



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal

DESENVOLVIMENTO E METAMORFOSE DE 15 FAMÍLIAS DE DIPTERA
BRACHYCERA (HEXAPODA, INSECTA)

Karine Brenda Barros Cordeiro

Orientadora: Prof. Dra. Sônia Nair Bão

Brasília – DF
Dezembro de 2018

Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal

**Desenvolvimento e Metamorfose de 15 famílias de
Diptera Brachycera (Hexapoda, Insecta)**

Karine Brenda Barros Cordeiro

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biologia Animal.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Sônia Nair Bão

Brasília, dezembro de 2018

Ao meu filho Heitor, a minha mãe Suely e aos meus avós (*in memoriam*) Andreino e Guilhermina, meu eterno respeito e carinho.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

A minha mãe Suely Barros por todo apoio, incentivo e por seu amor incondicional.

A Profa. Dra. Sônia Nair Bão, pela orientação, paciência, compreensão e pelos conselhos, sempre valiosos!

Ao Prof. Dr. José Roberto Pujol Luz, por me oferecer mais que uma colaboração, me presenteou com amizade e carinho, obrigada!

Ao Prof. Dr. Luciano Paulino Silva pela valiosa contribuição no trabalho.

Ao Prof. Dr. Victor Py-Daniel pela amizade e conselhos.

Aos meus grandes amigos: Érica, Welinton, Shaiane e Ingrid, obrigada! Esse trabalho não seria possível sem o auxílio e contribuição de vocês.

Aos meus amigos e companheiros de luta (Isabela, Bárbara, Marina, Lira, Bruna, Ana Brígida, Lara, Louise, Valeska, Gabriela, Thiago, Pedro, André).

A todos os colegas do Laboratório de Microscopia Eletrônica e do Laboratório de Entomologia-Diptera da UnB. Agradeço pela paciência, convivência, pelos conselhos, aprendizados e claro, pelos momentos de “ócio criativo”. Cada um de vocês têm parte nesse trabalho.

A todos os funcionários da UnB que contribuíram de modo direto ou indireto para a realização deste trabalho.

Aos amigos que de modo direto ou indireto sofreram com minha ausência, com minhas queixas, mas sempre estiveram prontos para me oferecer apoio.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) pela oportunidade de estágio no laboratório de Nanobiotecnologia.

A CAPES e CNPq pela concessão da bolsa e as agências de fomento: CAPES, CNPq, FAP/DF, FINEP.

*“Se enxerguei mais longe, foi porque me
apoei nos ombros de gigantes”.*

Isaac Newton

Os insetos holometábolos são aqueles que sofrem metamorfose completa, ou seja, possuem uma fase de pupa. Eles representam cerca de 80 % da diversidade de insetos no mundo. A fase de pupa não ocorre nos indivíduos ametábolos e hemimetábolos que são, respectivamente, aqueles onde não ocorre metamorfose ou a onde a metamorfose é parcial. A fase de pupa é associada a uma maior vantagem na utilização do recurso alimentar e de habitat, isso por que nos holometábolos cada fase de vida ocupa um nicho diferente das demais fases. A pupa da mosca é envolvida pelo pupário que é uma estrutura rígida, onde é geralmente formado pelo tegumento do último instar larval. O pupário apresenta características específicas diferentes das fases de larva e adulto. Dentro da pupa é possível distinguir pelo menos quatro eventos contínuos, eles são chamados de: i) apólise larva-pupa, ii) pupa criptocefálica, iii) pupa fanerocefálica e iv) adulto formado. Nos insetos os ciclos de muda da larva, a formação e o desenvolvimento da pupa são regulados pelo sistema endócrino. No processo de sinalização para dar início a fase de pupa dois genes se destacam o Br e o E93, fundamentais nos processos de pupariação e pupação. O objetivo desse trabalho foi descrever o processo de metamorfose para seis espécies de Diptera e avaliar a expressão quantitativa de genes responsáveis por esse processo (Br e E93). Além de analisar a morfologia dos pupários e avaliar seu potencial uso em chaves de identificação e estudos filogenéticos. Para isso, seis espécies de moscas foram coletadas, identificadas e criadas em laboratório; o desenvolvimento intra-pupário foi avaliado por meio de fixação de pupas em intervalos regulares de tempo; as análises morfológicas foram realizadas com auxílio das microscopias de luz, de força atômica e de varredura; os genes Br e E93 foram usados como marcadores temporais da idade da pupa por meio da PCR quantitativa. Os pupários apresentaram características, ultra e nanoestruturais diferentes entre as espécies analisadas; o desenvolvimento intra-pupário possui sete etapas definidas e espécies distintas responderam de forma diferente a mesma temperatura; a quantificação dos genes Br e E93 permitiu associar sua presença a idade da pupa, e em que etapa do desenvolvimento eles são mais expressivos.

PALAVRAS-CHAVE: Entomologia Forense, Holometábolos, Moscas, Nanoestrutura, Pupa.

Holometábolos insects are those that undergo complete metamorphosis that is they have a pupal phase. They account for about 80% of the diversity of insects in the world. The pupa phase does not occur in the ametábolos and hemimetábolos individuals that are, respectively, those where metamorphosis does not occur or where metamorphosis is partial. The pupae stage is associated with a greater advantage in the use of the food and habitat resources, because in the holometábolos each phase of life occupies a niche different from the other phases. The pupa of the fly is surrounded by the puparium that is a rigid structure, where it is usually formed by integument of the last larval instar. The Puparium presents specific characteristics different from the phases of larva and adult. Inside the pupa it is possible to distinguish at least four continuous events, they are entitled: (i) larva-pupal apolysis, (ii) cryptocephalic pupa, (iii) phanerocephalic pupae and (iv) adult pharate. In insects the larval moulting cycles, the formation and development of the pupa are regulated by the endocrine system. In the signalling process to initiate the pupal phase two genes stand out Br and E93 they are fundamental in the process of pupariation and pupation. The objective of this work was to describe the metamorphosis process for six species of Diptera and to estimate the quantitative expression of genes responsible for this process (Br and E93). Also to analysed the morphology of the puparia and to evaluate their potential use in identification keys and phylogenetic studies. Was studied six species of flies: were collected, identified and created in the laboratory; intra-puparial development was studied by fixing pupae at regular intervals of time; the morphological analyses were performed with the support of light microscopy, atomic force microscopy and scanning electron microscopy; the genes Br and E93 were used as temporal markers of pupal age by means of quantitative PCR. The puparia presented characteristics ultra and nanostructural different among the analysed species; intra-puparial development has seven defined stages and distinct species responded differently to the same stimulus; the quantification of the Br and E93 genes allowed to associate their presence with the age of the pupa, and at what stage of development they are more expressive.

KEY-WORDS: Flies, Forensic Entomology, Holometábolos, Nanostructure, Pupa.

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xi
ABREVIATURAS E SIGLAS	xii
INTRODUÇÃO GERAL	14
METAMORFOSE NOS INSETOS	14
TERMINOLOGIA	16
AS MOSCAS	17
DESENVOLVIMENTO	18
JUSTIFICATIVA	20
OBJETIVOS	21
ESQUEMAS E ORGANIZAÇÃO	22
MATERIAL E MÉTODOS GERAIS: COLETA E CRIAÇÃO	24
MATERIAIS E MÉTODOS	25
RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
CAPÍTULO 1: PROCESSO DE PUPARIAÇÃO E PUPÁRIO	31
MATERIAIS E MÉTODOS	32
RESULTADOS	35
DISCUSSÃO	45
CAPÍTULO 2: DESENVOLVIMENTO INTRA-PUPÁRIO	49
MATERIAIS E MÉTODOS	50
RESULTADOS	51
DISCUSSÃO	71
CAPÍTULO 3: GENES PROMOTORES DA METAMORFOSE	75
MATERIAIS E MÉTODOS	77
RESULTADOS	79
DISCUSSÃO	81
CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	82
GLOSSÁRIO	84
REFERÊNCIAS	86

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Esquema do desenvolvimento intra-pupário em Diptera.	16
Figura 2. Anagrama representando as famílias envolvidas nos capítulos	22
Figura 3. Anagrama sobre a organização da tese e os temas abordados	23
Figura 4. Esquema para as microscopias utilizadas na tese	23
Figura 5. Coleta e criação de Diptera.	27
Figura 1.1. Microscopia eletrônica de varredura dos pupários de Diptera e linhas de clivagem.	37
Figura 1.2. Microscopia eletrônica de varredura dos pupários de Diptera, em detalhes da superfície.	39
Figura 1.3. Ultraestrutura dos pupários de Diptera.	40
Figura 1.4. Nanorrugosidade da superfície dos pupários de Diptera, obtida por meio de microscopia de força atômica.	41
Figura 1.5. Parâmetros de espectroscopia de força, propriedades mecânicas, da superfície dos pupários de Diptera, obtida por meio de microscopia de força atômica.	42
Figura 1.6. Dendrogramas: apresentam a relação fenética entre as espécies de Diptera, usando parâmetros de espectroscopia de força, propriedades mecânicas, da superfície dos pupários.	43
Figura 1.7. Dendrogramas: apresentam a relação fenética entre as espécies de Diptera, usando a nanorrugosidade da superfície dos pupários de Diptera, obtida por meio de microscopia de força atômica.	44
Figura 2.1. Imagens obtidas com microscopia de luz (estereomicroscópio). Sequência morfológica do desenvolvimento intra-pupal de <i>Piophila casei</i> .	62
Figura 2.2. Imagens obtidas com microscopia de luz (estereomicroscópio). Sequência morfológica do desenvolvimento intra-pupário de <i>Musca domestica</i> .	63
Figura 2.3. Microscopia eletrônica de varredura do desenvolvimento intra-pupário em Diptera.	64
Figura 2.4. Microscopia eletrônica de varredura do desenvolvimento intra-pupário de <i>Musca domestica</i> .	65
Figura 2.5. Imagens obtidas com microscopia de luz (estereomicroscópio). Adulto farado de <i>Piophila casei</i> , desenvolvimento dos olhos compostos.	66
Figura 6. Microscopia eletrônica de varredura dos olhos compostos/omatídeos de <i>Musca domestica</i> .	66
Figura 2.7. Imagens obtidas com microscopia de luz (estereomicroscópio). Desenvolvimento intra-pupário de <i>Hermetia illucens</i> .	67
Figura 2.8. Imagens obtidas com microscopia de luz (estereomicroscópio). Adulto farado de <i>Hermetia illucens</i> .	68

Figura 2.9. Imagens obtidas com microscopia de luz (estereomicroscópio). Morfologia dos cornos respiratórios de <i>Hermetia illucens</i> .	69
Figura 2.10. Gráfico comparativo do tempo de desenvolvimento intra-pupário, % em horas, para as espécies estudadas e conhecidas.	70
Figura 3.1. Resultados da qPCR para as diferentes etapas do desenvolvimento intra-pupário de <i>Drosophila melanogaster</i> .	80

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Lista das espécies coletadas e criadas sob condições controladas de laboratório.	28
Tabela 2.1. Tempo desenvolvimento intra-pupário para seis espécies de Diptera, mínimo em horas (h), para cada etapa do desenvolvimento.	56
Tabela 2.2. Tempo mínimo, em horas, do desenvolvimento intra-pupário de seis espécies de Diptera e a sua porcentagem em relação ao tempo total mínimo do desenvolvimento na fase de pupa.	59
Tabela 2.3. Comparação do tempo mínimo, em horas, para cada evento do desenvolvimento intra-pupário.	60
Tabela 3.1. Sequência de primers usados no estudo	79
Tabela 3.2. Resultados da qPCR para as diferentes etapas do desenvolvimento intra-pupário de <i>Drosophila melanogaster</i> .	80

ABREVIATURAS E SIGLAS

ΔCt	Quantificação do gene alvo
20E	Ecdiesteroides 20-hydroxyecdysone
2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
BOD	(Biochemical Oxygen Demand) câmara de germinação/criação
Br	Broad (Br: broad-complex- Br-C)
CEDZoo	Coleção Entomológica do Departamento de Zoologia-UnB
Detach force	Adesão
Dm1	Pré-pupa de <i>Drosophila melanogaster</i>
Dm2	Pupa hora zero de <i>Drosophila melanogaster</i>
Dm3	Pupa critocefálica/fanerocefálica de <i>Drosophila melanogaster</i>
Dm4	Farado de olhos amarelos de <i>Drosophila melanogaster</i>
Dm5	Farado de olhos vermelhos de <i>Drosophila melanogaster</i>
E93	Early Ecdysone Response Gene
ECR	Ecdysone receptor
Eeb	Estação Experimental do Instituto De Ciências Biológicas Da UnB
Fal	Fazenda Água Limpa - UnB
IPM	Intervalo Pós-Morte
JH	Hormônio Juvenil
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MFA	Microscopia de Força Atômica
ML	Microscopia de Luz
mm	Milímetro
N	Newton
nm	Nanômetro
nN	Nanonewton
Oc	Olhos compostos
Pa	Pascal
Ptth	Neuropeptídeo protoracicotrópico
qPCR	Reação em cadeia da polimerase-quantitativa
Ra	Rugosidade média
RNA	Ácido ribonucleico
RNAi	RNA de interferência
Rq	Raiz quadrada da rugosidade média
Rz	Distância média entre picos e vales
Rzjis	Distância entra a linha média e os 10 picos mais altos
Se	Erro padrão
Snap inn	Atração entre a ponteira e a amostra
UnB	Universidade de Brasília
UR	Umidade Relativa

Usp	Ultraspiracle
Youngs modulo	Elasticidade
μm	Micrômetro
μl	Microlitro

Metamorfose nos Insetos

Insetos e outros artrópodes desenvolveram diferentes estratégias para chegar à fase adulta. O tipo ou o processo de desenvolvimento, de cada espécie, foi organizado em três grupos principais: I) o primeiro grupo, o dos ametábolos (Apterygota), não sofrem metamorfose, ou seja, a fase jovem não difere, de forma acentuada, da morfologia externa da fase adulta; II) o segundo grupo, o dos hemimetábolos (Exopterygota), passam por metamorfose incompleta - a fase jovem se difere da fase adulta por não apresentar asas funcionais e pelo desenvolvimento incompleto dos órgãos sexuais; III) o terceiro grupo, o dos holometábolos (Endopterygota), representa a maioria dos insetos em diversidade no mundo (Kristensen, 1991). E é formado pelas quatro maiores ordens de insetos: Coleoptera, Lepidoptera, Hymenoptera e Diptera. Todos passam por metamorfose completa, ou seja, há presença de pupa (Grimaldi & Engel, 2005; Costa et al., 2006). A distinção entre as fases de vida desse grupo permitiu que larvas e adultos explorassem habitats e alimentos distintos, o que reduz a competição pelo mesmo recurso (Truman & Riddiford, 1999, 2002).

Metamorfose é uma palavra de origem grega que quer dizer transformação *μετα* (meta = mudar) + *μορφή* (morfo = forma) = *μεταμόρφωσις* (*metamórphosis*), mudança de forma (Watts, 1997). A metamorfose surgiu nos insetos há cerca de 300

milhões de anos (Kukalova-Peck, 1991). E pode ser caracterizada por ser um processo de proliferação celular, reorganização e modelagem de tecidos e pela migração e morte programada de algumas células (White *et al.*, 1999; Zehner *et al.*, 2009).

Nos holometábolos, a mudança completa de forma permitiu, com o auxílio de mecanismos endocrinológicos, várias modificações e adaptações que levaram ao surgimento de várias espécies (Hinton, 1963; Sehnal *et al.*, 1996). A “*pupa é o principal caráter dos Holometábolos sendo para eles um estágio sui generis”* (Costa, 1984). É um grupo de insetos monofilético, que possuem como característica principal a metamorfose completa, a presença da pupa (Costa, 1984).

Assim, a fase ímpar desse grupo é a fase de pupa. Ela ocorre após o desenvolvimento embrionário e é uma fase intermediária entre as fases de larva e do adulto (Fraenkel & Bhaskaran, 1973; Denlinger & Ždárek, 1994; Barros-Cordeiro, *et al.*, 2016; Kanti-Sinha & Mahato, 2016; Fukutomi *et al.*, 2017; Salazar-Souza *et al.*, 2018). A pupa é marcada por um processo que pode ser dividido em três etapas principais: histólise, histogênese e diferenciação (Agrel & Lundquis, 1973; Barros-Cordeiro, *et al.*, 2016; Salazar-Souza *et al.*, 2018), que é de fato o desenvolvimento intra-pupário, ou seja, ocorre dentro do pupário (estrutura que envolve a pupa).

A pupa possui características próprias, cuja origem e função ainda não foram bem esclarecidas. Todavia, duas teorias se destacam: i) a primeira diz que não existe “homologia” entre a fase de ninfa e a fase de larva, sendo a larva uma versão prematura do desenvolvimento embrionário, e que, a pupa corresponderia a um instar da ninfa (Truman & Riddiford, 1999); ii) a segunda diz que a fase de larva é equivalente a fase de ninfa e que a pupa corresponderia ao último instar ninfal (Hinton, 1958; 1963; Sehnal *et al.*, 1996).

Embora a teoria mais utilizada refira-se à equivalência entre a fase de larva e a fase de ninfa, estudos com foco em embriologia e endocrinologia de insetos (Truman & Riddiford, 1999) apontaram que a teoria de Berlese (1913), parece ser a mais provável. Segundo ele, as larvas seriam embriões precoces e a pupa equivaleria a soma dos instares ninfais dos Exopterygota (Costa, 1984; Truman & Riddiford, 1999).

Nos insetos os ciclos de muda e a formação da pupa e adulto são regulados pelo sistema endócrino. Durante o processo de desenvolvimento larvas e ninfas requerem a ação de hormônios para passar da fase jovem para a fase adulta, destacam-

se o hormônio juvenil (JH) e a ecdisona (Imms, 1957; Novák, 1975; Costa *et al.*, 2008).

