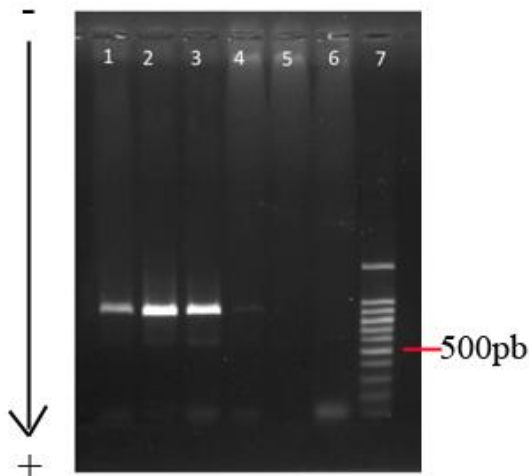
### 3.6 SEQUENCIAMENTO

As amostras cujo COI havia amplificado corretamente foram selecionadas para sequenciamento e digestão. Aquelas que obtiveram concentração maior que 5ng/ $\mu$ l foram selecionadas para sequenciamento, no entanto, só foi possível obter as sequências de 1 indivíduo de cada espécie. Tanto a fita senso quanto a anti-senso foram sequenciadas, tendo sido utilizado o consenso para o alinhamento e demais análises.

Como obtivemos 2 bandas, fizemos uma PCR em gradiente de temperatura para verificar se em temperaturas mais altas seria possível aumentar ainda mais a especificidade da reação e, assim, eliminar a banda inespecífica.

Sendo assim, foi feito um novo gradiente de temperatura (56°C, 58°C, 60°C, 62°C e 64°C) (Figura 12). Foi possível perceber que à 56°C a banda inespecífica quase não aparece, no entanto, nossa banda de interesse também fica bem menos intensa. Nas demais temperaturas não houve melhora, de forma que a temperatura de 58°C continuou se mostrando a mais eficiente e por isso foi escolhida para dar continuidade aos experimentos.

**Figura 12:** Gel de Agarose 1% sob corrente constante de 100mV, corado com GelRed para verificar os produtos da PCR em gradiente de temperatura. 1) 56°C. 2) 58°C. 3) 60°C. 4) 62°C. 5) 64°C. 6) Controle Negativo. 7) Marcador de peso molecular 100pb.



Fonte: Arquivo Pessoal.

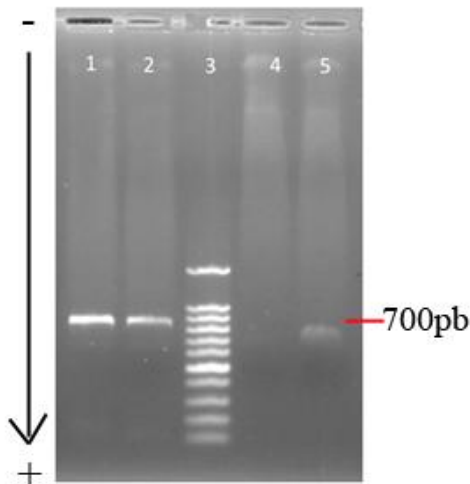
A fim de retirar os possíveis contaminantes da reação de sequenciamento, foram testados dois métodos de purificação por Precipitação com isopropanol e purificação da banda do gel por Kit GFX PCR Dna and Gel Band Purification Illustra (GE).

Para o teste inicial, foram selecionados 2 indivíduos de *S. lambens* e testados os 2 métodos para cada indivíduo. A figura 13 mostra os processos de purificação, onde podemos verificar que ambos os processos foram eficientes. A coluna de purificação da amostra 3 estava com defeito, mas só foi possível perceber esse problema após a primeira etapa do processo, de forma que demos continuidade ao mesmo. Na figura 13 também é possível verificar que esse defeito atrapalhou a purificação, sendo assim, as amostras 1, 2 e 4 foram selecionadas para sequenciamento.

Ambos os métodos foram eficientes, apesar de a precipitação com isopropanol apresentar menor perda de DNA, a purificação com Kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification Illustra (GE) apresentou melhor qualidade de seqüências, sendo o método escolhido para dar continuidade ao processo.



**Figura 13:** Gel de Agarose 1% sob corrente constante de 100mV, corado com brometo de Etídeo. **1 e 2:** Amostras precipitadas com Isopropanol; **3:** Marcador de peso molecular 100pb; **4 e 5:** Amostras purificadas do gel por Kit GFX PCR Dna and Gel Band Purification Illustra (GE).



Fonte: Arquivo Pessoal.

Foi possível obter as sequências de 7 das 10 espécies, apenas *R. fluminensis*, *O. admixta* e *P. chrysostoma* não houve sequenciamento, apesar das inúmeras tentativas. As espécies *O. admixta* e *P. chrysostoma* não tiveram o COI amplificado, por isso, não foi possível sequenciar, mas *R. fluminensis* sempre apresentou produtos com bastante DNA amplificado, tendo sido utilizado para a padronização de boa parte das técnicas e também por ter sido a mais frequente nas coletas de 2013. No caso dessa espécie, não obtivemos sequências com qualidade suficiente para fazer o contig, sendo assim, novos protocolos devem ser testados para essa espécie.

As sequências obtidas nesse trabalho serão depositadas no GeneBank juntamente com o artigo resultante desse trabalho.

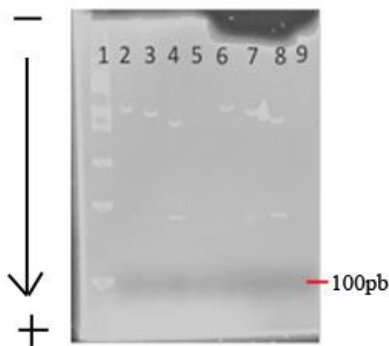
### 3.7 SÍTIOS DE RESTRIÇÃO

Utilizamos a ferramenta NebCutter da empresa Bio Labs para localizar os sítios de enzimas de restrição.