Terminologia adotada para as etapas do desenvolvimento

O processo que dá origem ao adulto é a pupação, e ela corresponde a três etapas sequenciais chamadas de: i) pupa criptocefálica: é o “marco” do desenvolvimento e ocorre após a apólise larva-pupa (histólise), nessa etapa a pupa não possui forma; ii) pupa fanerocefálica (histogênese): é o processo onde se observa a extroversão da capsula cefálica e dos apêndices torácicos - pernas e asas; e iii) adulto farado (maturação e diferenciação): corresponde a maior parte do tempo da fase de pupa, essa etapa possui desde seu início a forma “básica” do adulto, e no final do desenvolvimento o Imago/adulto formado (Figura 1) (Fraenkel & Bhaskaran, 1973; Pujol-Luz & Barros-Cordeiro, 2012; Barros-Cordeiro *et al.*, 2016).

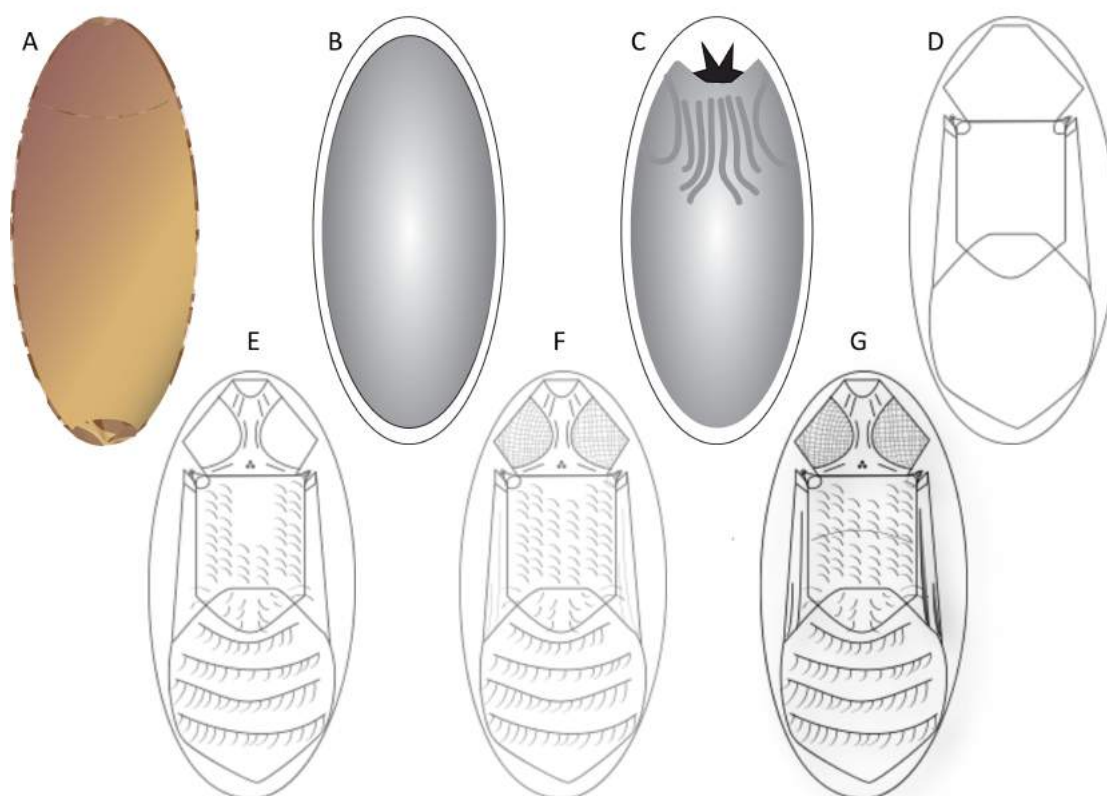


Figura 1. Esquema do desenvolvimento intra-pupário em Diptera. (A) Pupário; (B) pupa criptocefálica; (C) pupa fanerocefálica; (A-G) adulto farado de olhos compostos (D) transparente-omatídeo menos desenvolvido, (E) amarelo, (F) rosa e (G) vermelho-omatídeo mais desenvolvido.

As moscas em um contexto geral

Diptera pertence ao grupo dos insetos holometábolos e é a quarta ordem em diversidade de insetos no mundo, com cerca de 160.000 espécies descritas, um em cada 10 animais descritos é uma mosca (Pape, 2011). Desse total, 31.000 espécies são encontradas na região Neotropical (Amorim *et al.*, 2002; Amorim, 2009). As moscas são tão numerosas quanto diversas podendo ser encontradas em vários habitats e se alimentarem de uma grande variedade de recursos (Skevington & Dang, 2002).

A maioria das moscas são sarcosaprófagos, ou seja, podem se alimentar de uma grande variedade de substratos em decomposição (Teskey, 1976; Skevington & Dang, 2002). Por causa, do seu hábito alimentar, muitas espécies de moscas podem ser encontradas em fezes, depósitos de lixo urbano, fossas sépticas e carcaças de animais em decomposição (Greenberg, 1971; Queiroz & Carvalho, 1987).

Embora possam apresentar um comportamento alimentar generalista, muitas espécies de várias famílias, como Calliphoridae e Sarcophagidae, são essencialmente necrófagos e estão entre os principais insetos associados a decomposição de carcaças, sendo os responsáveis por desarticular e consumir grande parte da sua biomassa (Greenberg & Kunich, 2002; Skevington & Dang, 2002; Bernhardt *et al.*, 2016).

Devido ao seu comportamento alimentar, Diptera desperta interesse para diferentes áreas do conhecimento, como:

i) para o controle biológico de pragas, que busca encontrar soluções para reduzir e ou eliminar o uso indiscriminado de inseticidas e a incidência de insetos que trazem prejuízos econômicos (Skevington & Dang, 2002).

ii) para a saúde pública por serem vetores mecânicos de patógenos como a *Giardia*, *Echerichia coli* e *Staphylococcus aureus* (Greenberg, 1973; Maldonado & Centeno, 2003). Além disso, algumas espécies podem causar miíases, que são lesões provocadas pela ação de larvas histiófagas, popularmente conhecidas por “bicheiras” (Zumpt, 1965; Greenberg, 1973; Guimarães & Papavero, 1999, Maldonado & Centeno, 2003). Ao se alimentarem do tecido vivo ou morto de animais vivos, instalando um quadro de miíase, os califorídeos ganham importância para a medicina veterinária e para a economia, visto que essas lesões acometem tanto o homem como animais domésticos e selvagens. Esse tipo de lesão, possibilita a instalação de infecções causadas por outros agentes patológicos e que podem vir a causar danos irreparáveis no couro dos animais, nas produções de leite e carne (Zumpt, 1965; Greenberg, 1973; Guimarães & Papavero, 1999; Maldonado & Centeno, 2003).

iii) para a ciência forense: devido a necessidade de se alimentarem de substratos ricos em proteína animal e por permanecerem nele por mais de uma geração e estágio de decomposição, as moscas possibilitam uma estimativa de intervalo de morte em casos de crimes contra a pessoa (Catts & Goff, 1992; Greenberg & Kunich, 2002; Pujol- Luz *et al.*, 2006, 2008; Barros-Cordeiro, *et al.*, 2014, 2016).

Calliphoridae, Sarcophagidae, Phoridae, Muscidae, Stratiomyidae e Faniidae são comumente documentados como: as moscas que mais frequentemente estão associadas a cadáveres humanos; e que chegam nos estágios iniciais da decomposição (Wells & Sperling 2001; Dadour *et al.* 2001; Oliveira-Costa, 2013; Sanit *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2018).

Embora seja extremamente importante reconhecer a espécie encontrada no cadáver, a sua identificação com base em dados morfológica nos estágios imaturos é, na maioria das vezes, impossível por falta de informação sobre a espécie (Wells & Stevens, 2008; Oliveira-Costa, 2013; Silva *et al.*, 2018; Zajac *et al.*, 2018). Por isso, muitos peritos forense e pesquisadores optam por manter a criação do (s) espécime (s) em laboratório até que alcancem a fase adulta, fase em que é mais fácil a sua identificação (Amendt *et al.* 2004; Oliveira-Costa, 2013). Todavia, em muitos casos a identificação rápida da espécie encontrada no cadáver é fundamental para uma investigação judicial, não havendo tempo hábil para sua criação até a fase adulta (Litjens *et al.* 2001; Schroeder *et al.* 2003; Zajac *et al.*, 2018).

A identificação das espécies na fase de pupa é uma tarefa difícil por serem muito semelhantes morfológicamente e pela falta de informação detalhada sobre o pupário. Informações existentes sobre a morfologia, para a maioria das moscas são poucas e estão concentradas no terceiro instar larval (*e.g.* Greenberg & Sziska, 1984; Florez & Wolff, 2009; Sanit *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2018).

Desenvolvimento pós-embrinário em Diptera

Assim como ocorre nas fases de ovo e de larva, a fase de pupa sofre influência da temperatura no tempo total de desenvolvimento. Temperaturas mais elevadas tendem a acelerar o desenvolvimento e temperaturas mais baixas tendem a retardar o final do desenvolvimento (Barros-Cordeiro & Pujol-Luz, 2010; Bernhardt *et al.*, 2016; Salazar-Souza *et al.*, 2018). Além disso, a fase de pupa depende diretamente da ingestão calórica adquirida durante a fase de larva, que é o principal período que o

recurso alimentar pode ser limitante (Cunha-e-Silva & Milward-de-Azevedo, 1994; Paes *et al.* 2001; Gomes & Von Zuben; 2004; Bernhardt *et al.*, 2016).

Para completar o ciclo de desenvolvimento e gerar adultos viáveis é necessário que no processo de pupariação a larva de mosca tenha atingido um peso mínimo, que é singular para cada espécie (Cunha-e-Silva & Milward-de-Azevedo, 1994; Paes *et al.* 2001; Gomes & Von Zuben; 2004). O consumo baixo de calorias influencia no desenvolvimento, pupas de baixo peso possuem desenvolvimento mais lento e algumas vezes a pupa pode sofrer ‘aborto’; que é a morte antes da emergência da mosca adulta. Isso ocorre quando a energia necessária para se completar a pupação é insuficiente (Paes *et al.* 2001; Gomes & Von Zuben; 2004; Bernhardt *et al.*, 2016; Salazar-Souza *et al.*, 2018).

Pupas e pupários são objetos de estudo em diversas áreas da ciência, por exemplo, na evolução são usados para esclarecer questões filogenéticas e taxonômicas. E embora sejam fonte de pesquisa e importantes para áreas como: a economia e a medico-veterinária, pouco se sabe sobre o processo de formação da pupa e de metamorfose.

A identificação rápida e precisa da espécie de mosca, principalmente nas fases imaturas, pode auxiliar em questões judiciais, como nos casos de morte violenta, onde reconhecer a espécie e identificar sua idade pode contribuir para fornecer uma estimativa de intervalo de morte (IPM).

Ademais, a utilização das microscopias de alta resolução tem sido, ultimamente, uma importante ferramenta nas descrições morfológicas de moscas. Com o auxílio da microscopia de força atômica, de varredura e de luz é possível descrever o processo de pupariação e pupação para espécies de mosca; além de fornecer dados sobre a ultra e a nanoestrutura dos pupários.

Já as análises moleculares permitem investigar padrões genéticos, marcadores moleculares e temporais, e são fonte de diferentes tipos de estudos e aplicação. A utilização da PCR quantitativa é uma potencial ferramenta para identificar marcadores genéticos que indiquem a idade da pupa, ou seja, em que etapa do desenvolvimento intra-pupário a mosca está.

OBJETIVO GERAL

- Observar e descrever o processo pupariação e a morfologia do pupário para 15 espécies de moscas. Observar e analisar o processo de pupação para seis espécies de Diptera, e avaliar a expressão quantitativa de genes responsáveis pela metamorfose para uma espécie de mosca.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a ultraestrutura de 15 espécies de Diptera; e observar e descrever, para cinco delas, o processo de pupariação e a nanoestrutura dos pupários. Avaliar seu potencial uso em chaves de identificação filogenética.
- Avaliar e descrever as etapas do desenvolvimento intra-pupário para seis espécies, sendo uma de cada família: Stratiomyidae, Phoridae, Piophilidae, Muscidae, Fannidae e Calliphoridae.
- Analisar a expressão do gene *Broad*, *E93*, *Usp* e *Ptth* em diferentes momentos do desenvolvimento intra-pupário e avaliar se seus perfis de expressão podem ser preditivos da idade da pupa de *Drosophila melanogaster*.

As espécies de cada família foram selecionadas de acordo com: maior distância filogenética, possível; facilidade de coleta do adulto ou imaturo; e possibilidade de criação em laboratório.

As espécies selecionadas foram: Simuliidae; Culicidae [*Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762)]; Stratiomyidae [*Hermetia illucens* (Fabricius, 1775)]; Phoridae [*Megaselia scalaris* (Loew, 1866)]; Syrphidae [*Ornidia obesa* (Fabricius, 1775)]; Tephritidae [*Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830)]; Piophilidae [*Piophila casei* (Linnaeus, 1758)]; Sepsidae [*Archiseopsis discolor* (Bigot, 1857)]; Drosophilidae [*Drosophila melanogaster* (Meigen, 1830)]; Fanniidae [*Fannia pusio* (Wiedemann, 1830)]; Muscidae [*Musca domestica* (Linnaeus, 1758)]; Calliphoridae [*Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) e *Lucilia eximia* (Wiedemann, 1819)]; Sarcophagidae [*Peckia trivittata* (Curran, 1927)]; Cuterebridae [(*Metacuterebra apicalis* (Guérin, 1829))].

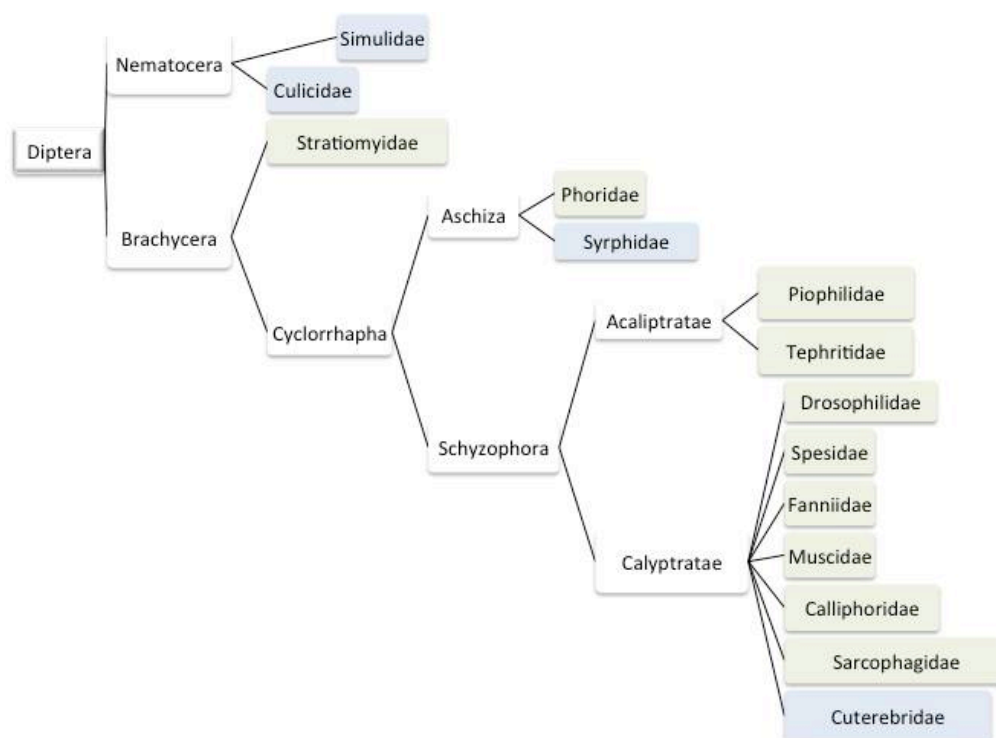


Figura 2. Anagrama representando as famílias envolvidas nos capítulos da tese. Em azul as amostras das espécies foram obtidas da Coleção Entomológica do Departamento de Zoologia da Universidade de Brasília e em verde as espécies que foram coletadas e criadas em laboratório. Anagrama elaborado com referência no Pape (2011).

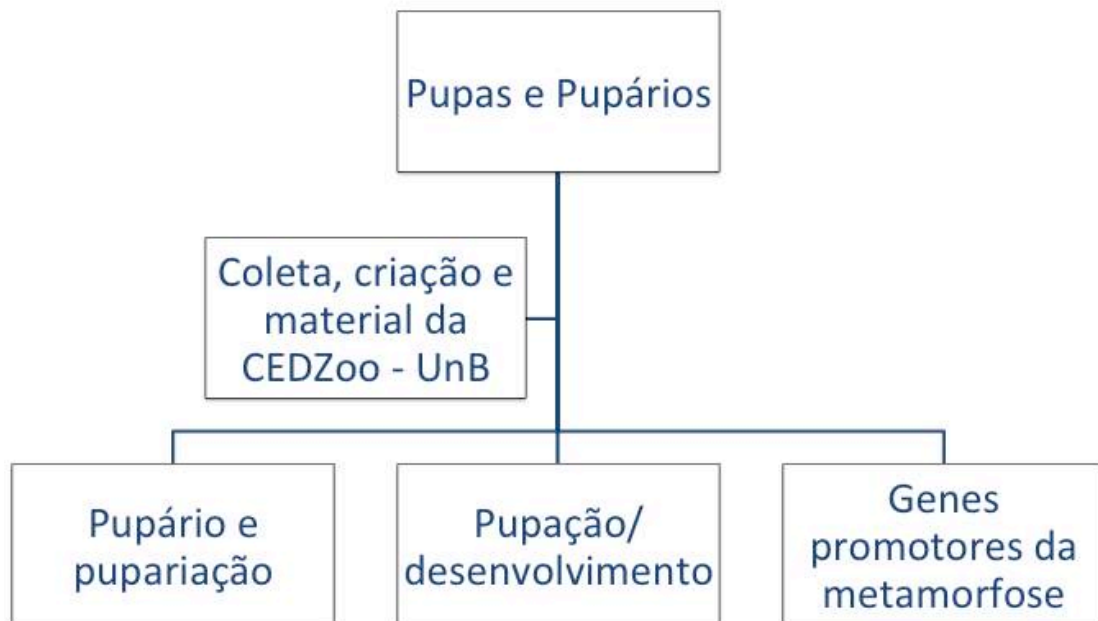


Figura 3. Anagrama sobre a organização da tese e os temas abordados em cada capítulo.