Com base nas sequências obtidas e naquelas disponíveis no GeneBank, foi escolhida a enzima TaqI, por possuir pelo menos 1 sítio em todas as sequências e potencialmente cortar o amplicom em fragmentos de tamanhos diferentes.

A purificação dos produtos PCR foi feita por precipitação com Isopropanol por apresentar menor perda de DNA. A figura 14 mostra o resultado da padronização do protocolo de digestão, foram utilizadas as espécies *R. fluminensis*, *S. cuneata* e *P. intermutans*. Podemos verificar que a presença ou ausência do BSA não interferiu na digestão. As digestões foram resolvidas em Gel de Poliacrilamida 10% pois sua capacidade de resolução é melhor que a Agarose, coradas com brometo e visualizadas com a ajuda de um foto transiluminador.

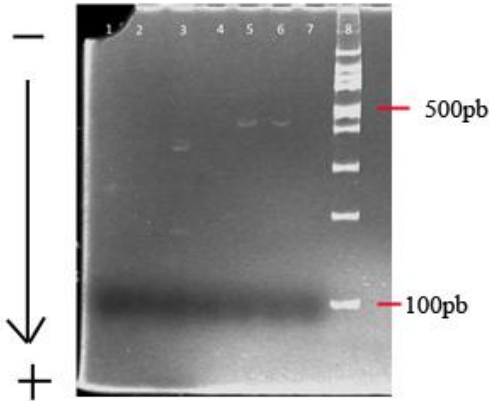
**Figura 14:** Gel de Poliacrilamida 10% sob corrente constante de 80mV, corado com Brometo. **1)** Marcador de peso molecular 100pb; **2 a 5)** Digestões com BSA, sendo **2)** *R. fluminensis*; **3)** *S. cuneata*; **4)** *P. intermutans* e **5)** Controle Negativo. **6 a 9)** Digestão sem BSA, sendo **6)** *R. fluminensis*; **7)** *S. cuneata*; **8)** *P. intermutans* e **9)** Controle negativo.



Fonte: Arquivo Pessoal.

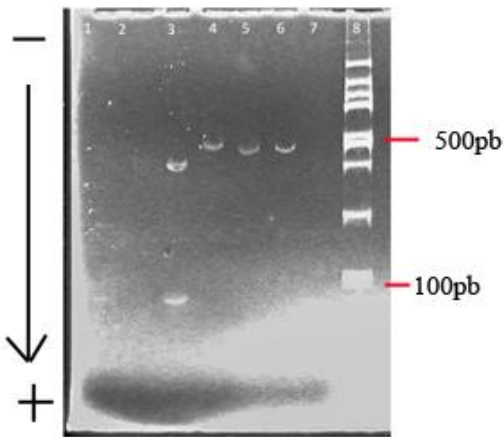
A figura 14 também mostra que o método é reprodutível. Sendo assim, foram feitas digestões para as outras espécies (Figuras 15, 16 e 17).

**Figura 15:** Resultado das digestões em Géis de Poliacrilamida 10% sob corrente constante de 80mV, corados com brometo. **1 a 3)** *M. halli*. **4)** *O. admixta*. **5 e 6)** *O. thornax*. **7)** Controle negativo. **8)** Marcador de peso molecular 100pb.



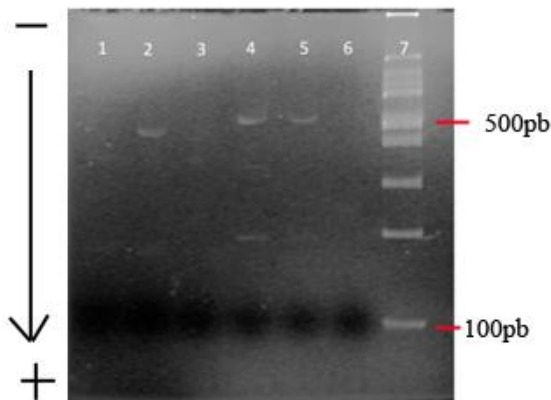
Fonte: Arquivo Pessoal.

**Figura 16:** Resultado das digestões em Géis de Poliacrilamida 10% sob corrente constante de 80mV, corados com brometo. **1)** *O. riograndensis*. **2 e 3)** *P. intermutans*. **4)** *R. fluminensis*. **5 e 6)** *S. cuneata*. **7)** Controle negativo. **8)** Marcador de peso molecular 100pb.



Fonte: Arquivo Pessoal.

**Figura 17:** Resultado das digestões em Géis de Poliacrilamida 10% sob corrente constante de 80mV, corados com brometo. **1)** *M. halli*. **2)** *O. paulistanensis*. **3)** *P. chrysostoma*. **4 e 5)** *S. lambens*. **6)** Controle negativo. **7)** Marcador de peso molecular 100pb.

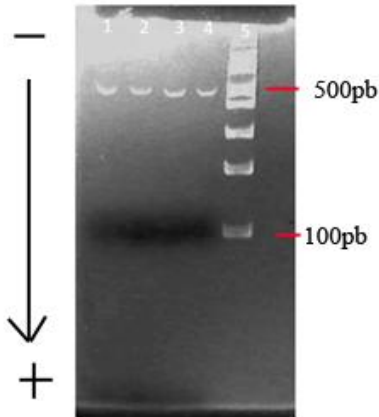


Fonte: Arquivo Pessoal.

As espécies *R. fluminensis* e *S. cuneata* apresentam um padrão de bandas muito parecido e, como a separação das amostras por 3 horas em gel poliacrilamida a 10% para separação de bandas de até 100pb. Nas análises *in silico* verificamos que a digestão da TaqI produziria pequenos fragmentos, além dos que obtivemos no gel, sendo assim, achamos que poderíamos estar perdendo bandas pequenas que poderiam facilitar a diferenciação das 2 espécies. Dessa forma, fizemos um gel com as digestões das 2 espécies e deixamos menos tempo e ainda assim não obtivemos diferença muito expressiva do tamanho das bandas (Figura 18), pelo contrário, a diferença entre elas ficou ainda mais sutil. Sugerimos aumentar a concentração do gel para 12% ou buscar outra enzima que tenha sítio em apenas uma das espécies para fornecer um diagnóstico diferencial.

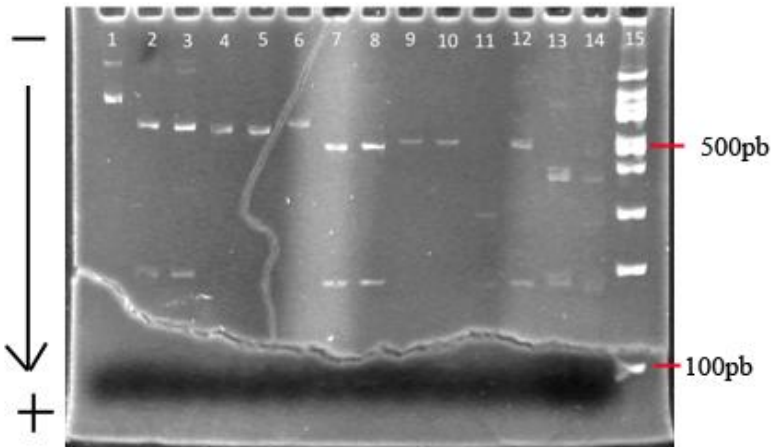
Foi feito um gel com todas as digestões e com o produto da PCR não digerido para estabelecer um padrão para essas espécies (Figura 19).

**Figura 18:** Resultado das digestões em Gel de Poliacrilamida 10% sob corrente constante de 80mV, corado com brometo. **1 e 2)** *R. fluminensis*. **3 e 4)** *S. cuneata*. **5)** Marcador de peso molecular 100pb.



Fonte: Arquivo Pessoal.

**Figura 19:** Resultado das digestões das 8 espécies em Gel de Poliacrilamida 10% sob corrente constante de 80mV, corado com brometo. **1)** Produto de PCR não digerido. **2 e 3)** *S. lambens*. **4 e 5)** *S. cuneata*. **6)** *R. fluminensis*. **7 e 8)** *P. intermutans*. **9 e 10)** *O. thornax*. **11)** *O. riograndensis*. **12)** *O. paulistanensis*. **13 e 14)** *M. halli*. **15)** Marcador de peso molecular 100pb.



Fonte: Arquivo Pessoal.

A enzima TaqI conseguiu diferenciar todas as espécies cuja PCR foi eficiente.

O Método se mostrou eficiente pois indivíduos diferentes da mesma espécie apresentaram mesmo padrão de bandas (fig19). A tabela 4 mostra o número de cortes e o tamanho aproximado dos fragmentos observados em gel. O RFLP-PCR é muito eficiente para identificação dos mais variados grupos taxonômicos (Wolf *et al.*, 1999; Girish *et al.*, 2005; Alves, 2007; Rasmussen, 2012; Diba *et al.*, 2014). Existem muitos estudos com identificação de espécies por RFLP-PCR em Calliphoridae (Sperling *et al.*, 1994; Schroeder *et al.*, 2003; Thyssen *et al.*, 2005). Ratcliffe e colaboradores (2003) utilizaram RFLP-PCR na identificação de moscas das famílias Calliphoridae, Muscidae e Sarcophagidae, no entanto, os genes amplificados foram ITS1 e ITS2. Sendo assim, esse trabalho é pioneiro na utilização de RFLP-PCR com COI de Sarcophagidae.

**Tabela 4:** Número de cortes e tamanho aproximado dos fragmentos obtidos após digestão dos produtos de PCR pela TaqI.

<b>Espécie</b>	<b>Cortes</b>	<b>Tamanho aproximado dos fragmentos (pb)</b>
<i>M. halli</i>	2	380/280/180
<i>O. paulistanensis</i>	1	510/300
<i>O. riograndensis</i>	1	300/180
<i>O. thornax</i>	1	520
<i>P. intermutans</i>	1	500/180
<i>R. fluminensis</i>	1	600
<i>S. cuneata</i>	1	580
<i>S. lambens</i>	1	590/200

Fonte: Arquivo Pessoal.

### 3.8 FILOGENIA

As sequências que obtivemos foram alinhadas com as sequências de COI encontradas no GeneBank das espécies desse trabalho para traçarmos a filogenia dessas espécies.

A figura 20 mostra uma árvore construída utilizando o método Neighbor-Joining e distância Jukes-Cantor. Os resultados obtidos vão ao encontro do que é disponível na literatura que mostram o gênero *Oxysarcodexia* (Meiklejohn *et al.*, 2011; Rodrigues, 2011; Meiklejohn *et al.*, 2013b) como sendo monofilético. O gênero *Peckia* apresentou-se

como sendo parafilético, resultado esse também suportado por outros estudos (Wells et al., 2001; Rodrigues, 2011; Amorim *et al.*, 2014; Piwczynski *et al.*, 2014) que mostram que a filogenia desse grupo não está bem esclarecida.

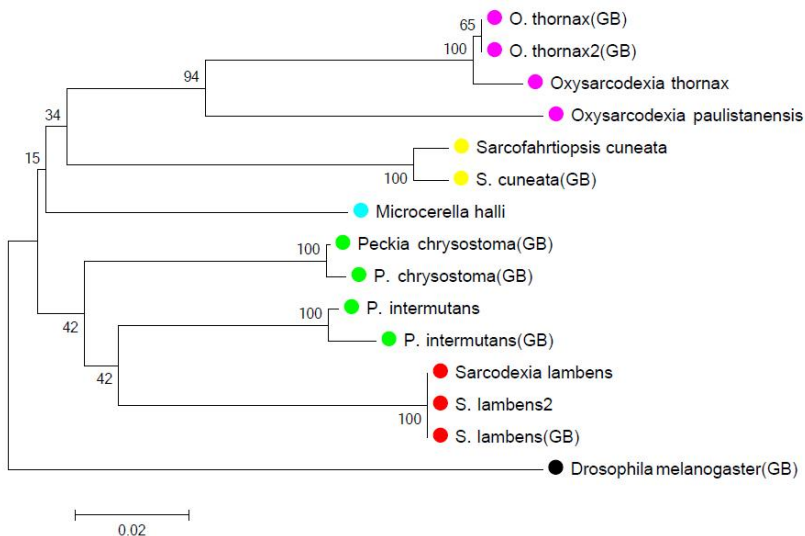
Como utilizamos apenas 1 gene para as análises filogenéticas, sabemos que nossas inferências são limitadas, no entanto, o agrupamento das nossas sequências com àquelas disponíveis no banco de dados (relativos às espécies em questão) mostra a qualidade das sequências obtidas nesse trabalho.