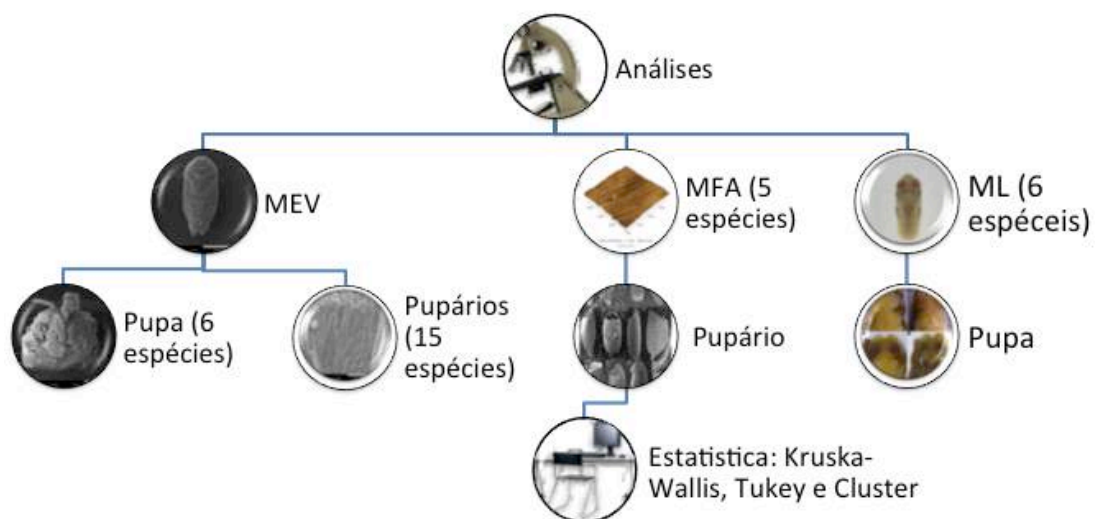


Figura 4. Esquema para as microscopias utilizadas na tese. Legenda: MEV, microscopia eletrônica de varredura; MFA, microscopia de força atômica; ML, microscopia de luz.

MATERIAL E MÉTODOS GERAIS: COLETA E CRIAÇÃO

Os insetos possuem uma relação muito diversa com os outros seres vivos. Eles podem trazer malefícios, como aqueles que causam o parasitismo, os que são vetores de doenças e as pragas agrícolas, mas também podem trazer benefícios, como os que participam da polinização e do processo de decomposição (Skevington & Dang, 2002; Grimaldi & Engel, 2005). As moscas possuem dentre os insetos uma posição de destaque, a cada 10 animais descritos no mundo, um é uma mosca (Wiegmann & Yates, 2007). Diptera é um grupo abundante com representantes em diversos habitats (Skevington & Dang, 2002)

As moscas apresentam hábito alimentar diverso, e por isso, possuem importância em vários setores: como o da economia por causarem doenças, em plantas e animais, inclusive no homem, destacando-se ainda, como vetores de doenças tais como malária, febre amarela e dengue (Greenberg, 1971). Algumas espécies da ordem possuem relação ecológica muito próxima com o homem, seja ela obrigatória ou facultativa. Essa relação é chamada de sinantrópia e está associada com a capacidade que estes insetos tem de se desenvolver usando como recursos as condições criadas pelo homem, como no acúmulo de matéria orgânica (lixo) em área urbana (Nuorteva, 1963, 1971; Ferreira, 1978).

Essa relação de proximidade com o homem é favorecida pelo potencial de dispersão através do voo, pois, as moscas podem alcançar distâncias entre 3,2 - 6,4 km desde o ponto de origem até encontrar seu alvo, que pode ser um recurso alimentar (Mello *et al.* 2004). Assim, as técnicas de coleta em meio urbano permitem a identificação das espécies que possuem relevância por serem vetores e ou causadores de doenças ao homem e a outros animais; a criação das espécies em laboratório permite uma melhor compreensão da sua biologia de desenvolvimento além de fornecer material e dados que auxiliem no seu controle populacional.

MATERIAL E MÉTODOS

I) Local de coleta: As coletas foram realizadas: i) na Fazenda Água Limpa (FAL) da Universidade de Brasília (UnB) (15°56'54.89"S; 47°56'02.18"O); ii) na Estação Experimental do Instituto de Ciências Biológicas da UnB (EEB); iii) no campus Darcy Ribeiro (Fig. 5A); iv) e na Colônia Agrícola Cana do Reino (Taguatinga-DF) (S 15°46.841' W 048°01.914').

II) Armadilhas: Adultos selvagens foram coletado com armadilhas: i) Van Someren-Rydon (Fig. 5B); ii) coleta e emersão (confeccionada com garrafas PET cortadas na altura do afunilamento). Em cada garrafa foi adicionado terra do local de coleta, três centímetros; acima dele 40 gramas de isca e cobrindo a isca mais três centímetros de terra (Fig. 5C); e iii) coleta manual usando isca e potes para amostra biológica. As armadilhas eram verificadas a cada dois dias. Foi utilizada um tipo de armadilha por ponto de coleta.

III) Iscas: Os indivíduos foram coletados com auxílio de iscas de matéria orgânica de origem animal em decomposição (48 horas), fezes de gado, frutas (manga, goiaba e banana).

IV) Identificação: Os espécimes coletados foram triados e identificados com auxílio de chaves dicotômicas presentes em McAlpine *et al.* (1981; 1987), Markou & O'Grady (2006), Carvalho & Mello-Patiu (2008), Brown *et al.*, (2010) e Carvalho *et al.* (2012).

V) Manutenção de adultos: Os adultos selvagens foram identificados e mantidos em gaiolas de criação no laboratório (Fig. 5D-E). As gaiolas foram colocadas em câmara climatizada (BOD), regulada para $23 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$, $60 \pm 10\%$ de Umidade Relativa (UR) e 12 horas de fotoperíodo.

VI) *Dieta*: Os insetos foram mantidos em gaiolas com mistura de açúcar, leite em pó, levedo de cerveja e água e reposição hídrica com algodão embebido em água (Fig. 5E).

VII) *Obtenção de ovos e larvas*: Para cada espécie coletada e mantida em gaiola no laboratório foi oferecido em placas de Petri: i) fezes de gado (previamente coletado, separado em lotes de 100g, congelado para matar parasitas e posteriormente descongelado para obtenção de ovos e criação das larvas); ii) goiaba, manga e banana maduras para obtenção de ovos e criação das larvas; iii) proteína animal em decomposição (vísceras ou músculo moído com 48 horas de exposição a temperatura ambiente) (Fig. 5F).

VIII) *Obtenção de Hermetia illucens*: Larvas dessa espécie (boró) são criadas e comercializadas como iscas para pesca por uma comunidade do Distrito Federal (Santos & Coimbra JR., 1984). A criação e comercialização das larvas atende a uma demanda constante de iscas por pescadores locais que frequentam o Lago Paranoá. Em laboratório as larvas foram mantidas em potes com dieta de farelo de trigo, umedecido com água.

IX) *Criação/colônia*: os ovos e larvas foram transferidos das placas de Petri para potes de amostra biológica contendo a mesma dieta oferecida como estímulo a oviposição. Esses potes foram acondicionados em potes maiores contendo vermiculita (substrato usado para pupariação) e fechados com tecido voil, preso por liga elástica. Todos os potes foram identificados e mantidos sob condições controladas na BOD, regulada para $23 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$, $60 \pm 10\%$ de UR e 12 horas de fotoperíodo (Figs. 5G-I).

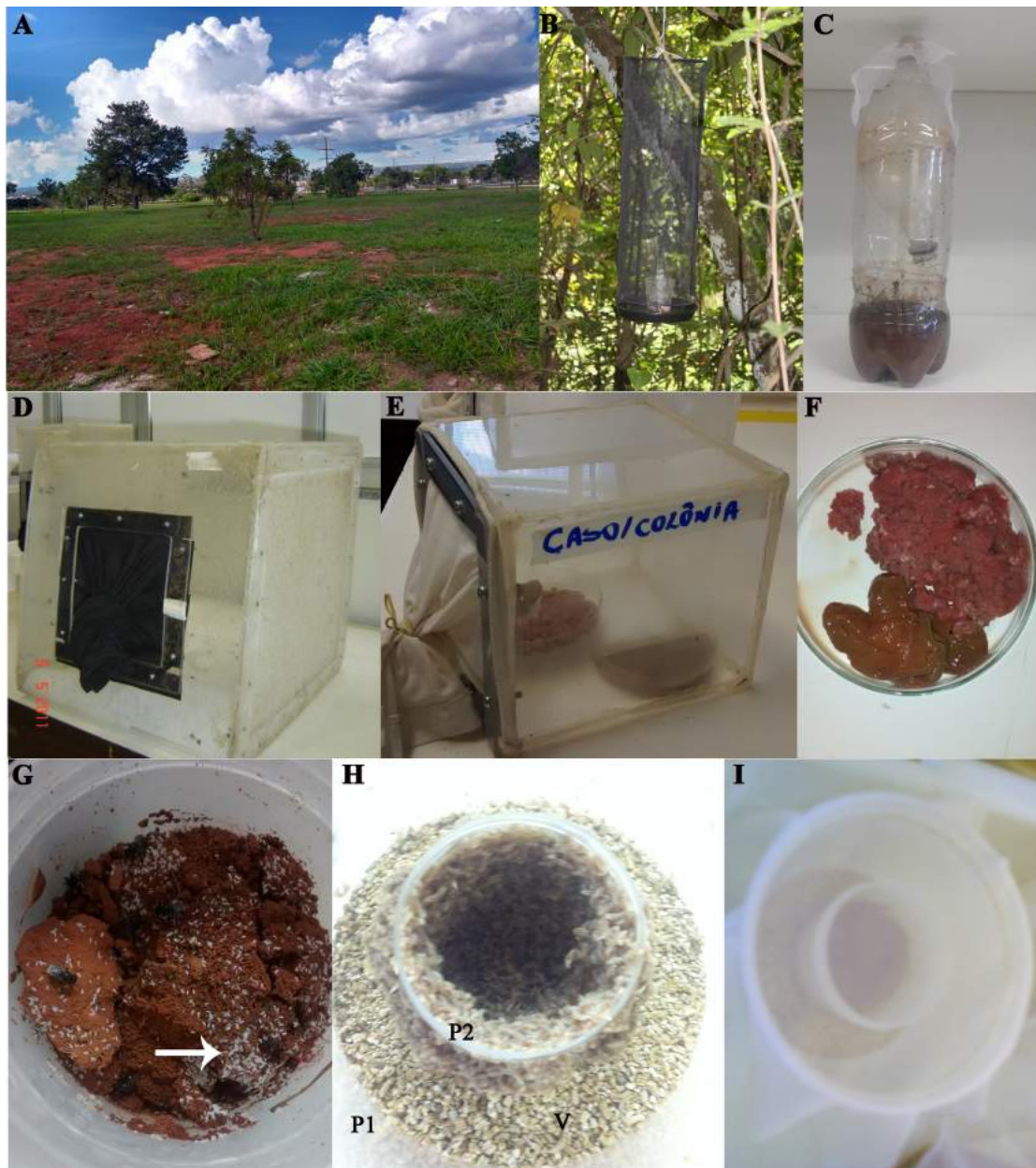


Figura 5. Coleta e criação de Diptera. (A) Local de coleta: campus Darcy Ribeiro; (B) armadilha Van Somere-Rydon; (C) armadilha de garrafa pet; (D) gaiola para triagem e criação de moscas adultas; (E) gaiola de criação com água e dieta; (F) proteína animal para estímulo a copula e oviposição; (G) pote contendo carne em decomposição, coberta por terra para oviposição (ovos-pontos brancos-seta) de *Piophilha casei*; (H) pote menor com carne e larvas de *Megaselia scalaris* e pote maior com vermiculita; (I) pote de criação fechado com tecido voil. Abreviatura: P1, pote 1; P2, pote 2; V, vermiculita.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram selecionados para criação: i) as espécies de diferentes grupos taxonômicos, sempre que possível; ii) as espécies que foram viáveis para a criação e manutenção de colônia em laboratório (Tabela 1); iii) espécies que se alimentam de diferentes substratos, como frutas, fezes e carne em decomposição.

Tabela 1. Lista das espécies coletadas e criadas sob condições controladas de laboratório.

	Família	Espécie
1	Stratiomyidae	<i>Hermetia illucens</i> (Fabricius, 1775)
2	Phoridae	<i>Megaselia scalaris</i> (Loew 1866)
3	Drosophilidae	<i>Drosophila melanogaster</i> (Meigen, 1830)
4	Sepsidae	<i>Archiseptis discolor</i> (Bigot, 1857)
5	Piophilidae	<i>Piophila casei</i> (Linnaeus, 1758)
6	Tephritidae	<i>Anastrepha fraterculus</i> (Wiedeman, 1830)
7	Faniidae	<i>Fannia pusio</i> (Wiedeman, 1830)
8	Muscidae	<i>Musca domestica</i> (Linnaeus, 1758)
9	Calliphoridae	<i>Chrysomya megacephala</i> (Fabricius, 1794)
10	Sarcophagidae	<i>Peckia trivittata</i> (Curran, 1927)

- *H. illucens*: não é possível manter colônia dessa espécie em laboratório, devido sua necessidade de áreas abertas para cópula durante o voo. Como mencionado acima, a comunidade que cria essa espécie, para fins lucrativos, mantém compostagem ativa o que viabiliza a oviposição e o desenvolvimento da fase larval.
- *M. scalaris*: é uma espécie de fácil obtenção. E por ser uma mosca pequena, ela entra nas gaiolas de criação de outras espécies e contamina o substrato. Suas larvas se misturam as larvas da outra espécie. A fase de pupa de *M. scalaris* não requer vermiculita para pupariação, pois, suas pupas se aderem a qualquer artefato próximo do local onde estava o recurso alimentar.
- *D. melanogaster*: é uma espécie de fácil criação e obtenção. Criada com banana, apresentou tempo médio total de desenvolvimento de cinco dias.
- *A. discolor*: espécie de fácil obtenção, mas difícil criação. Não foi possível observar a postura dos ovos, pois, as fêmeas depositaram os ovos nas fezes de forma que não foi possível localizar. Após a eclosão das larvas, as fezes foram mantidas sempre úmidas para evitar o ressecamento e afetar o desenvolvimento larval. Foram realizadas triagens semanais, no substrato de criação, a fim de

observar o desenvolvimento e a quantidade de larvas e a presença de pupas. As pupas foram retiradas das fezes e colocadas em eppendorf, até a emergência da mosca adulta. As fezes usadas em todo o experimento (como isca para coletar o adulto e como estímulo à oviposição e desenvolvimento das larvas) eram oriundas de lotes previamente congelados, para eliminar possíveis predadores e parasitas.

- *P. casei*: a dificuldade em se criar essa espécie é devido os dois primeiros instares larvais serem transparentes e as larvas de terceiro instar pularem cerca de 15 cm de distância do ponto inicial. Para o desenvolvimento das larvas é necessário que o substrato proteico não esteja úmido e fresco. Elas preferem a fase seca, final da decomposição.
- *A. fraterculus*: é uma espécie praga de frutas e legumes. Foi coletada em uma chácara onde havia pés de goiaba, mamão e pitanga. As frutas caídas no chão, que apresentavam perfurações, foram coletadas e levadas para o laboratório. Após a triagem, as frutas identificadas com larvas foram mantidas em potes de criação. Durante o processo de pupariação as larvas saíam das frutas e migravam para a vermiculita, permanecendo nela até a emergência da mosca adulta.
- *F. pusio*: essa espécie tem preferência por iscas enterradas, ou seja, coberta por terra. As larvas coletadas na armadilha de garrafa pet (Fig. 5C) foram triadas em laboratório, mantidas em carne em decomposição e durante o processo de pupariação elas migravam para a vermiculita. Os adultos que emergiram foram mantidos em colônia. Para a manutenção da colônia e obtenção de novas gerações foi oferecido em um pote de amostra biológica, carne em decomposição coberta com terra (Fig. 1G).
- *M. domestica*, *C. megacephala* e *P. trivittata*: possuem a mesma dinâmica de criação em laboratório e foram as espécies mais fáceis de se obter e manter colônia; todas foram criadas com carne em decomposição. Entretanto, *M. domestica* possui alta mortalidade na fase larval, chegando a cerca de 80% de todas as larvas que eclodiram dos ovos.

A coleta de insetos é fácil caso sejam usadas armadilha e isca correta para captura da espécie desejada. Mas a manutenção de colônias e gerações em laboratório é muitas vezes inviável, devido à necessidade de muitos insetos realizarem a copula durante o voo, para isso seria necessário ter um laboratório com gaiolas enormes. Além disso, algumas espécies adultas necessitam de local e alimento diverso do seu para realizar a copula e a postura de ovos ou larvas.