No que diz respeito à *M. halli*, não foram encontrados estudos filogenéticos para comparação com os resultados aqui obtidos. Talvez por sua ocorrência ser limitada à região Neotropical (Nassu *et al.*, 2014) e a maior parte dos estudos moleculares com Sarcophagidae serem fora dessa região.

Como o objetivo principal era a identificação das espécies coletadas na Grande Florianópolis, e não estudos evolutivos mais complexos, acreditamos que o gene que codifica para a subunidade 1 da Citocromo C Oxidase é um bom marcador, e pode ser utilizado em outros estudos dessa natureza.

A utilização da enzima TaqI para a identificação dessas 8 espécies é eficiente e confiável, podendo ser utilizada na rotina laboratorial do IGP, uma vez que esse dispõe dos equipamentos e reagentes necessários para proceder à RFLP-PCR.

**Figura 20:** Árvore filogenética das sequências de Sarcophagidae construída pelo método Neighbor-Joining e distância Jukes-Cantor-p. Os números acima dos ramos são os valores de bootstrap baseados em 1000 replicações.



Fonte: Arquivo Pessoal.



## CONCLUSÃO

- Os iniciadores desenhados foram eficientes na amplificação de 8 das 10 espécies coletadas nesse trabalho.

- É possível que as espécies, cuja amplificação não foi possibilitada, tenham alguma mutação no sítio de ligação dos iniciadores.

- O Kit DNA Blood & Tissue (Qiagen) foi o método mais eficaz na extração de DNA dos exemplares.

- O protocolo de sequenciamento foi eficaz para 7 das 8 espécies testadas.

- A digestão com enzima TaqI foi eficaz para identificar as espécies: *Microcerella halli*, *Oxysarcodexia paulistanensis*, *O. riograndensis*, *O. thornax*, *Peckia intermutans*, *Retrocitomyia fluminensis*, *Sarcophartiopsis cuneata*, *Sarcodexia lambens*.

- Para a identificação das espécies *R. fluminensis* e *S. cuneata* será necessário aumentar a concentração do gel para 12% ou utilizar uma enzima de restrição suplementar para facilitar a diferenciação.

- As análises filogenéticas realizadas nesse trabalho vão ao encontro daquelas disponíveis na literatura, o que mostra a eficiência dos métodos empregados nesse trabalho para identificar de forma molecular as espécies obtidas para esse estudo.

## SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Testar a RFLP-PCR para identificar fêmeas e Larvas.

- Testar o método em moscas da família Calliphoridae para verificar a especificidade do método.

- Desenhar novos iniciadores mais específicos utilizando as sequencias obtidas neste estudo e as disponíveis no GeneBank, que sejam capazes de amplificar COI das 10 espécies estudadas.

- Ampliar os estudos com as outras espécies da família Sarcophagidae encontradas no Brasil.



## REFERÊNCIAS

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. 4 Ed. Porto Alegre. Artmed. 2002.

ALVES, R.T. **Um novo protocolo de PCR/RFLP para a determinação dos Genótipos da CSP de *Plasmodium vivax* (VK210, VK247 e *P. vivax-like*)**. 73f. Dissertação (Mestrado em Genética). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. São José do Rio Preto. 2007.

ALVES, A.C.F.; SANTOS, W.E.; CREÃO-DUARTE, A.J. **Diptera (Insecta) de importância forense da região Neotropical**. Entomotropica. 2014. 29(2): 77-94.

AMORIM, J.A.; SOUZA, C.M.; THYSSEN, P.J. **Molecular Characterization of *Peckia (Pattonella) intermutans* (Walker, 1861) (Diptera: Sarcophagidae) based on the Partial Sequence of the Mitochondrial Cytochrome Oxidase I Gene**. J. Foren. Res. 2014. 5(3): 227-231.

ANJOS, V.A. **Ocorrência de muscóides necrófagos em carcaças de vertebrados silvestres no Município de Capão do Leão, RS, Brasil**. 35f. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Pelotas. 2009.

AZEVEDO, R.R. ; KRÜGER, R.F. **The influence of temperature and humidity on abundance and richness of Calliphoridae (Diptera)**. Iheringia, Série Zoologia. 2013. 103 (2) : 145-152.

BARBIERI, E. Biodiversidade : **A variedade de vida no planeta Terra**. Disponível em : <ftp://ftp.sp.gov.br/ftppesca/biodiversidade.pdf> acesso em: 29/04/2016.

BARBOSA, R.R.; MELLO-PATIU, C.A.; MELLO, R.P.; QUEIROZ, M.M.C. **New records of calyprate dipterans (Fanniidae, Muscidae and Sarcophagidae) associated with the decomposition of domestic pigs in Brazil**. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2009. 104(6): 923-926.

BARCELOS, P.S. **Desenvolvimento pós-embrionário de *Chrysomya megacephala* (fabricius, 174) (Diptera: Calliphoridae) em temperatura ambiente e o efeito de baixas temperaturas sobre a eclosão dos ovos.** 59f. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. 2013.

**BARCODE OF LIFE.** Disponível em: <http://www.barcodeoflife.org/content/about/what-dna-barcoding> Acesso em: 05/10/2015

BARROS, R.M.; MELLO-PATIU, C.A.; PUJOL-LUZ, J.R. **Sarcophagidae (Insecta, Diptera) associados à decomposição de carcaças de *Sus scrofa* Linnaeus (Suidae) em área de Cerrado do Distrito Federal, Brasil.** Rev. Bras. Entomol. 2008. 52(4): 606-609.

BENECKE, M. **A brief history of forensic entomology.** Int. For. Res. & Cons. 2001. 120: 2-14.

BERGERET, M. **Infanticide. Momification naturelle du cadavre.** Ann. Hyg. Méd. Lég. 1855. 4: 442-452.

BIOINFORMATICS. Disponível em: <http://www.bioinformatics.org/sms/iupac.html> Acesso em: 05/04/2016.

CAINÉ, L.S.R.M. **Entomologia Forense: Identificação Genética de Espécies em Portugal.** 109f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde). Faculdade de Medicina. Universidade de Coimbra. Coimbra. 2010.

CAMPOBASSO, C.P. ; VELLA, G. D. ; INTRONA, F. **Factors affecting decomposition and Diptera colonization.** Forensic Science Intern. 2001. 120 : 18-27.

CARVALHO, E.C.T.; QUEIROZ, P.R. Descrição das principais famílias de Diptera utilizadas na entomologia forense. V Mostra de Produção Científica da Pós-Graduação Latu Sensu da PUC Goiás. Vol: 1. p. 13. 2010.

CARVALHO, L.M.L. ; LINHARES, A.X. **Seasonality of Insect Succession and Pig Carcass Decomposition in a Natural Forest Area in Southeastern Brazil.** J. Forensic Sci. 2001. 46(3) : 604-608.

CARVALHO, L.M.L.; THYSSEN, P.J.; GOFF, M.L.; LINHARES, A.X. **Observations on the Succession Patterns of Necrophagous Insects on a Pig Carcass in a Urban Area of Southeastern Brazil.** Aggrawal's Internet Journal of Forensic Medicine and Toxicology. 2004. 5(1) : 33- 39.

CARVALHO, L.M.L.; THYSSEN, P.J.; LINHARES, A.X.; PALHARES, F.A.B. **A Checklist of Arthropods Associated with Pig Carrion and Human Corpses in Southeastern Brazil.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2000. 95(1): 135-138.

CARVALHO, M.C.C.G.; SILVA, D.C.G. **Sequenciamento de DNA de nova geração e suas aplicações na genômica de plantas.** Ciência Rural. 2010. 40(3): 735-744.

CATTS, E.P.; GOFF, M.L. **Forensic Entomology in Criminal investigations.** Ann. Rev. Entomol. 1992. 37 : 253-272.

CHEN, C.P. ; LEE-JR, R.E. ; DENLINGER, D.L. **A comparison of the responses of tropical and temperate flies (Diptera : Sarcophagidae) to cold and heat stress.** J Comp Physiol B. 1990. 160 : 543-547.

CHERIX, D.; WYSS, C.; PAPE, T. **Occurrence of flesh flies (Diptera: Sarcophagidae) on human cadavers in Switzerland, and their importance as forensic indicators.** For. Sci. Inter. 2012. 220: 158-163.

COURTNEY, G.W.; PAPE, T.; SKEVINGTON, J.H.; SINCLAIR, B.J. **Biodiversity of Diptera.** Insect Biodiversity. Capítulo 9. Science and Society. 1º Ed. 2009. DOI: 10.1002/9781444308211.ch9

CRUZ-VÁZQUEZ, C. ; MENDOZA, I.V. ; PARRA, M.R. ; GARCÍA-VÁZQUEZ, Z. **Influence of temperature, humidity and rainfall on field population trend of *Stomoxys calcitrans* (Diptera : Muscidae) in a semiarid climate in Mexico.** Parasitol. Latinoam. 2004. 59 : 99-103.

DALY, H.V.; DOYEN, J.T.; OURCELL, A.H. **Introduction to insect biology and diversity**. Oxford University Press. Oxford. p. 675. 1998.

DENLINGER, D.L.; ZDÁREK, J. **Metamorphosis behavior of flies**. *Annu. Rev. Entomol.* 1994. 39: 243-266.

DIBA, K.; MIRHENDI, H.; KORDBACHEH, P.; REZAIE, S. **Development of RFLP-PCR method for the identification of medically importante *Aspergillus* species using single restriction enzyme *MwoI***. *Brazilian Journ. Microbiol.* 2014. 45(2): 503-507.

FERNANDES, M.T. **Levantamento da fauna entomológica em carcaça de suíno em ambiente de restinga no Parque Estadual da Serra do Tabuleiro**. 66f. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. 2014.

FERRAZ, A.C.P.; GADELHA, B.Q.; AGUIAR-COELHO, V.M. **Influência Climática e Antrópica na Abundância e Riqueza de Calliphoridae (Diptera) em Fragmento Florestal da Reserva Biológica do Tinguá, RJ**. *Neotropical Entomology*. 2010. 39(4) : 476-485.

FOLMER, O.; BLACK, M.; HOEH, W.; LUTZ, R.; VRJENHOEK, R. **DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates**. *Mol. Mar. Biol. Biotech.* 1994. 3(5) : 294-299.

FRASSON, L.P.; ROSSI, J.L.; LEITE, F.L.G.; KROHLING, W. **A história da Entomologia Forense e sua importância na elucidação de questões judiciais**. *Natureza on line*. 2006. 4(2): 77-79.

FU, X.; CHE, K.; ZHU, Z.; LIU, J.; GUO, Y. **The complete mitochondria genome of *Sarcophaga africa* (Diptera: Sarcophagidae)**. *Mitochondrial DNA*, pp 1-2, 2014. DOI: 10.3109/19401736.2014.982582

GENOME NEWS NETWORK. **Genetics and Genomics Timeline.** Disponível em: [http://www.genomenewsnetwork.org/resources/timeline/1977\\_Gilbert.php](http://www.genomenewsnetwork.org/resources/timeline/1977_Gilbert.php) Acesso em: 01/04/2016.

GIRISH, P.S.; ANJANEYULU, A.S.R.; VISWAS, K.N.; SHIVAKUMAR, B.M.; ANAND, M.; PATEL, M.; SHARMA, B. **Meat species identification by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) of mitochondrial 12S rRNA gene.** Meat Sci. 2005. 70: 107-112.