CAPÍTULO 1: PROCESSO DE PUPARIAÇÃO E PUPÁRIO

Todas as pupas em Diptera são envolvidas por uma estrutura ‘rígida’, o pupário, que é geralmente formado pelo tegumento do último instar larval. O processo que culmina na formação desse ‘casulo’ é chamado pupariação, e é precedido de um período onde as larvas obrigatoriamente se alimentam de uma grande quantidade de substrato seguindo para um período onde a alimentação é facultativa (Denlinger & Ždárek, 1994). A pupariação ocorre de modo lento e gradual, e após o abandono da dieta pela larva, o imaturo sofre alguma retração dos segmentos, seguido da esclerotização do tegumento.

Nos mosquitos, Nematocera, o pupário é formado a partir de secreções de substâncias que esclerotizam o último tegumento larval ou que possam envolver a pupa (McAlpine *et al.*, 1981; Zdarek & Denlinger, 1991; Costa *et al.*, 2006). Nas moscas Stratiomyomorpha (Brachycera), a pupa utiliza o último tegumento larval como abrigo, o pupário, que mantém quase todas as características da larva inclusive, em alguns casos, a quetotaxia anteriormente existente (Rozkošný, 1982; Barros-Cordeiro *et al.*, 2014). Em Cyclorrapha (Muscomorpha) o último tegumento larval passa por mudanças em sua estrutura para se transformar no pupário: os dois primeiros segmentos (anteriores) sofrem invaginação em relação ao terceiro segmento; o espiráculo posterior esclerotiza e torna-se não funcional; e o espiráculo

anterior muda de forma e apresenta um corno respiratório (Fraenkel & Bhaskaram, 1973; McAlpine *et al.*, 1981; Costa *et al.*, 2006). Além disso, o espiráculo anterior da pupa é protorácico e penetra o pupário no primeiro tergito abdominal (McAlpine & Wood, 1989).

O pupário pode ser considerado uma estrutura transitória, e por ser rígida, confere proteção aos tecidos frágeis da mosca adulta em formação, contra danos físicos e ou biológicos externos (Zdarek & Fraenkel 1972; Costa *et al.*, 2006; Costa & Ide, 2008). Em função dos diferentes ‘graus’ de quitinização e esclerotização, o pupário já foi usado como caráter taxonômico em relações filogenéticas. Alguns parâmetros foram usados como caráter morfológico como as paredes do pupário: se são finas ou grossas, se ligeiramente ou muito pigmentadas (McAlpine & Wood, 1989). Ainda foram consideradas as linhas de clivagem do pupário, ou seja, aquelas que “facilitam” a saída da mosca do casulo. Essas permitem classificar, de forma simplificada, as pupas como obtecta ou coarctata, segundo a forma de saída do adulto do pupário (McAlpine *et al.*, 1981; McAlpine & Wood, 1989; Costa *et al.*, 2006).

Segundo Costa & Ide (2008), os pupários apresentam morfologia própria, que não é encontrada na larva ou no adulto e podem: i) exibir diferença no número de espiráculos funcionais, quando em comparação com a larva, ii) apresentam tubérculos e ou processos que facilitem a movimentação e iii) espinhos.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção das amostras

As amostras foram obtidas de colônia pré-estabelecida em laboratório (vide capítulo coleta e criação – Página 24) e da Coleção Entomológica do Departamento de Zoologia da Universidade de Brasília (CEDZoo-UnB).

Simuliidae; Culicidae [*Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762)]; Stratiomyidae [*Hermetia illucens* (Fabricius, 1775)]; Phoridae [*Megaselia scalaris* (Loew, 1866)]; Syrphidae [*Ornidia obesa* (Fabricius, 1775)]; Tephritidae [*Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830)]; Piophilidae [*Piophilina casei* (Linnaeus, 1758)]; Sepsidae [*Archiseptis discolor* (Bigot, 1857)]; Drosophilidae [*Drosophila melanogaster* (Meigen, 1830)]; Fanniidae [*Fannia pusio* (Wiedemann, 1830)]; Muscidae [*Musca domestica* (Linnaeus, 1758)]; Calliphoridae [*Chrysomya megacephala* (Fabricius,

1794) e *Lucilia eximia* (Wiedemann, 1819)]; Sarcophagidae [*Peckia trivittata* (Curran, 1927)]; Cuterebridae [(*Metacuterebra apicalis* (Guérin, 1829))].

O número de espécies observadas e avaliadas no microscópio de varredura ou de força atômica varia de acordo com a viabilidade de cada experimento e procedimento.

Pupariação

Foi observado o tempo e o processo de pupariação para seis espécies de moscas: *H. illucens*, *M. scalaris*, *P. casei*, *F. pusio*, *M. domestica* e *C. megacephala*.

Espécies estudadas na Microscopia de Varredura

Simulidae; *Ae. aegypti*, *H. illucens*, *M. scalaris*, *O. obesa*, *A. fraterculus*, *P. casei*, *Archiseptis discolor*.; *D. melanogaster*, *F. pusio*, *M. domestica*, *C. megacephala*, *L. eximia*, *P. trivittata*, *M. apicalis*.

Os pupários foram montados em *stubs*, metalizadas com ouro e visualizadas em microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM 7001 F.

Microscopia de Força Atômica

Foram estudadas cinco espécies de moscas: *H. illucens*, *M. scalaris*, *A. fraterculus*, *C. megacephala* e *P. trivittata*. Para cada espécie foram analisados cinco pupários (fragmento do sexto segmento, região ventral, obtido após a emergência da mosca adulta e preservado em álcool 70%). Em cada fragmento de pupário foram analisados cinco pontos.

A nanoestrutura dos pupários foi determinada por microscopia de força atômica (MFA) utilizando um microscópio SPM-9600 da Shimadzu Corporation. As imagens, foram obtidas, com área de varredura de 10 x 10 µm. Para análises realizadas foram utilizados cantilevers de 200 µm de comprimento, integrados com ponteiros piramidais de nitreto de silício com constante de mola de ~0,15 N/m e raio de curvatura de aproximadamente 20 nm (Olympus, Japão). A área máxima do escâner utilizado é de 125 µm x 125 µm x 7 µm nas direções x, y e z, respectivamente. As imagens foram obtidas em 512 × 512 linhas frequência de varredura de 1 Hz, em diferentes posições na amostra, obtendo-se informações topográficas.

As imagens obtidas foram processadas utilizando o software SPM-9600 off-line, por meio de um nivelamento no plano horizontal e por um nivelamento automático da superfície no plano bidimensional, seguidos por um ajuste de plano de fundo no eixo x quando necessário. Para análise de superfícies das amostras utilizou-se a função de análise de superfície para determinar medidas sobre as variáveis de nanorugosidade: Ra, rugosidade média; Rq, raiz quadrática da rugosidade média; Rz, distância média entre os picos e os vales; e Rzjis, distância média entre a linha média e os 10 picos mais altos.

A espectroscopia de força, análise mecânica, das amostras avaliou as forças de interação entre as superfícies das amostras e a ponteira de nitreto de silício do MFA. Usando o modo contato com cantilever de 200 μm de comprimento (constante de mola de $\sim 0,15$ N/m e frequência de ressonância de ~ 24 kHz), integrados com ponteiras piramidais de nitreto de silício (raio de curvatura de aproximadamente 20 nm). A frequência de aquisição utilizada foi de 1 Hz, amplitude de 20 V, sendo o ponto inicial de 3V de amplitude.

As curvas de força obtidas foram processadas utilizando o software SPIP V.5.1.11 (Image Metrology, Dinamarca), com as seguintes condições para obtenção dos parâmetros referentes às curvas de força: temperatura de 23°C, ajuste da curva de força pela média entre as curvas de aproximação e retração, ponto zero automático e curva de aproximação como linha de base. Foram obtidas cinco curvas de força conclusivas para cada amostra. Os parâmetros analisados foram: (snap in force) atração entre a ponteira e a amostra; (max load force) dureza; (detach force) adesão entre a ponteira e a amostra; e (módulo de Young) elasticidade da amostra.

Análise estatística

A nanoestrutura e as propriedades mecânicas dos pupários foram avaliadas por meio da análise de variância Kruskal-Wallis, realizada no programa Statistica 7.1. As médias foram comparadas pelo teste Tukey pareado, utilizando o SigmaPlot 12. A similaridade entre os pupários foi estabelecida por meio de uma análise de cluster usando a distância euclidiana, feita no programa estatístico PAST3.

RESULTADOS

Pupariação

Em *H. illucens*, o pupário é o último tegumento larval. A larva abandona a dieta e começa a vaguar pelo substrato (vermiculita) até se enterrar. Esse processo durou de dois a 15 dias. O pupário preservou quase todas as características morfológicas da larva, principalmente preservando as cerdas. Os segmentos sofreram pouca retração, os últimos segmentos sofreram inclinação em direção a região ventral de $\approx 45^\circ$. Os ocelos mudaram a coloração de vermelho para branco. A linha de ruptura, T invertido, pôde ser observada desde a formação do pupário e se manteve evidente até a emergência da mosca (Figs. 1.1C e 1.2C1-C2).

Em *M. scalaris*, o pupário é feito do último tegumento larval. A larva, após abandonar a dieta, começa a vaguar pela superfície em “busca” de um local para se fixar, geralmente em arestas, processo que durou 15 horas. A larva secreta uma substância que a deixa aderida ao local desejado para sofrer metamorfose. O tegumento larval sofre modificações, os segmentos iniciais sofrem pouca retração e a dorsal fica “achatada”. A linha de clivagem em H pode ser observada desde a hora três da fase de pupa (Figs. 1.1D e 1.2D1-D2).

Em *P. casei*, o pupário é o último tegumento larval. O primeiro segmento sofre invaginação completa em relação ao segundo. E do segundo ao quarto segmentos, sofre pouca retração. A larva não abandona a dieta, ela usa o substrato alimentar, como local para a pupação. Durante a fase de larva ela faz túneis na carne e esse processo resseca o substrato, o que permite sua utilização como abrigo para a pupa. A pupariação durou cerca de 12 horas e a linha de clivagem pôde ser vista desde a hora 30 da fase de pupa (Figs. 1.1G e 1.2G1-G2).

Em *F. pusio*, o pupário é formado pelo último tegumento larval. A larva abandona a dieta e começa a vaguar pelo substrato de pupariação (vermiculita), após cerca de nove horas, ela já se enterrou no substrato. A cutícula passa a ficar mais rígida e pigmentada e sua motilidade é reduzida até a formação da pupa, quando fica imóvel. Todo o processo durou 15 horas. A larva sofre pouca retração dos segmentos, a região ventral fica ligeiramente achatada. A linha de clivagem pôde ser observada desde a 33 hora da fase de pupa (Figs. 1.1J e 1.2J1-J2).

M. domestica e *C. megacephala*, possuem o mesmo comportamento e características no desenvolvimento, após abandonarem a dieta, as larvas ficaram em atividade sobre a vermiculita por algumas horas. Aos poucos elas começam a se enterrar no substrato e a reduzir sua motilidade. Durante esse processo ocorreu a retração dos segmentos; o primeiro segmento sofre invaginação em relação ao segundo segmento. A cutícula progressivamente ficou mais esclerotizada e pigmentada (do castanho ao marrom escuro/preto). O espiráculo posterior entrou em colapso e se fundiu parcialmente com o tubérculo anal. A pupa assumiu a forma de um barril. O tempo mínimo de duração desse processo foi de 12 horas para *C. megacephala* e de 28 horas para *M. domestica*. A linha ecdisal de *C. megacephala* pode ser observada com 15 horas e de 21 horas para *M. domestica* da fase de pupa (Figs. 1.1K-L).

Os pupários

Assim como nas larvas, as pupas possuem características diversas e estruturas próprias da sua fase (Fig. 1.1A-L). Os pupários passam a ter então caracteres que podem vir a ser usados em estudos taxonômicos e filogenéticos. Em Simuliidae a larva tece uma ceda e com grão de areia forma o seu pupário. Culicidae possui pupa móvel e é revestido por uma membrana, já em Stratiomyidae o pupário é o último tegumento larval. Em Cyclorrhapha ocorre a manutenção do último tegumento larval, ou seja, a pele da larva é adaptada e forma um casulo, o pupário (Figs. 1.1D-L).

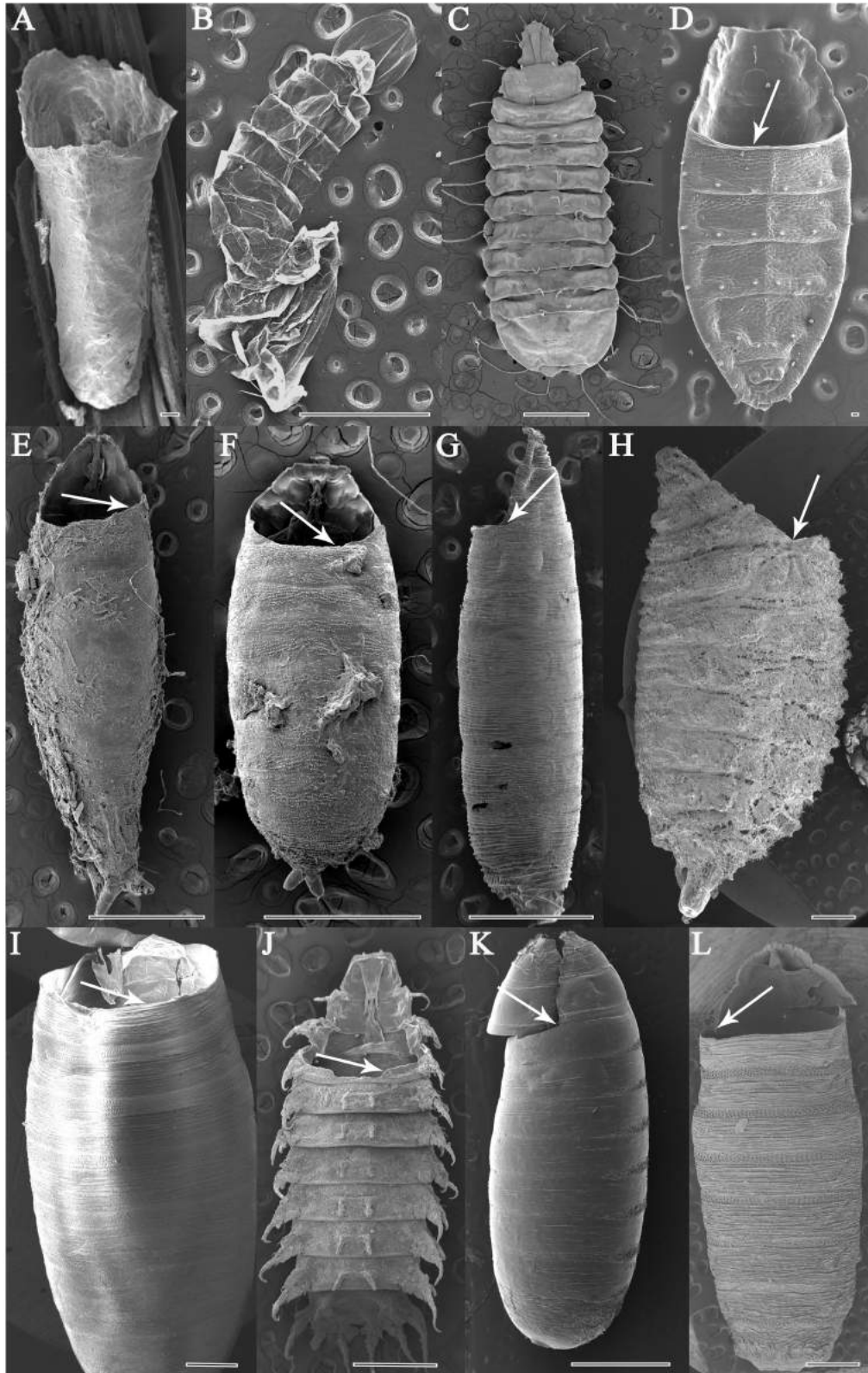


Figura 1.1. Microscopia eletrônica de varredura dos pupários de Diptera e linhas de clivagem. A (Simuliidae), B (Culicidae), C (Stratiomyidae), D (Phoridae), E (Sepsidae), F (Drosophilidae), G (Piophilidae), H (Syrphidae), I (Tephritidae), J (Fanniidae), K (Muscidae), L (Calliphoridae). Setas: mostram a linha ecdisal (setas). **Escalas:** 100 µm (A, B, D); 1 mm (C, E, F, G, H, I, J, K, L).

A análise nanoestrutural dos pupários revelou diferenças entre as espécies (Fig 1.2). Para a caracterização morfológica, com relação a nanorrugosidade, foram usados quatro parâmetros: Ra, rugosidade média; Rq, raiz quadrática da rugosidade média; Rz, distância média entre os picos e os vales; e Rzjis, distância média entre a linha média e os 10 picos mais altos. Houve diferenças significativas com base nesses parâmetros ($p < 0,01$): Ra [Var2: KW-H (4;125) = 18,984; $p = 0,0008$]; Rz [Var2: KW-H (4;125) = 18,5389; $p = 0,0010$]; Rzjis [Var2: KW-H (4;125) = 21,0236; $p = 0,0003$]; e Rq [Var2: KW-H (4;125) = 18,656; $p = 0,0009$]. A morfologia de Sarcophagidae é diferente significativamente de Stratiomyidae e Phoridae segundo todos os parâmetros avaliados e é diferente de Calliphoridae em relação ao Ra e a Tephritidae em relação a Rz e Rzjis (Fig. 1.4).

As propriedades mecânicas dos pupários foram analisadas usando quatro parâmetros que descrevem padrões de: atração entre a ponteira e a amostra (snap in force), dureza (max load force), adesão entre a ponteira e a amostra (detach force) e elasticidade da amostra (módulo de Young). Exceto para dureza, os demais parâmetros apresentaram diferenças significativas ($p < 0,01$): max load force [Var2: KW-H (4;125) = 8,4362; $p = 0,0768$]; snap in force [Var2: KW-H (4;125) = 13,9603; $p = 0,0074$]; detach force [Var2: KW-H (4;125) = 35,2406; $p = 0,0000004$]; Young mod. [Var2: KW-H (4;125) = 49,0006; $p = 0,0000$]. Calliphoridae é diferente significativamente de Stratiomyidae, Phoridae e Sarcophagidae com relação a adesão e a Tephritidae com relação a adesão e elasticidade. Sarcophagidae é diferente significativamente de Phoridae com relação a atração e a Tephritidae com relação a atração e elasticidade. Tephritidae é diferente significativamente de Phoridae e Stratiomyidae com relação a elasticidade (Fig. 1.5).

A caracterização topográfica qualitativa apresentou diferenças para uma mesma área (Fig. 1.2), a superfície dos pupários não possuem uma superfície homogênea. Essa diferença é significativamente evidente entre Phoridae, e as demais espécies analisadas, que foi comprovado pelos parâmetros de rugosidade (Figs. 1.3 e 1.4).

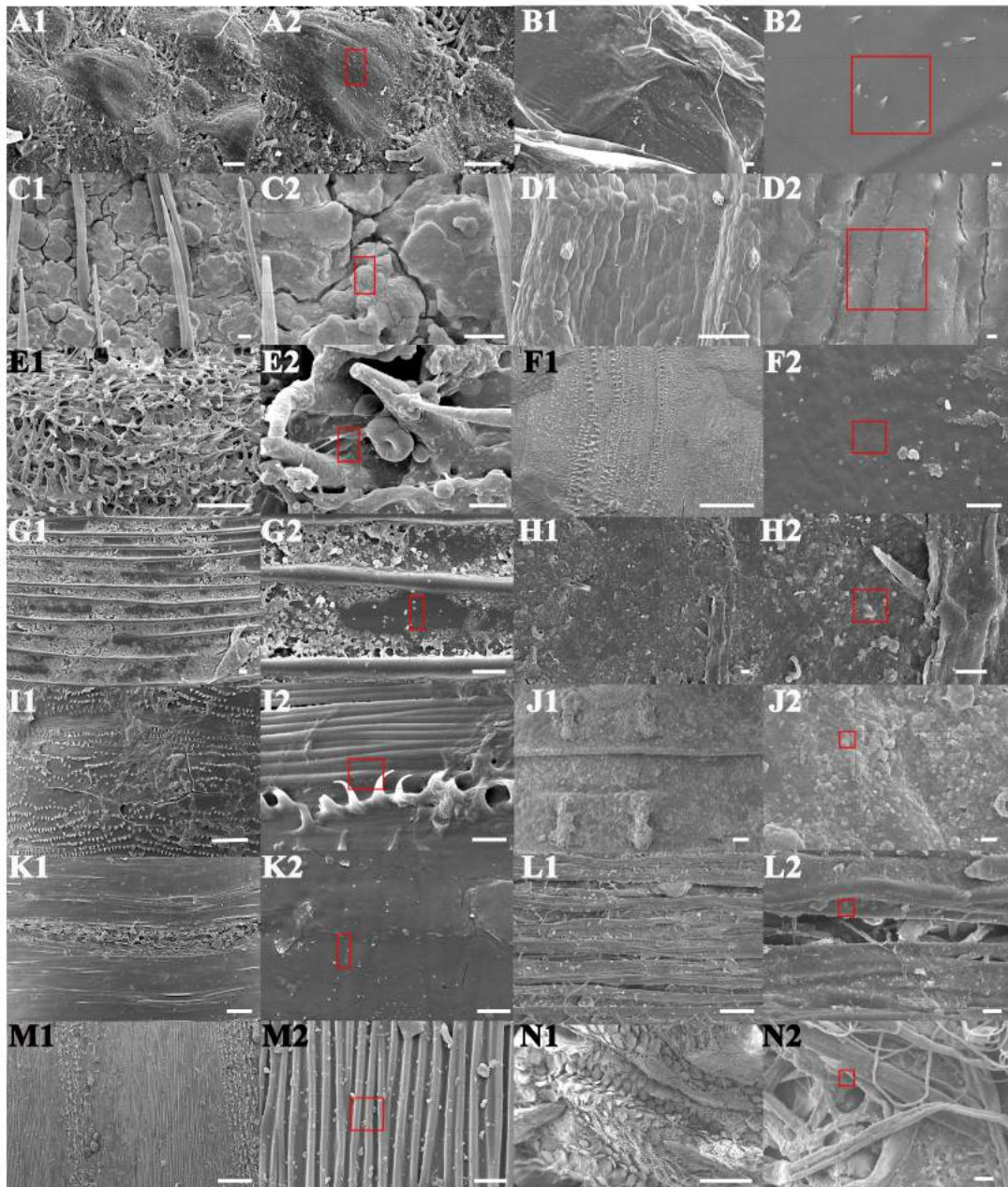


Figura 1.2. Microscopia eletrônica de varredura dos pupários de Diptera em detalhes da superfície. Simuliidae (A1) e em detalhes (A2); Culicidae (B1) e em detalhes (B2); Stratiomyidae (C1) e em detalhes (C2); Phoridae (D1) e em detalhes (D2); Syrphidae (E1) e em detalhes (E2); Tephritidae (F1) e em detalhes (F2); Piophilidae (G1) e em detalhes (G2); Sepsidae (H1) e em detalhes (H2); Drosophilidae (I1) e em detalhes (I2); Fanniidae (J1) e em detalhes (J2); Muscidae (K1) e em detalhes (K2); Calliphoridae-*Chrysomya megacephala* (L1) e em detalhes (L2); Calliphoridae-*Lucilia eximia* (M1) e em detalhes (M2); Cuterebridae (N1) e em detalhes (N2). **Legenda:** área selecionada em vermelho (quadrilátero) $\approx 10 \times 10 \mu\text{m}$. **Escala:** 10 μm (A1-2, B1-2, C1-2, E2, F2, G1-2, H1-2, I2, J1-2, K2, L2, M2, N2) 100 μm (D1, E1, F1, I1, K1, L1, M1), 1 μm (D2), 1 mm (N1).

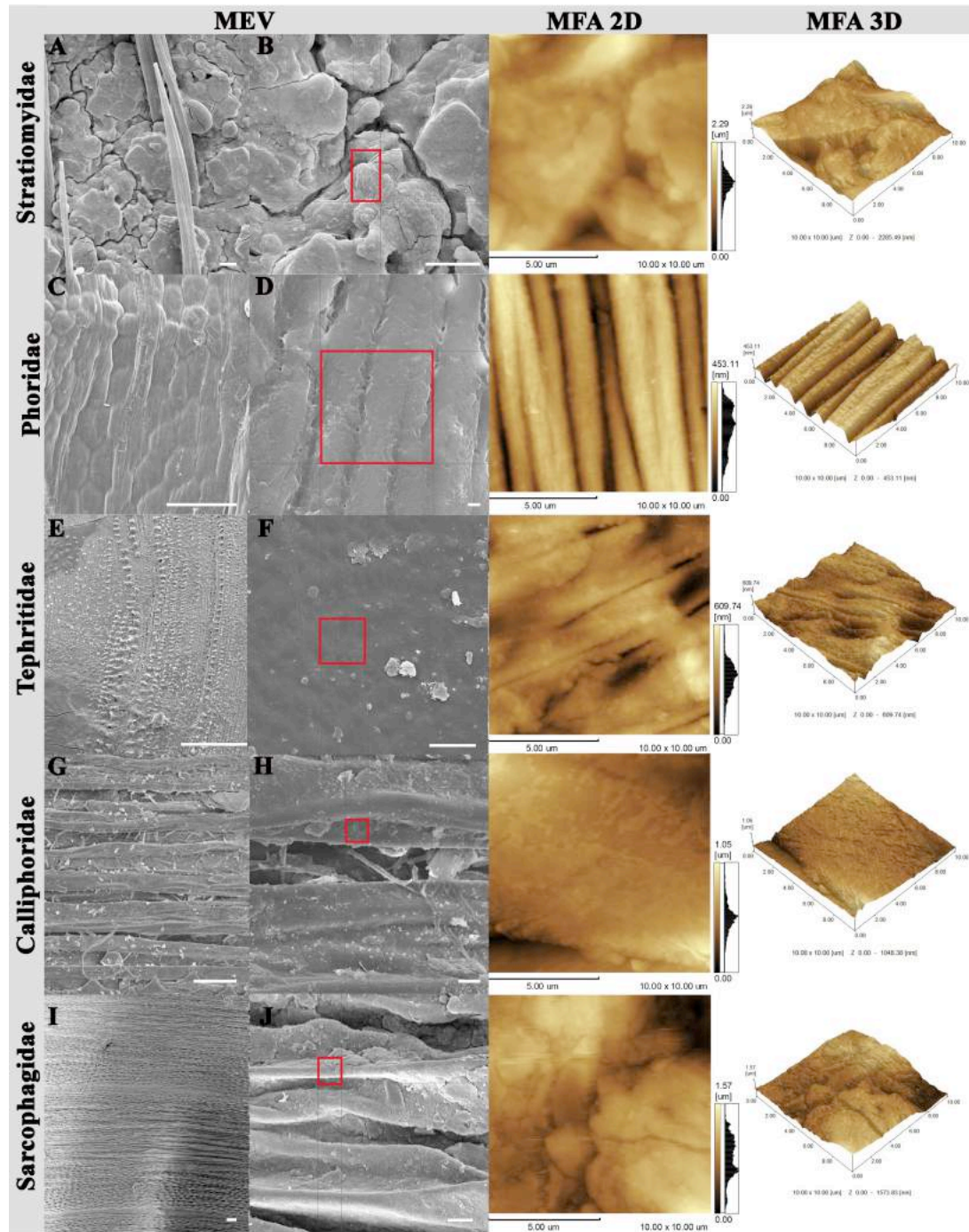


Figura 1.3. Ultraestrutura dos pupários de Diptera. Stratiomyidae (A) vista “macro” e em (B) maior detalhe, com quadrilátero vermelho delimitando a área analisada pelo MFA $\approx 10 \times 10 \mu\text{m}$; Phoridae (C) vista “macro” e em (D) maior detalhe, com quadrilátero vermelho delimitando a área analisada pelo MFA $\approx 10 \times 10 \mu\text{m}$; Tephritidae (E) vista “macro” e em (F) maior detalhe, com quadrilátero vermelho delimitando a área analisada pelo MFA $\approx 10 \times 10 \mu\text{m}$; Calliphoridae (G) vista “macro” e em (H) maior detalhe, com quadrilátero vermelho delimitando a área analisada pelo MFA $\approx 10 \times 10 \mu\text{m}$; Sarcophagidae (I) vista “macro” e em (J) maior detalhe, com quadrilátero vermelho delimitando a área analisada pelo MFA $\approx 10 \times 10 \mu\text{m}$. Abreviaturas: MEV, microscopia eletrônica de varredura; MFA, microscopia de força atômica; 2D bidimensional; 3D tridimensional.

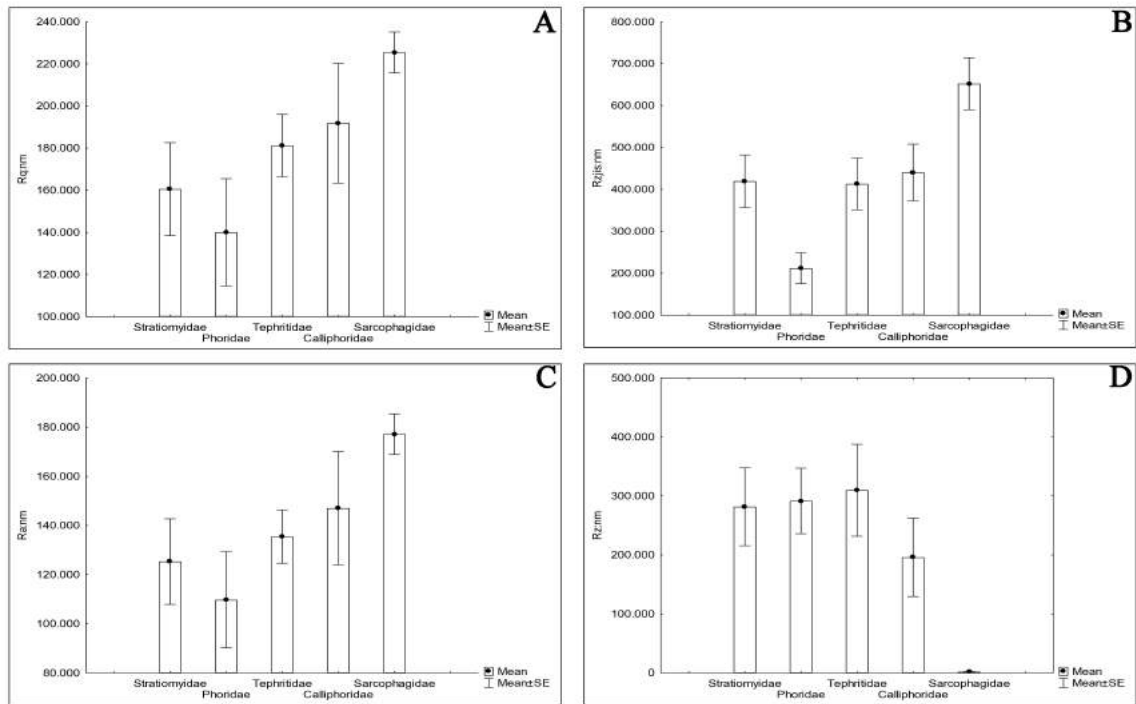


Figura 1.4. Nanorrugosidade da superfície dos pupários de Diptera, obtida por meio de microscopia de força atômica. Os histogramas estão representados como a média \pm erro padrão da média. (A) Rq, raiz quadrada da rugosidade média; (B) Rzjis, distância entre a linha média e os 10 picos mais altos; (C) Ra, rugosidade média; (D) Rz, distância média entre picos e vales.

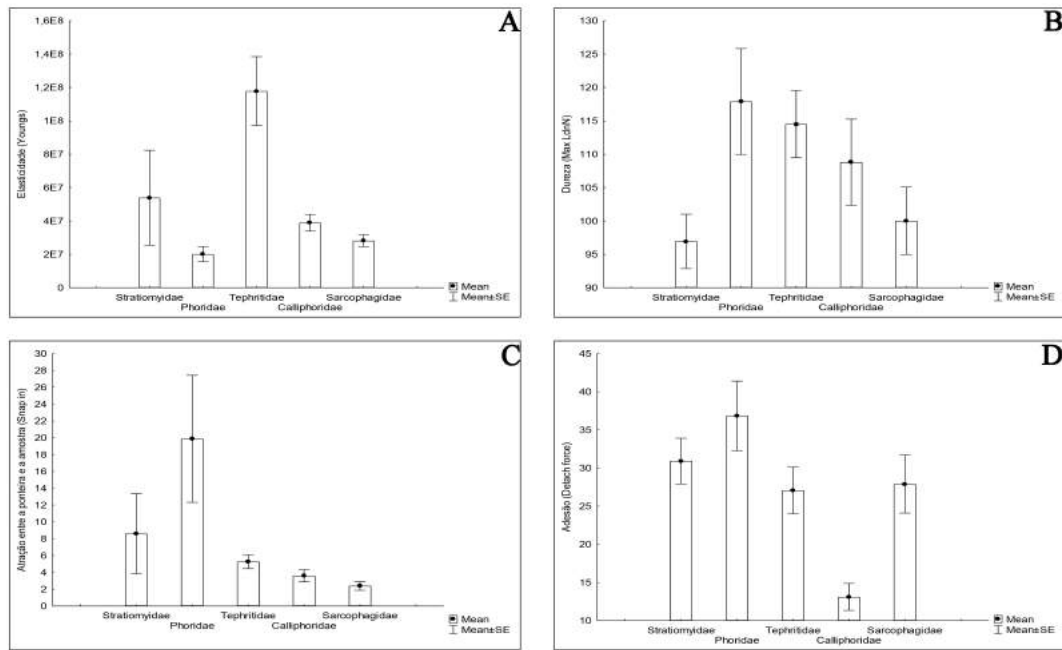


Figura 1.5. Parâmetros de espectroscopia de força, propriedades mecânicas, da superfície dos pupários de Diptera, obtida por meio de microscopia de força atômica. Os histogramas estão representados como a média \pm erro padrão da média. (A) Modulo de Young (*Young modulus*), elasticidade da amostra; (B) Max load, dureza da amostra; (C) Snap inn, atração entre a amostra e a ponteira; (D) Detach force, adesão entre a amostra e a ponteira.

Os dendrogramas propostos refletem a similaridade fenética entre os indivíduos estudados, com base nos parâmetros analisados pelo MFA (Figs. 1.6 e 1.7). Os resultados não necessariamente refletem a ancestralidade comum, usamos como metodologia de classificação a taxonomia numérica (distância euclidiana).

As informações obtidas por meio da MFA são potenciais caracteres que podem vir a ser usados para diagnóstico do táxon como informação adicional a taxonomia clássica e podem vir a remodelar a história de vida do inseto.