**GRANFPOLIS.** Institucional. Disponível em: <http://www.granfpolis.org.br/cms/pagina/ver/codMapaItem/43178>. Acesso em: 24/03/2016.

GUO, J.; XIE, K.; CHE, K.; HU, Z.; GUO, Y. **The complete mitochondria genome of *Ravinia pernix* (Diptera: Sarcophagidae).** Mitochondrial DNA. Early Online: 1-2. 2014. DOI: 10.3109/19401736.2014.982560

GUPTA, A.; SETIA, P. **Forensic Entomology – Past, Present and Future.** Aggrawal's Internet Journal of Forensic Medicine and Toxicology. 2004. 5(1) : 50- 53.

HARVEY, M.L.; DADOUR, I.R.; GAUDIERI, S. **Mitochondrial DNA cytochrome oxidase I gene: potential for distinction between immature stages of some forensically importante fly species (Diptera) in western Australia.** Foren. Sci. Intern. 2003. 131: 134-139.

HEBERT, P.D.N.; CYWINSKA, A.; BALL, S.L.; WAARD, J.R. **Biological identifications through DNA barcodes.** Proc. R. Soc. Lond. B. 2003. 270: 313-321. DOI: 10.1098/rspb.2002.2218

IANCU, L.; SAHLEAN, T.; PURCAREA, C. **Dynamic of Necrophagous Insect and Tissue Bacteria for Postmortem Interval Estimation During the Warm Season in Romania.** J. of Medical Entomology. 2015. 1-13.

JORDAENS, K.; SONET, G.; RICHEL, R.; DUPONT, E.; BRAET, Y.; DESMYTER, S. **Identification of forensically important *Sarcophaga* species (Diptera: Sarcophagidae) using the mitochondrial *COI* gene.** Int. J. Legal Med. 2013. 127: 491-504.

JUK, L.B. **Levantamento da fauna de artrópodes em carcaça de suíno em ambiente silvestre com vegetação de restinga na ilha de santa catarina como subsídio para as ciências forenses.** 62 f. Monografia (TCC em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Santa Catarina. 2013.

KEH, B. **Scope and applications of forensic Entomology.** Annual Review of Entomology. Vol: 30. p. 137-154. 1985.

KOSMANN, C.; MACEDO, M.P; BARBOSA, T.A.F.; PUJOL-LUZ, J.R. ***Chrysomya albiceps* (Widemann) and *Hemilucilia segmentaria* (Fabricius) (Diptera, Calliphoridae) used to estimate the postmortem interval in a forensic case in Minas Gerais, Brazil).** Rev. Bras. de Entomol. 2011. 55(4) : 621-623.

LECCESE, A. **Insects as forensic indicators : methodological aspects.** Aggrawal's Internet Journal of Forensic Medicine and Toxicology. 2004. 5(1) : 26-32.

MARCHIORI, C.H.;SILVA, C.G.; CALDAS, E.R.; VIEIRA, C.I.S.; ALMEIDA, K.G.S.; TEIXEIRA, F.F.; LINHARES, A.X. **Artrópodos associados com carcaça de suíno em Itumbiara, sul de Goiás.** Arquivos do instituto de Biologia. Vol: 67(2). p. 167-170, 2000.

MARQUES, F. 2015. **Oxidase do Citocromo C.** Disponível em: <http://knoow.net/cienciasexactas/quimica/oxidase-do-citocromo-c/>  
Acesso em: 01/04/2016.

MEIKLEJOHN, K.A.; WALLMAN, J.F.; DOWTON, M. **DNA-based identification of forensically important Australian Sarcophagidae (Diptera).** Int. J. Legal Med. 2011. 125: 27-32.



MEIKLEJOHN, K.A.; WALLMAN, J.F.; DOWTON, M.; **DNA barcoding identifies all immature life stages of a forensically importante flesh fly (Diptera: Sarcophagidae).** Journ. Forens. Sci. 2013a. 58(1): 184-187.

MEIKLEJOHN, K.A.; WALLMAN, J.; PAPE, T.; CAMERON, S.L.; DOWTON, M. **Utility of COI, CAD and morphological data for resolving relationships within the genus *Sarcophaga* (sensu lato) (Dipete: Sarcophagidae): a preliminar study.** Mol. Phylo. Evo. 2013b. 69(1): 133-141.

MELLO-PATIU, C.A. 2015. **Catálogo Taxonômico da Fauna do Brasil.** Sarcophagidae. Disponível em: [http://fauna.jbrj.gov.br/fauna/listaBrasil/ConsultaPublicaUC/BemVindoConsultaPublicaConsultar.do?invalidatePageControlCounter=1&lingua=&jsonRank=&rankTaxon=32767&nomeTaxon=&autor=&nomeVernaculo=&nomeCompleto=Sarcophagidae+Macquart%2C+1834&formaVida=QUALQUER&substrato=QUALQUER&ocorrencia=OCORRE&regiao=QUALQUER&estado=QUALQUER&endemismo= TODOS&origem= TODOS&mostrarAte=SUB\\_ESPECIE&opcoesBusca=NOME\\_ACEITO](http://fauna.jbrj.gov.br/fauna/listaBrasil/ConsultaPublicaUC/BemVindoConsultaPublicaConsultar.do?invalidatePageControlCounter=1&lingua=&jsonRank=&rankTaxon=32767&nomeTaxon=&autor=&nomeVernaculo=&nomeCompleto=Sarcophagidae+Macquart%2C+1834&formaVida=QUALQUER&substrato=QUALQUER&ocorrencia=OCORRE&regiao=QUALQUER&estado=QUALQUER&endemismo= TODOS&origem= TODOS&mostrarAte=SUB_ESPECIE&opcoesBusca=NOME_ACEITO). Acesso em: 18/07/2016.

MONTEIRO-FILHO, E. L. A.; PENEIREIRO, J. L. **Estudo da decomposição e sucessão sobre uma carcaça animal numa área do estado de São Paulo, Brasil.** Revista Brasileira de Biologia. 1987. 47: 289–295.