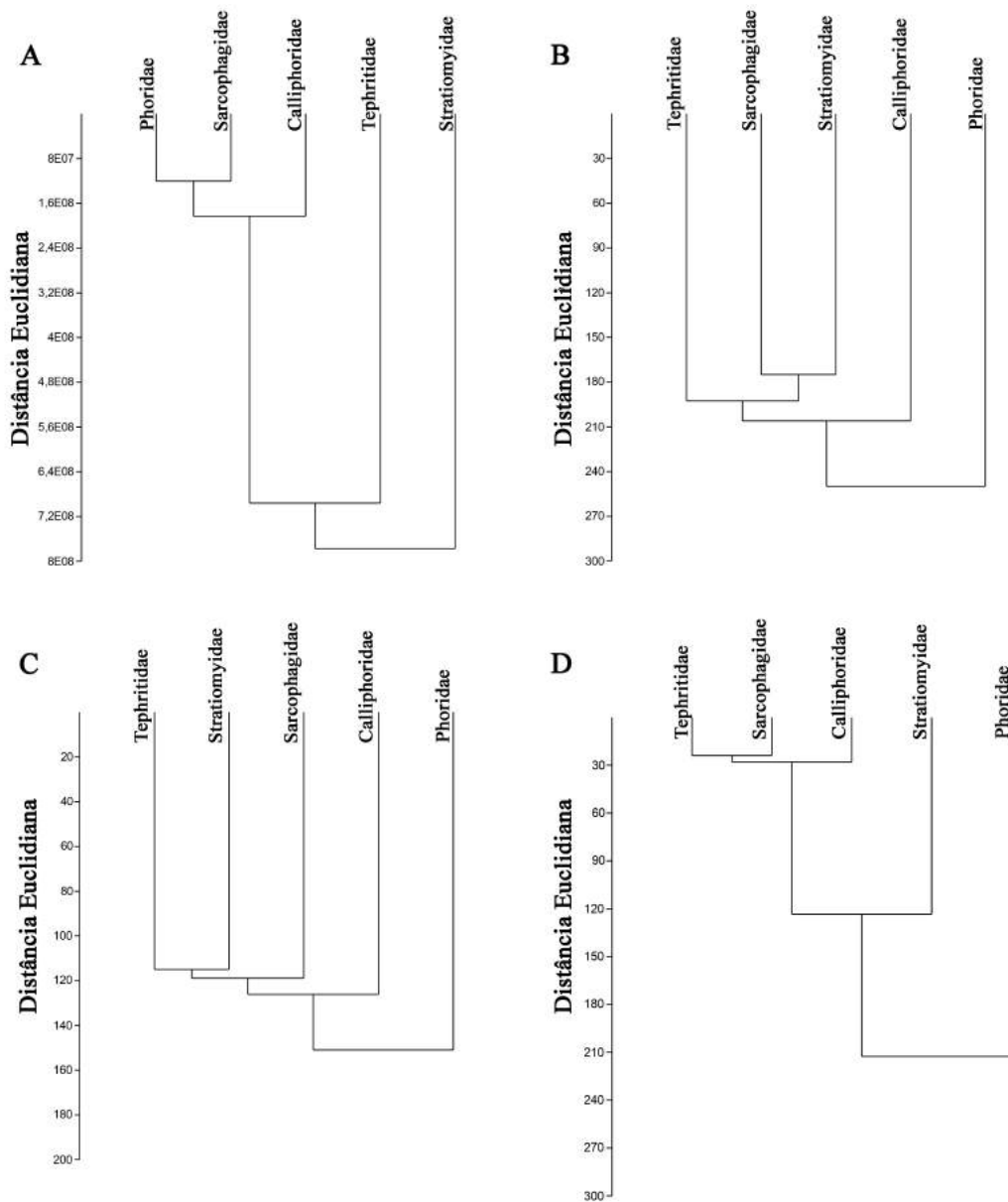


Figura 1.6. Dendrogramas: apresentam a relação fenética entre as espécies de Diptera, usando parâmetros de espectroscopia de força, propriedades mecânicas, da superfície dos pupários. (A) Modulo de Young (*Young modulus*), elasticidade da amostra; (B) Max load, dureza da amostra; (C) Snap inn, atração entre a amostra e a ponteira; (D) Detach force, adesão entre a amostra e a ponteira. Escalas: A, Pascal (Pa); B-D, Nanonewton (nN).

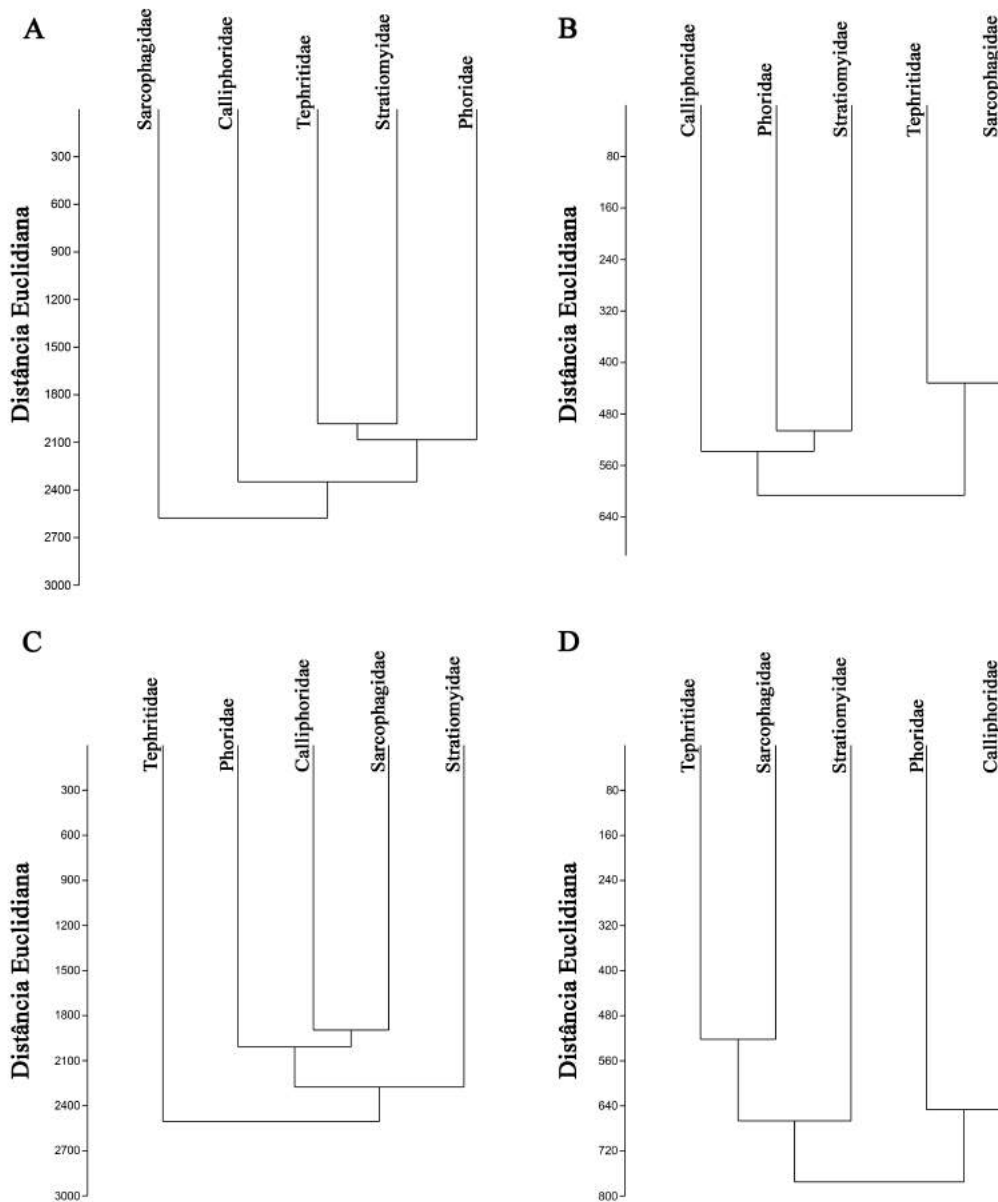


Figura 1.7. Dendrogramas: apresentam a relação fenética entre as espécies de Diptera, usando a nanorrugosidade da superfície dos pupários de Diptera, obtida por meio de microscopia de força atômica. (A) Rzjis, distância entre a linha média e os 10 picos mais altos; (B) Ra, rugosidade média; (C) Rz, distância média entre picos e vales; (D) Rq, raiz quadrada da rugosidade média. Escalas: A-D, nanômetros (nm).

DISCUSSÃO

Pupariação

O processo de pupariação das seis espécies estudadas ocorreu de modo semelhante ao que se já foi observado em outras espécies de Diptera, como: *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819), *Chrysomya putoria* (Wiedemann, 1830), *Lucilia sericata* (Meigen, 1826), *Cochliomya macellaria* (Fabricius, 1775), *Lucilia cuprina* (Wiedemann, 1830), *Calliphora vicina* (Robineau-Desvoidy, 1830), *M. domestica*, *Sarcophaga (Neobellieria) bulata* (Parker, 1916), *D. melanogaster*, *Drosophila guttifera*, *Oestrus ovis* (Linnaeus, 1758), *H. illucens*, (Fraenkel & Bhaskaran, 1973; Denlinger & Ždárek, 1994; Cepeda-Palacios & Sholl, 2000; Pujol-Luz & Barros-Cordeiro, 2012; Brow *et al.*, 2015; Cepeda-Palacios *et al.*, 2015; Ramos-Pastrana *et al.*, 2015; Barros-Cordeiro, *et al.*, 2016; Kanti-Sinha & Mahato 2016; Fukutomi *et al.*, 2017; Salazar-Souza *et al.*, 2018).

Pupários

A diversidade na forma das larvas de Diptera não está restrita a essa fase, os pupários são tão diversos quanto elas. Eles apresentam características próprias, que não são encontradas nas larvas ou nos adultos, como a presença de espinhos e tubérculos (Costa & Ide, 2008).

A diversidade de formas dos pupários permite a identificação do táxon a nível de família na maioria das vezes (Sukontason *et al.*, 2007). Podemos citar como exemplo, os pupários de Stratiomyidae que preservam quase todas as características das larvas de sexto instar e ainda são usados como fonte de estudo taxonômico na identificação da espécie (*e.g.* Pujol-Luz & Pujol-Luz, 2014; Pujol *et al.*, 2016). Os sirfídeos apresentam pupários mais ou menos globoso e o espiráculo respiratório posterior pronunciado, assemelha-se ao formato de um binóculo (Fig. 1.1H) (Mcalpine & Wood, 1989). Os forídeos, além de se aderirem a superfície, possuem um pupário que em corte transversal se assemelha a um trapézio invertido, onde a base seria o lado menor.

Em Schyzophora a maioria das famílias possuem pupários em forma de barril, ou seja, sofrem retração em quase todos os segmentos e principalmente sofre invaginação dos dois primeiros segmentos cefálicos. E embora os últimos segmentos

abdominais sofram retração, os espiráculos não sejam mais funcionais e estejam mais quitinizados, eles preservam a morfologia anterior a esse processo, ou seja, a morfologia da larva.

Algumas características dos pupários já foram usadas como caráter taxonômico para agrupar *Aschyza* (*e.g.* Phoridae e Syrphidae) e *Schyzophora* (*e.g.* Piophilidae e Muscidae). Essas características são: pupários com ou sem linha de clivagem dorsal (ruptura). As linhas de clivagem são geralmente em forma de **H**, na região anterior da pupa e nesse estudo estão presentes desde o início da fase de pupa. Segundo Mcalpine & Wood (1989), a linha de clivagem dorsal só é observada em *Aschyza*. Além destas estruturas morfológicas remanescentes das larvas como a distribuição dos espinhos ao longo dos segmentos, a morfologia do espiráculo respiratório posterior e o esqueleto cefalofaríngeo da larva, podem auxiliar na identificação dos pupários, em situações onde não é possível identificar a mosca adulta.

Todas as estruturas que surgem nos pupários e pupas como as linhas de clivagem, espiráculos e espinhos possibilitam fazer um registro temporal, ou seja, quando surgem permitem identificar quanto tempo e em qual etapa do desenvolvimento a pupa está. Além disso, essas estruturas em conjunto, auxiliam na identificação do táxon de modo célere. Essa rapidez é essencial, principalmente, nos casos em que os insetos se tornam instrumentos, material de custódia, em questões judiciais, por exemplo, para realizar estimativas de intervalo de morte mínimo (IPM).

Os pupário de *Muscomorpha* preservaram características remanescentes das larvas, como o esqueleto cefalofaríngeo e o espiráculo respiratório posterior. Essas estruturas já foram usadas em chaves de identificação para Calliphoridae (Greenberg & Szyska, 1984; Whitworth, 2003). Essas estruturas e outras próprias da fase de pupa, como a projeção do espiráculo respiratório, são pouco exploradas na elaboração de estudos taxonômicos e de identificação, como a chave dicotômica proposta por Sukontason *et al.* (2007), para pupários de espécies de diferentes famílias. As análises dos cornos respiratórios no MEV de *M. domestica*, *O. obesa* e *M. scalaris* revelaram padrões individuais na distribuição das estruturas que sugerem ser fendas respiratórias. Respectivamente, na primeira espécie, as ‘fendas’ estão distribuídas aleatoriamente e concentradas no ápice do corno; na segunda espécie, as fendas estão posicionadas em linhas verticais e ocupam toda a metade superior; na terceira espécie, as ‘fendas’ formam uma linha em espiral do ápice do corno até a sua metade.

Os resultados obtidos com auxílio do MFA se mostraram promissores para estudos em nanoescala da diversidade dos pupários. Nenhum estudo anterior havia sido realizado com essa ferramenta. Essa nova abordagem pode ser usada em diversos tipos de estudo, inclusive sua aplicação como modelo e fonte de novo material para a nanoengenharia.

De acordo com parâmetros analisados pelo MFA, o quesito dureza não obteve uma diferença significativa entre as amostras. Esse parâmetro pode ter outro resultado se for analisado um segmento diferente do selecionado, pois os pupários de Stratiomyidae são mais rígidos que o de outras famílias, eles possuem além da quitina cristais de carbonato de cálcio impregnados na cutícula. Esse resultado pode estar relacionado a estrutura, ao segmento, selecionado para aquisição da análise (anteriormente selecionado e padronizado para todas as espécies estudadas). O sexto segmento ventral dos estratiomídeos possuem na região central uma estrutura chamada de mancha esternal, que é uma região diferenciada de toda a larva e pupa, possui função desconhecida e aparenta ser menos rígida que o próprio pupário. A análise de outra região pode auxiliar a esclarecer esse questionamento.

Entre os anagramas propostos várias inferências de proximidade foram feitas com base nos parâmetros analisados pelo MFA, mas só dois deles se aproximam da realidade filogenética de Diptera: distância média entre picos e vales (R_z) e na elasticidade (Modulo de *Young*). A elasticidade das amostras foi a análise cujo dendrograma apresenta uma relação de similaridade mais próxima ao que é proposto filogeneticamente para Diptera, por exemplo, no Manual de Diptera Nearctica (*e.g.* Mcalpine & Wood, 1989). A elasticidade das amostras é muito usada em estudos de nanomateriais e geralmente caracteriza os materiais de forma a distingui-los, ou seja, é uma constata (*e.g.* Barbosa & Silva, 2011; Silva & Rech, 2013; Khomchu & Malakul, 2017). Por isso, o modulo de *Young* e os demais parâmetros mecânicos e estruturais são análises de potencial uso e aplicação em estudos auxiliares para inferências taxonômicas e filogenéticas.

Além do Modulo de *Young*, os parâmetros R_z e R_{zj} permitem fazer outras inferências com relação à similaridade das espécies. Pode-se observar que Tephritidae e Stratiomyidae estão mais próximos entre si do que as demais famílias. Talvez essa relação seja um reflexo do comportamento alimentar dessas espécies. Entre as cinco, *A. fraterculus* é a única com comportamento alimentar endofágo (fitófago) (Teskey, 1976; Skevington & Dang, 2002) e *H. illucens* se alimenta do substrato da

decomposição realizada por bactérias (Teskey, 1976; Skevington & Dang, 2002), para isso, ela possui aparelho bucal diferente das demais é semelhante a uma escova, enquanto que as outras trata-se de uma foice. Stratiomyidae é um grupo de hábito alimentar saprófago, mas é essencialmente coprófago e necrófago. Calliphoridae e Phoridae são preferencialmente necrófagos, embora possam se alimentar de uma grande variedade de substratos (Skevington & Dang, 2002).

Embora o quesito dureza tenha tido resultado diverso da expectativa inicial e não tenha sido significativo, os gráficos refletem a mesma relação filogenética proposta pelo Manual de Diptera Nearctica (Mcalpine & Wood, 1989), que exceto para Stratiomyidae, todos os pupários são descritos com paredes finas e levemente pigmentados. As análises sugerem que Phoridae, Tephritidae, Calliphoridae e Sarcophagidae são, nessa ordem, do mais duro para o mais maleável. Em nossas observações, nessa mesma ordem os pupários são pigmentados do mais claro para o mais escuro, o que também pode ser inferido com base no anagrama da dureza.

Apesar da contribuição dos anagramas, com relação as características estruturais e mecânicas, sejam pequenas a sua aplicação sistemática é promissora para diversos tipos de estudos e aplicação dos resultados na elaboração de chaves de identificação.

CAPÍTULO 2 : DESENVOLVIMENTO INTRA-PUPÁRIO

Pupação em insetos holometábolos é o processo de desenvolvimento que ocorre dentro do pupário, por isso é chamado de *desenvolvimento intra-pupário* (Denlinger & Ždárek, 1994; Pujol-Luz & Barros-Cordeiro, 2012; Barros-Cordeiro *et al.*, 2016). Como o próprio nome sugere, ocorre na fase de pupa, que é a fase intermediária entre as fases de larva e de adulto. É a etapa onde a mudança de forma ocorre de modo mais radical e abrupta de todo o desenvolvimento do inseto (Fraenkel & Bhaskaran, 1973; Denlinger & Ždárek, 1994).