MORETTI, T.C.; ALLEGRETTI, S.M.; MELLO-PATIU, C.A.; TOGNOLO, A.M.; RIBEIRO, O.B.; SOLIS, D.R. **Occurrence of *Microcerella halli* (Engel) (Diptera, Sarcophagidae) in snake carrion in Southeastern Brazil.** Rev. Bras. Entomol. 2009. 53(2): 318-320.

NASSU, M.P.; THYSSEN, P.J.; LINHARES, A.X. **Developmental rate of immatures of two fly species of forensic importance: *Sarcophaga (Liopygia) ruficornis* and *Microcerella halli* (Diptera: Sarcophagidae).** Paras. Res. 2014. 113: 217-222.

**NEB.** New England BioLabs. Disponível em: <https://www.neb.com/> Acesso em: 01/02/2016

NELSON, L.A.; WALLMAN, J.F.; DOWTON, M. **Using COI barcodes to identify forensically and medically important blowflies.** *Med Vet Entomol.* 2007. 21:44–52

NICHOLL, D.S.T. **An Introduction to Genetic Engineering.** 3ª Ed. Cambridge University Press. 2008.

NUNES, H.R. **Levantamento de dípteros de interesse forense nas dunas do Rio Vermelho, Florianópolis, SC.** 55f. Monografia (TCC em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Santa Catarina. 2014.

OLIVEIRA-COSTA, J. A entomologia forense e suas aplicações. In: **Entomologia Forense-Quando os insetos são os vestígios.** Campinas-SP: Editora Millenium, 2008. Cap.3, p. 39-50.

OLIVEIRA-COSTA, J.; MELLO-PATIU, C.A. **Application of Forensic Entomology to estimate of the postmortem interval (PMI) in homicide investigations by the Rio de Janeiro Police Department in Brazil.** *Aggrawal's Internet Journal of Forensic Medicine and Toxicology.* 2004. 5(1) : 40- 44.

OLIVEIRA-COSTA, J.; MELLO-PATIU, C.A.; LOPES, S.M. **Dípteros muscóides associados com cadáveres Humanos no Local da Morte, no Estado do Rio de Janeiro, Brasil.** *Bol. Mus. Nac. N.S. Zoologia.* 2001. 464: 1-6.

PAPE, T. & DAHLEM, G.A. 2010. Sarcophagidae. In: Brown, B.V., Borkent, A., Cumming, J.M., Wood, D.M., Woodley, N.E. & Zumbado, M. (eds), **A Manual of Central American Diptera. Vol. 2.** NRC Research Press, Ottawa, pp. 1313–1335.

PAPE, T.; BLAGODEROV, V.; MOSTOVSKI, M.B. **Order Diptera Linnaeus, 1758.** *Zootaxa.* Magnolia Press. 2011.

PAPE, T., DAHLEM, G., MELLO PATIU, C.A. DE & GIROUX, M. (2012). **The World of Flesh Flies (Diptera: Sarcophagidae).** Disponível em:[http://www.zmuc.dk/entoweb/sarcoweb/sarcweb/Sarc\\_web.htm](http://www.zmuc.dk/entoweb/sarcoweb/sarcweb/Sarc_web.htm)  
Acesso em: 10/02/2016.

PESSÔA, S.B. **Oscar Freire, como Entomologista.** Revista de Medicina. 1940. disponível em : <http://www.revistas.usp.br/revistadc/article/viewFile/50620/54733>  
Acesso em: 29/04/2016.

PESSÔA, S. LANE, F. **Coleópteros de interesse médico-legal. Ensaio monográfico sobre a família Scarabaeidae de S. Paulo e regiões vizinhas.** Arquivos de Zoologia do Estado de São Paulo. 1941. 2: 389–504.

PINHEIRO, D. S. ; SILVA-REIS, A.A. ; JESUÍNO, R.S.A. ; SILVA, H.M.V. **Variáveis na estimativa do intervalo pós-morte por métodos de entomologia forense.** Enciclopédia Biosféra. 2012. v. 8. n.14. 1442-1458.

PIWCZYŃSKI, M; SZPILA, K.; GRZYWACZ, A. PAPE, T. **A large-scale molecular phylogeny of flesh flies (Diptera: Sarcophagidae).** Systematic Entomology. 2014. 39: 783-799. DOI: 10.1111/syen.12086

PUJOL-LUZ, J.R.; ARANTES, L.C.; CONSTANTINO, R. **Cem anos da Entomologia Forense no Brasil (1908-2008).** Rev. Bras. Entomol. 2008. 52(4): 485-492.

RASMUSSEN, H.B. **Restriction Frangment Length Polymorphism Analysis of PCR-Amplified Fragments (PCR-RFLP) and Gel Electrophoresis- Valuable Tool for Genotyping and Genetic Fingerprinying.** Gel Electrophoresis - Principles and Basics, Dr. Sameh Magdeldin (Ed.). 2012. InTech, DOI: 10.5772/37724. Available from: <http://www.intechopen.com/books/gel-electrophoresis-principles-and-basics/restriction-fragment-length-polymorphism-analysis-of-pcr-amplified-fragments-pcr-rflp-and-related-te> acesso em: 12/01/2016.

RATCLIFFE, S. T.; WEBB, D.W.; WEINZIEVR, R.A.; ROBERTSON, H.M. **PCR-RFLP identification of Diptera (Calliphoridae, Muscidae and Sarcophagidae) A Generally Applicable Method.** J. Foren. Sci. 2003. 48(4):783-785.

RICHARDS, E.N.; GOFF, M.L. **Arthropod Succession on Exposed Carrion in Three Contrasting Tropical Habitats on Hawaii Island,**

**Hawaii.** J. of Medical Entomology. 1997. 34 (3) : 328-339.

**RODRIGUES, E.L. Análises estruturais e evolutivas de uma região do gene COI do DNAmT de espécies de moscas saprófagas da família Sarcophagidae e perspectivas para a identificação taxonômica.** 51f. Dissertação (Mestrado em Diversidade Biológica e Conservação). Universidade Federal de São Carlos. Sorocaba. 2011.

**ROSA, T.A. Artropodofauna de interesse forense no cerrado do Município de Uberlândia, MG: Abundância relativa, diversidade e sucessão.** Dissertação (Mestrado em Imunologia e Parasitologia Aplicadas). Universidade Federal de Uberlândia. 2007.

**ROSA, T.A.; BABATA, M.L.Y.; SOUZA, C.M.; SOUSA, D.; MELLO-PATIU, C.A.; VAZ-DE-MELLO, F.Z.; MENDES, J. Arthropods associated with pig carrion in two vegetation profiles of Cerrado in the State of Minas Gerais, Brazil.** Rev. Bras. de Entomologia. 2011. 55(3). 424-434.

**SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1977. 74(12): 5463-5467.

**SCHROEDER, H.; KLOTZBACH, H.; ELIAS, S.; AUGUSTIN, C.; PUESCHEL, K. Use of PCR-RFLP for differentiation of calliphorid larvae (Diptera, Calliphoridae) on human corpses.** For. Sci. International. 2003. 132: 76-81.

**SHAHRIAR, M.; HAQUE, M.R.; KABIR, S.; DEWAN, I.; BHUYIAN, M.A. Effect of Proteinase-K on Genomic DNA extraction from Gram-Positive Strains.** S. J. Pharm. Sci. 2011. 4(1): 53-57.

**SHANNON, R. Methods for collecting and feeding mosquitos in jungle yellow fever studies.** Amer J Trop Med Hyg. 1939. 19: 131-148.

**SHEWELL, G.E.. 1987. Sarcophagidae.** In: MCALPINE, J.F., PETERSON, B.V., SHEWELL, G.E., TESKEY, H.J., VOCKEROTH, J.R., WOOD, D.M. (Eds.), **Manual of Nearctic Diptera, vol. 2.** Monograph 108, Research Branch, Agriculture Canada, Ottawa.

SIGNOR, P.W. **The geological history of diversity.** Annual Review of Ecology and Systematics. 1990. 21 : 509-539.

SOUZA, A.M.; LINHARES, A.X. **Diptera and Coleoptera of potential forensic importance in southeastern Brazil: relative abundance and seasonality.** Medical and Veterinary Entomology. 1997. 11 : 8-12.

SPERLING, F.A.H.; ANDERSON, G.S.; HICKEY, D.A. **A DNA-Based Approach to the identification of Insect Species Used for Postmortem Interval Estimation.** J. Foren. Sci. Int. 1994. 39: 418-427.

TAN, S.H.; RIZMAN-IDID, M.; MOHD-ARIS, E.; KURAHASHI, H.; MOHAMED, Z. **DNA-based characterisation and classification of forensically importante flesh flies (Diptera: Sarcophagidae) in Malaysia.** Forens. Scien. Intern. 2010. 199:43-49.

**THE NOBEL PRIZE IN CHEMISTRY.** 1980. Nobelprize.org. Nobel Media AB 2014. Web. 2 May 2016. <[http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/1980/](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1980/)> Acesso em: 01/04/2016.

**THE NOBEL PRIZE IN PHYSIOLOGY OR MEDICINE.** 1978. Nobelprize.org. Nobel Media AB 2014. Web. 2 May 2016. <[http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/1978/](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1978/)> Acesso em: 01/04/2016

THYSSEN, P.J.; LESSINGER, A.C.; AZEREDO-ESOIN, A.M.L.; LINHARES, A.X. **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. 2005. 34(5): 777-783.

TORRES, L.M. **Levantamento de Fauna Díptera de Interesse Forense em Carcaça de Suíno em Ambiente de Restinga Arbórea em Florianópolis, Santa Catarina.** 65f. Monografia (TCC em Licenciatura em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Santa Catarina. 2016.

TZ'U, S. **The Washing away of wrongs**. 1854. Traduzido por MCKNIGHT, B.E. Science, Medicine & Tecnology in East Asia. Capítulo 1. 1981.

VAIRO, K.P.; MELLO-PATIU, C.A.; CARVALHO, C.J.B. **Pictorial identification key for species of Sarcophagidae (Diptera) of potential forensic importance in Southern Brazil**. Rev. Bras. Entomol. 2011. 55(3): 333-347.

VAIRO, K.P.; MOURA, M.O.; MELLO-PATTIU, C.A. **Comparative morphology and identification key for females of nine Sarcophagidae species (Diptera) with forensic importance in Southern Brazil**. Rev. Bras. Entomol. 2015. 59: 177-187.

VASCONCELOS, S.D. ; ARAUJO, M.C.S. **Necrophagous species of Diptera and Coleoptera in northeastern Brazil : state of the art and challenges for the Forensic Entomologist**. Rev. Bras. Entomologia. 2012. 56(1) : 7-14.

WELLS, J.D.; PAPE, T.; SPERLING. F.A.H. **DNA-based identification and molecular systematics of forensically importante Sarcophagidae (Diptera)**. J Forensic Sci. 2001. 46(5):1098–1102.

WOLF, C.; RENTSCH, J.; HÜBNER, P. **PCR-RFLP Analysis of Mitochondrial DNA: A Reliable Method for Species Identification**. J. Agric. Food Chem. 1999. 47: 1350-1355.

ZEHNERM R.; AMENDT, J.; SCHÜTT, S.; SAUER, J.; KRETTEK, R.; OIVILNY, D. **Genetic Identification of forensically importante flesh flies (Diptera: Sarcophagidae)**. Int. J. Legal Med. 2004. 118: 245-247.

ZHANG, C.; FU, X.; ZHU, Z.; XIE, K.; GUO, Y. **The complete mitochondrial genome sequence of Helicophagella melanura (Diptera: Sarcophagidae)**. Mitochondrial DNA, pp 1- 2, 2014. DOI: 10.3109/19401736.2014.987258

ZIMMER, P.D.; MALONE, G.; CARVALHO, F.I.F.; BARBOSA-NETO, J.F.; OLIVEIRA, A.C. **Iniciativas Genômicas: Aplicações da**

**ciência genômica no melhoramento de plantas para as regiões de várzea do sul do Brasil.** Rev. Biotec. Ciência e Desenvolvimento. 2003. 31: 45-52.