Este processo corresponde a três etapas sequenciais chamadas de: i) pupa criptocefálica: início do desenvolvimento intra-pupário e ocorre após a apólise larva-pupa (histólise), nessa etapa a pupa não possui forma; ii) pupa fanerocefálica (histogênese): é o processo onde se observa a extroversão da capsula cefálica e das estruturas torácicas - pernas e asas; e iii) adulto formado (maturação e diferenciação): corresponde a maior parte do tempo da fase de pupa, essa etapa possui desde seu início a forma “básica” do adulto, e no final do desenvolvimento o Imago/adulto formado (Fraenkel & Bhaskaran, 1973; Pujol-Luz & Barros-Cordeiro, 2012; Barros-Cordeiro *et al.*, 2016; Salazar-Souza *et al.*, 2018).

Diptera

Diptera é o quarto grupo megadiverso e a diversidade de Diptera é tão ampla e numerosa que se pode encontrar moscas em vários habitats e se alimentando de uma grande variedade de recursos (Skevington & Dang, 2002). Mesmo possuindo um número expressivo de representantes, pode-se dizer que pouco se sabe sobre a fase de pupa, para a maioria de suas famílias. Atualmente, grande parte dos estudos sobre

pupas de moscas estão concentrados nas famílias Calliphoridae, Drosophilidae e Sarcophagidae (e.g. Fraenkel & Bhaskaran, 1973; Pujol-Luz & Barros-Cordeiro, 2012; Fukutomi *et al.*, 2017; Salazar-Souza *et al.*, 2018).

As moscas constituem um dos mais importantes grupos de insetos (Amorim *et al.*, 2002, 2009; Skevington & Dang, 2002). A maioria dos dípteros são sarcosaprófagos e por promoverem principalmente, a manutenção da ciclagem de nutrientes, possuem alta relevância para o meio ambiente. Ademais, podem ser parasitas, parasitoides, predadoras e polinizadoras (Teskey, 1976; Skevington & Dang, 2002).

Assim, o objetivo desse estudo é descrever a cronologia do desenvolvimento intra-pupário e os eventos que resultam na formação do adulto, para: *Hermetia illucens* (Linnaeus, 1758), *Megaselia scalaris* (Loew, 1966), *Piophilha casei* (Linnaeus, 1758), *Fannia pusio* (Wiedemann, 1830), *Musca domestica* (Linnaeus 1758) e *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794). E dessa forma, apresentar resultados que possibilitem auxiliar e fornecer subsídios para maiores esclarecimentos sobre a fase de pupa em Diptera.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta e criação

Descrita no capítulo de coleta e criação (Página 24).

Todas as espécies foram criadas sob condições controladas de temperatura, luz e umidade em câmara climatizada (BOD), regulada para $27 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$, $60 \pm 10\%$ UR, 12 h de fotoperíodo (*H. illucens* e *C. megacephala*) e $23 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$, $60 \pm 10\%$ UR, 12h de fotoperíodo (*M. scalaris*, *P. casei*, *F. pusio* e *M. domestica*).

Fixação para análise do desenvolvimento em Microscopia de Luz

Foi observado para todas as espécies o processo de formação da pupa (vide capítulo 1: processo de pupariação e pupário – Página 31) e a hora zero (início da fase de pupa: ocorre quando termina o processo de pupariação).

Amostras de cada espécie (exceto *H. illucens*) foram fixadas, sendo 10 pupas a cada intervalo de três horas, nas primeiras 48 horas e posteriormente 10 pupas a cada intervalo de seis horas, até a primeira emergência da mosca adulta. Foram fixadas cinco pupas de *H. illucens* a cada intervalo de três horas, nas primeiras 48 horas, e

posteriormente cinco pupas a cada intervalo de 16 horas, até a primeira emergência da mosca adulta (o intervalo maior de fixação e o número menor de amostras foi estabelecido por ser uma espécie de difícil criação, vide capítulo 1: coleta e criação - Página 29).

Todas as pupas foram fixadas e mantidas em solução de Carnoy por 48 horas, depois colocadas em solução de ácido fórmico a 5% por 48 horas. Após esse tempo, as pupas foram retiradas da solução de ácido fórmico e mantidas em álcool 70%. Depois das etapas de fixação as pupas foram dissecadas, observadas e registrada a fase do desenvolvimento; utilizando estereomicroscópio Leica M 205C.

Foram fixadas 125 pupas de *H. illucens*, 500 pupas de *M. scalaris*, 400 pupas de *P. casei*, 410 pupas de *F. pusio*, 410 pupas de *M. domestica* e 250 pupas de *C. megacephala*.

Microscopia Eletrônica de Varredura

Amostras de pupas nas diferentes etapas do desenvolvimento (pupa criptocefálica, pupa fanerocefálica e farados de olhos transparentes, amarelos, rosa e vermelho) foram fixadas em solução de Carnoy por 48 horas, depois mantidas em álcool 70% e pós-fixadas em tetróxido de ósmio por uma hora; lavadas em água destilada; desidratadas em concentrações crescentes de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 100%), cinco minutos em cada concentração; levadas ao processo de secagem ao ponto crítico com CO₂; montadas em *stubs* e metalizadas com ouro; visualização em microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM 7001 F.

RESULTADOS

Todas as espécies (*H. illucens*, *M. scalaris*, *P. casei*, *F. pusio*, *M. domestica* e *C. megacephala*) apresentaram as quatro fases fundamentais do desenvolvimento intra-pupário: apólise larva-pupa, pupa criptocefálica, pupa fanerocefálica e adulto farado (Figs. 2.1-2.3, 2.7). Sob as condições estabelecidas, o tempo mínimo para o desenvolvimento intra-pupário foi de: 252 h para *M. scalaris*, 192 h para *H. illucens*, *P. casei*, *F. pusio*, e *M. domestica* e 96 para *C. megacephala* (Tab. 2.1).

Apólise Larva-pupa

A separação entre a cutícula nova, da pupa, e a cutícula do pupário foi semelhante para todas as espécies. Iniciou na parte média da pupa e seguiu para as extremidades e da região ventral para a dorsal. Nas extremidades, permaneceu um pouco mais aderida por causa do: esqueleto cefalofaríngeo na região cefálica e da traqueia, espiráculo posterior e do intestino (ânus) na região posterior. *H. illucens* apresenta além das características acima, um espaço interno na porção anterior do pupário, os dois primeiros segmentos ficam vazios, ou seja, a pupa não ocupa o espaço interno desses segmentos. Isso por que a pupa sofre uma retração em relação ao pupário, que é diferente das outras espécies conforme descrito anteriormente (vide capítulo 1: processo de pupariação e pupário – Página 31).

O tempo mínimo para que se complete o processo de apólise foi de: três horas para *F. pusio* e *C. megacephala*, seis horas para *H. illucens*, 12 horas para *M. domestica* e *P. casei* e 15 horas para *M. scalaris* (Tabs. 2.1, 2.2 e 2.3).

Pupa criptocefálica

Inicia-se logo após a apólise completa. O pupário solto se torna mais pigmentado e esclerotizado. A mandíbula e a maxila se desprendem do restante do esqueleto cefalofaríngeo e ficam aderidas ao pupário. A pupa, nesse momento, possui forma indefinida e fica envolvida por uma fina membrana (Figs. 2.1, 2.2 e 2.3). Essa etapa durou no mínimo: três horas para *H. illucens* e *C. megacephala*, nove horas para *F. pusio* e *M. domestica*, 12 horas para *M. scalaris* e 21 horas *P. casei* (Tabs. 2.1, 2.2 e 2.3).

Pupa fanerocefálica

Corresponde ao processo de evaginação da capsula cefálica e dos apêndices torácicos. Formação da cabeça, tórax e abdômen. Esse processo durou no mínimo: três horas para *P. casei*, *M. domestica* e *C. megacephala*, seis horas para *F. pusio*, 12 horas para *H. illucens* e 21 horas para *M. scalaris* (Tabs. 2.1, 2.2 e 2.3).

Adulto farado

É a etapa mais longa do desenvolvimento pupal, proporcionalmente corresponde a mais de 50% do tempo total da fase de pupa (Tabs. 2.1, 2.2 e 2.3) (Fig. 2.10). Em todas as espécies, exceto *H. illucens*, o par de espiráculos protorácicos formam uma projeção lateral, em forma de uma trompa cilíndrica, que se liga ao

pupário (Figs. 2.3C-E, 2.4B-C). Em *H. illucens*, essa projeção lateral ocorre no primeiro segmento torácico e do segundo ao sétimo segmento abdominal, mas no sexto e sétimo segmento o formato de corno respiratório é de coroa (Fig. 2.9). O ápice do corno respiratório em *P. casei*, *M. domestica*, *F. pusio* e *C. megacephala* são semelhantes, sugerem a presença de várias fendas (Figs. 2.4B-C). *M. scalaris* as fendas formam uma sequência helicoidal no terço superior do corno. (Fig. 2.3E).

A maturação e a diferenciação que ocorre nessa etapa é sequencial. Existem algumas características que permitem registrar o tempo, de acordo com o desenvolvimento e a pigmentação dos omatídeos dos olhos compostos (OC) (Figs. 2.5, 2.6, 2.8). A pigmentação dos olhos compostos pode variar de acordo com a espécie. Essa pigmentação está relacionada diretamente com o grau de desenvolvimento dos olhos compostos e do farado. Além disso, é possível observar o surgimento e pigmentação de pelos, cerdas e do desenvolvimento e pigmentação das asas, nervuras, pernas e de espinhos, quando houver (Figs. 2.1, 2.2, 2.7). Embora o desenvolvimento seja semelhante, todas as espécies apresentaram características individuais que permitem a sua identificação ainda dentro do pupário. O início de cada etapa e o tempo de desenvolvimento mínimo, em horas, pode ser visto na tabela 2.1.

- i) O adulto farado de *H. illucens* apresentou como características na etapa de: oc transparentes – cabeça, tórax e abdômen definidos, sem definição dos olhos compostos, aparelho bucal e antena. Oc rosa – é possível identificar o halter e as pernas estão bem definidas. Oc vermelho – asas parcialmente membranosas; pelos e cerdas pouco pigmentadas. Oc marrom – observa-se a segmentação da antena e as estruturas do aparelho bucal; asas membranosas, com venação presente e pigmentada; coxas e pernas pigmentadas (Figs. 2.7, 2.8).
- ii) O adulto farado de *M. scalaris* apresentou como características na etapa de: oc transparente – o início da inserção do corno respiratório no orifício pré-existente no pupário, em direção ao meio externo; cabeça, tórax e abdômen pouco definidos. Oc amarelo – olhos bem marcados e pigmentados; início da formação e pigmentação de pelos, cerdas e pernas; halter visível; nessa etapa é possível fazer a separação entre macho e fêmea; manchas verticais do tórax visíveis. Oc rosa – asas parcialmente membranosas; manchas transversais do

abdômen visíveis. Oc vermelho – asas membranosas; cerdas, pelos e pernas muito pigmentadas (Figs. 2.2C-E).

- iii) O adulto farado de *P. casei* apresentou como características na etapa de: oc transparente – pouca definição entre cabeça, tórax e abdômen. Oc amarelo – estruturas bem definidas do aparelho bucal e olhos; pelos e cerdas pouco pigmentados; é possível observar a mancha do esclerito occipital definida e muito pigmentada; pode-se separar macho e fêmea; o edeago se desenvolve externamente ao abdômen, dando-lhe volta na sua porção final (Figs. 2.1H-I). Oc vermelho – quetotaxia completa e muito pigmentada, assim como as antenas e as pernas; asas membranosas (Figs. 2.1, 2.3A-B, 2.5).
- iv) O adulto farado de *F. pusio* apresentou como características na etapa de: oc transparente – cabeça, tórax e abdômen, pouco definidos. Oc amarelo – olhos delimitados e por isso é possível fazer a sexagem em olhos dicópticos machos e holópticos fêmeas; pelos e cerdas pigmentadas; as cerdas do tórax e do abdômen se destacam, muito desenvolvidas; início da pigmentação das manchas do tórax e das intersegmentares do abdômen. Oc rosa – asas parcialmente membranosas; quetotaxia e espinhos, que auxiliam na identificação da espécie, muito desenvolvidos e pigmentados. Oc vermelho – adulto formado, pitilíneo desenvolvido e inflado (Figs. 2.3F-H).
- v) O adulto farado de *M. domestica* apresentou como características na etapa de: oc transparente – cabeça, tórax e abdômen pouco definidos. Oc amarelo – olhos compostos, aparelho bucal, antena e arista desenvolvidos; início da pigmentação de pelos e cerdas. Oc rosa – quetotaxia completa; asa membranosas, com venação visível e pigmentada; manchas do tórax e abdômen pigmentadas. Oc vermelho – adulto formado, pitilíneo desenvolvido e inflando (Fig. 2.2, 2.4).
- vi) O adulto farado de *C. megacephala* apresentou como características na etapa de: oc transparente – cabeça, tórax e abdômen pouco definidos. Oc amarelo – é possível fazer a identificação entre macho e fêmea pela distância dos olhos compostos; nessa espécie o tamanho dos olhos compostos e o formato dos omatídeos também facilitam a sua identificação; início da formação e pigmentação das manchas transversais do abdômen. Oc rosa – asas membranosas; quetotaxia desenvolvida e pigmentada; cerdas do meron e do

catepisterno bem desenvolvidas. Oc vermelho – adulto formado, pitilíneo desenvolvido e inflando.

Tabela 2.1. Tempo desenvolvimento intra-pupário para seis espécies de Diptera, mínimo em horas (h), para cada etapa do desenvolvimento.

Espécie	Evento	Tempo (h)	Média	±	S.D.	Variação (h)	n
<i>Hermetia illucens</i>	Apólise larva-pupa	6	4,8	±	1,1	(00-12)	18
	Pupa criptocefálica	3	15,3	±	1	(06-16)	12
	Pupa fanerocefálica	12	14,3	±	2,1	(09-21)	9
	Adulto farado (oc)						
	Transparente	43	40,3	±	1,9	(21-28)	53
	Amarelo	32	92	±	6,6	(64-128)	8
	Rosa	48	139,3	±	7	(96-176)	10
	Vermelho	48	171,7	±	4,7	(144-192)	15
<i>Megaselia scalaris</i>	Apólise larva-pupa	15	10,7	±	8,5	(00-45)	75
	Pupa criptocefálica	12	34,5	±	16,6	(15-90)	57
	Pupa fanerocefálica	21	49,5	±	17,3	(27-102)	66
	Adulto farado (oc)						
	Transparente	48	91,9	±	25,9	(48-156)	74
	Amarelo	120	162,4	±	33,9	(96-216)	166
	Rosa	12	226,3	±	6,2	(216-240)	33
	Vermelho	24	242,3	±	7,9	(228-252)	29

h, horas; S.D., desvio padrão; n, número de amostras; oc, olhos compostos.

Tabela 2.1 (continuação). Tempo desenvolvimento intra-pupário para seis espécies de Diptera, mínimo em horas (h), para cada etapa do desenvolvimento.

Espécie	Evento	Tempo (h)	Média	±	S.D.	Variação (h)	n
<i>Piophilha casei</i>	Apólise larva-pupa	6	5,9	±	4,6	(00-18)	46
	Pupa criptocefálica	21	20	±	5,9	(06-30)	44
	Pupa fanerocefálica	3	30,3	±	2,2	(27-45)	9
	Adulto farado (oc)						
	Transparente	18	40	±	5,6	(30-54)	59
	Amarelo	108	101,5	±	29,9	(48-150)	172
	Rosa	24	166,4	±	7,5	(156-180)	43
	Vermelho	12	185,7	±	4,7	(180-192)	27
<i>Fannia pusio</i>	Apólise larva-pupa	3	5,7	±	6,4	(00-24)	33
	Pupa criptocefálica	9	14,8	±	8,7	(03-36)	33
	Pupa fanerocefálica	6	25,1	±	9,7	(12-45)	35
	Adulto farado (oc)						
	Transparente	24	34,3	±	8,5	(18-48)	54
	Amarelo	66	95,1	±	33,4	(42-174)	166
	Rosa	54	145,8	±	18,3	(108-186)	46
	Vermelho	30	180,8	±	8,6	(162-192)	43

h, horas; S.D., desvio padrão; n, número de amostras; oc, olhos compostos.

Tabela 2.1 (continuação). Tempo desenvolvimento intra-pupário para seis espécies de Diptera, mínimo em horas (h), para cada etapa do desenvolvimento.

Espécie	Evento	Tempo (h)	Média	±	S.D.	Variação (h)	n
<i>Musca domestica</i>	Apólise larva-pupa	12	7,5	±	6,7	(00-24)	62
	Pupa criptocefálica	9	19,9	±	4	(12-27)	26
	Pupa fanerocefálica	3	27,6	±	4,2	(21-36)	10
	Adulto farado (oc)						
	Transparente	12	35,6	±	8,3	(24-60)	37
	Amarelo	60	66,9	±	20,9	(36-102)	123
	Rosa	24	112,7	±	5	(96-120)	28
	Vermelho	72	155,3	±	20,7	(120-192)	124
<i>Chrysomya megacephala</i>	Apólise larva-pupa	3	2,9	±	3,4	(00-12)	23
	Pupa criptocefálica	3	7,6	±	3,7	(03-15)	11
	Pupa fanerocefálica	3	10,6	±	4,3	(06-21)	13
	Adulto farado (oc)						
	Transparente	6	18	±	8	(09-36)	25
	Amarelo	57	43,5	±	17,1	(15-84)	142
	Rosa	12	81,8	±	6,3	(72-96)	16
	Vermelho	12	91,8	±	4,3	(84-96)	20

h, horas; S.D., desvio padrão; n, número de amostras; oc, olhos compostos.

Tabela 2.2. Tempo mínimo, em horas, do desenvolvimento intra-pupário de seis espécies de Diptera e a sua porcentagem em relação ao tempo total mínimo do desenvolvimento na fase de pupa.

Evento	<i>Hermetia illucens</i>	%	<i>Megaselia scalaris</i>	%	<i>Piophilidae casei</i>	%	<i>Fannia pusio</i>	%	<i>Musca domestica</i>	%	<i>Chrysomya megacephala</i>	%
Apólise larva-pupa	6	3,1	15	6,0	6	3,1	3	1,6	12	6,3	3	3,1
Pupa criptocefálica	3	1,6	12	4,8	21	10,9	9	4,7	9	4,7	3	3,1
Pupa fanerocefálica	12	6,3	21	8,3	3	1,6	6	3,1	3	1,6	3	3,1
Adulto farado (oc)												
Transparente	43	22,4	48	19,0	18	9,4	24	12,5	12	6,3	6	6,3
Amarelo	32	16,7	120	47,6	108	56,3	66	34,4	60	31,3	57	59,4
Rosa	48	25,0	12	4,8	24	12,5	54	28,1	24	12,5	12	12,5
Vermelho	48	25,0	24	9,5	12	6,3	30	15,6	72	37,5	12	12,5
Tempo total-horas	192		252		192		192		192		96	

oc, olhos compostos

Tabela 2.3. Comparação do tempo mínimo, em horas, para cada evento do desenvolvimento intra-pupário.

Evento	<i>Cochliomyia macellaria</i>	<i>Lucilia cuprina</i>	<i>Lucilia Cuprina</i>	<i>Musca domestica</i>	<i>Sarcophaga bullata</i>
	23.0 ± 1.0°C	23.0 ± 1.0°C	30°C	30°C	24°C
Apólise larva-pupa	06 (5%)	06 (2.8%)	04 (2.8%)	09 (9.3%)	28 (8.6%)
Pupa criptocefálica	06 (5%)	09 (4.4%)	04 (2.8%)	07 (7.4%)	18 (5.6%)
Pupa fanerocefálica	03 (2.5%)	03 (1.4%)	08 (5.6%)	12 (12.5%)	26 (8%)
Adulto farado (oc)					
Transparente	15(12.5%)	06 (2.8%)			
Amarelo	48 (40%)	132 (62.8%)	128 (88.8%)	68 (70.8%)	252 (77.8%)
Rosa	12 (10%)	18 (8.6%)			
Vermelho	30 (25%)	36 (17.2%)			
Tempo total	120 (100%)	210 (100%)	144 (100%)	96 (100%)	324 (100%)
Referências	Barros-Cordeiro <i>et al.</i> (2016)		Barritt & Birt (1971)	Fraenkel & Bhaskaran (1973)	Fraenkel & Bhaskaran (1973)

Tabela 2.3 (continuação). Comparação do tempo mínimo, em horas, para cada evento do desenvolvimento intra-pupário.

Evento	<i>Sarcophaga bullata</i>	<i>Phormia regina</i>		<i>Oestrus ovis</i>	<i>Chrysomya albiceps</i>
	25°C	22°C	29°C	16 - 32°C	26.0 ± 1.0°C
Apólise larva-pupa	10 (3.7%)	09 (6.1%)	07 (7.8%)	18 (3.6%)	03 (3.4%)
Pupa criptocefálica	26 (9.7%)	14.5 (9.7%)	09 (10%)	30 (5.9%)	03 (3.4%)
Pupa fanerocefálica	12 (4.5%)	18.5 (12.4%)	09 (10%)	72 (14.3%)	03 (3.4%)
Adulto farado (oc)					
Transparente	-	10 (6.7%)	03 (3.3%)	48 (9.5%)	12 (13.3%)
Amarelo	96 (36.7%)	29 (19.5%)	10 (21.1%)	168 (33.4%)	39 (43.3%)
Rosa	48 (18.2%)	7 (4.7%)	05 (5.6%)	72 (14.3%)	06 (6.6%)
Vermelho	72 (27.2%)	61 (40.9%)	38 (42.2%)	96 (19%)	24 (26.6%)
Tempo total	264 (100%)	149 (100%)	90 (100%)	504 (100%)	90 (100%)
Referências	Sivasubramanian & Biagi (1983)	Greenberg (1991)		Cepeda-Palacios & Scholl (2000)	Pujol-Luz & Barros-Cordeiro (2012)



Figura 2.1. Imagens obtidas com microscopia de luz (estereomicroscópio). Sequência morfológica do desenvolvimento intra-pupal de *Piophilidae casei*. A) Pupa criptocefálica, vista ventral; B) Pupa fanerocefálica, vista ventral; C) Adulto farado de olhos transparentes, vista dorsal; D) Adulto farado de olhos amarelos, vista dorsal; E) Adulto farado de olhos amarelos, vista ventral (seta: fêmea); F) Adulto farado de olhos vermelhos, vista lateral (seta: membrana pupal) e G) vista ventral (seta: edeago); H) Detalhe do edeago no farado de olhos amarelos (seta: edeago) e I) Farado de olhos vermelhos (seta: edeago). Abreviaturas: a, antena; ce, olhos compostos; es, esqueleto cefalofaríngeo; L, pernas; p, proboscidae; w, asas, * extroversão das pernas. Escala: 1,0 mm.

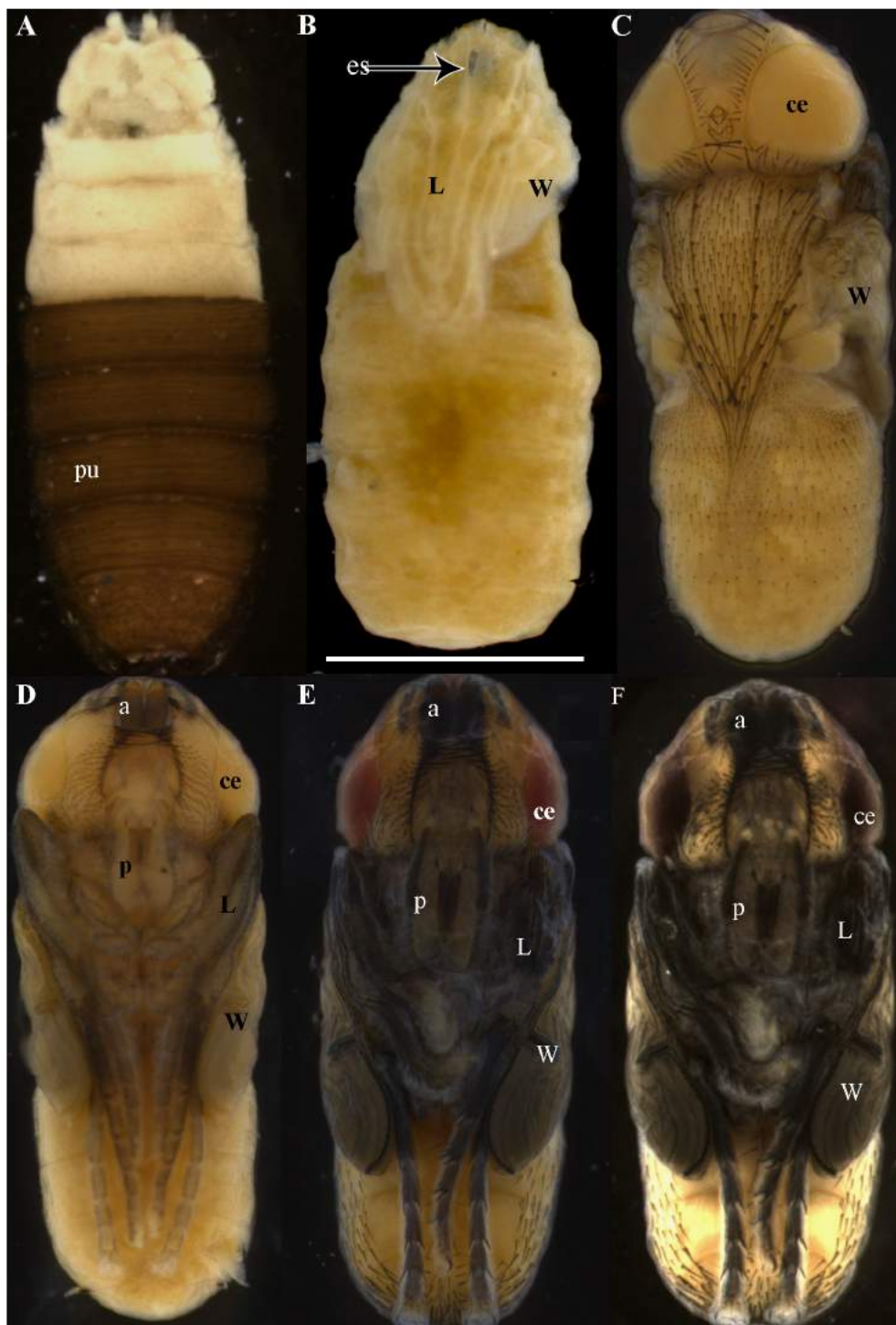


Figura 2.2. Imagens obtidas com microscopia de luz (estereomicroscópio). Sequência morfológica do desenvolvimento intra-pupário de *Musca domestica*. A) Pupa criptocefálica, vista ventral; B) Pupa fanerocefálica, vista ventral; C) Adulto farado de olhos amarelos, vista dorsal; D) Adulto farado de olhos amarelos, vista ventral; E) Adulto farado de olhos rosa, vista ventral; F) Adulto farado de olhos vermelhos, vista ventral. Abreviatura: a, antena; ce, olhos compostos; es, esqueleto cefalofaríngeo; L, pernas; p, proboscide; w, asas. Escala: 0,5 mm.

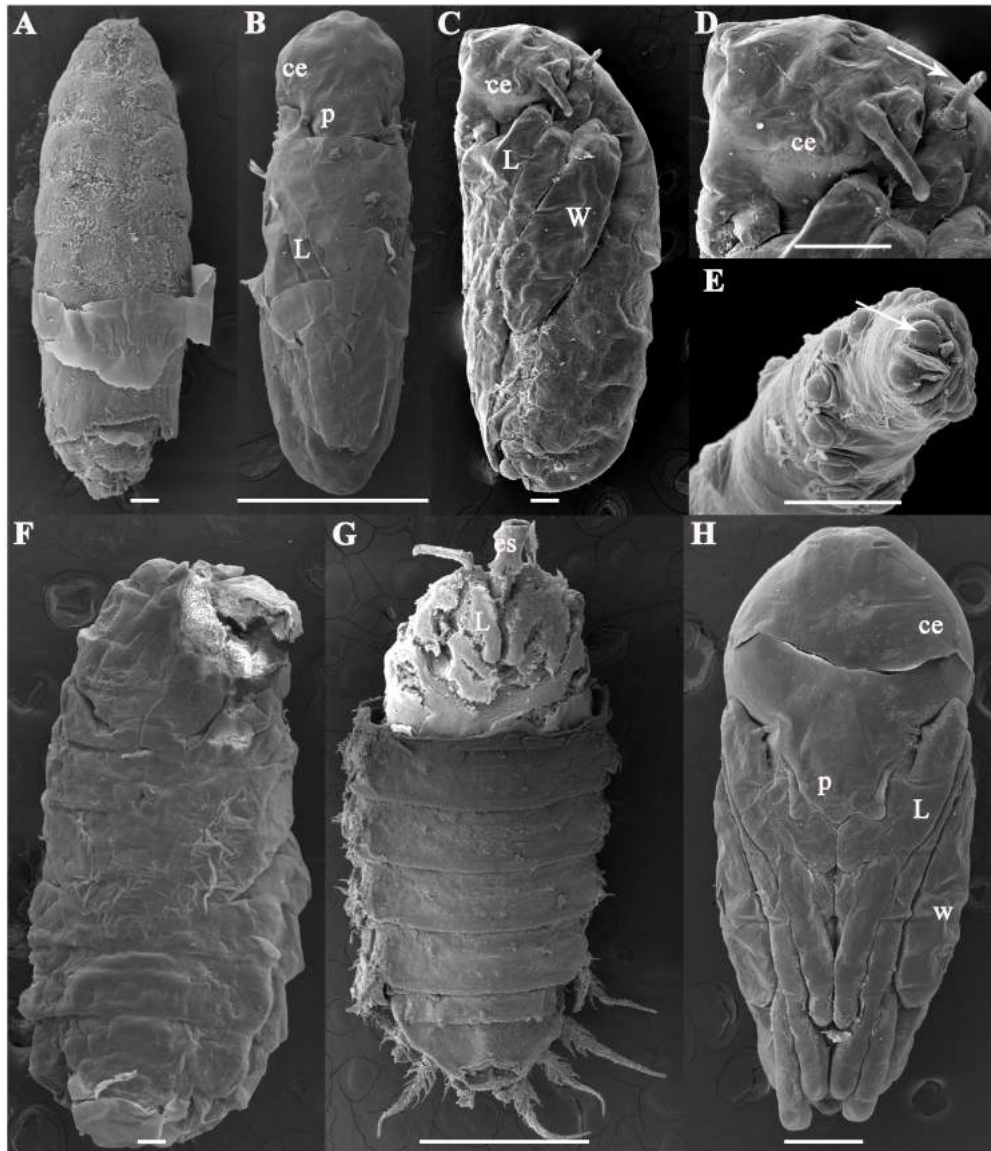


Figura 2.3. Microscopia eletrônica de varredura do desenvolvimento intra-pupário em Diptera. *Piophilidae casei* (A) Pupa criptocefálica (B) e adulto farado de olhos transparentes; *Megaselia scalaris* (C) adulto farado de olhos transparentes, (D) detalhe da região cefálica do adulto farado (seta: corno respiratório) e (E) detalhe do corno respiratório (seta: fenda do corno respiratório e sequencia em espiral no terço superior); *Fannia pusio* (F) pupa criptocefálica, (G) pupa fanerocefálica e (H) adulto farado de olhos transparentes. Abreviaturas: ce, olhos compostos; L, pernas; W, asas. Escalas 100 μm (A, C, D, F), 10 μm (E) e 1 mm (B, G, H).

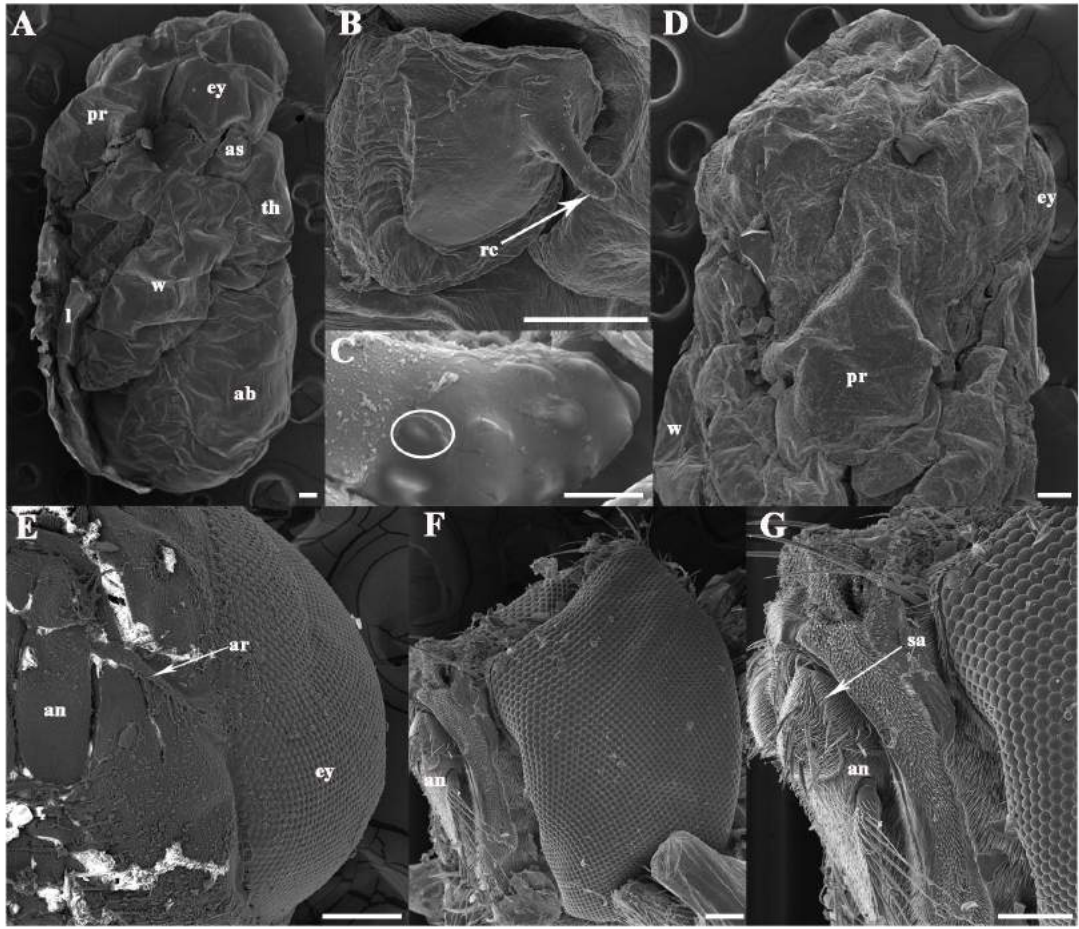


Figura 2.4. Microscopia eletrônica de varredura do desenvolvimento intra-pupário de *Musca domestica*. A) vista lateral do adulto farado, olhos transparentes; B) espiráculo pupal anterior (corno respiratório); C) detalhe do corno respiratório; D) vista ventral da cabeça do adulto farado de olhos transparentes; E) vista ventral da cabeça do farado de olhos rosa; F) vista lateral esquerda da cabeça do adulto farado de olhos vermelhos; G) detalhe da antena, vista lateral, do adulto farado de olhos vermelhos. Abreviaturas: ab: abdômen, an: antena, as: espiráculo respiratório anterior; ey: olhos compostos; l: pernas, pr: proboscidae, rc: corno respiratório, sa: sutura da antena, w: asas. Escalas: A, D, E-G (100 μ m) e B-C (10 μ m).

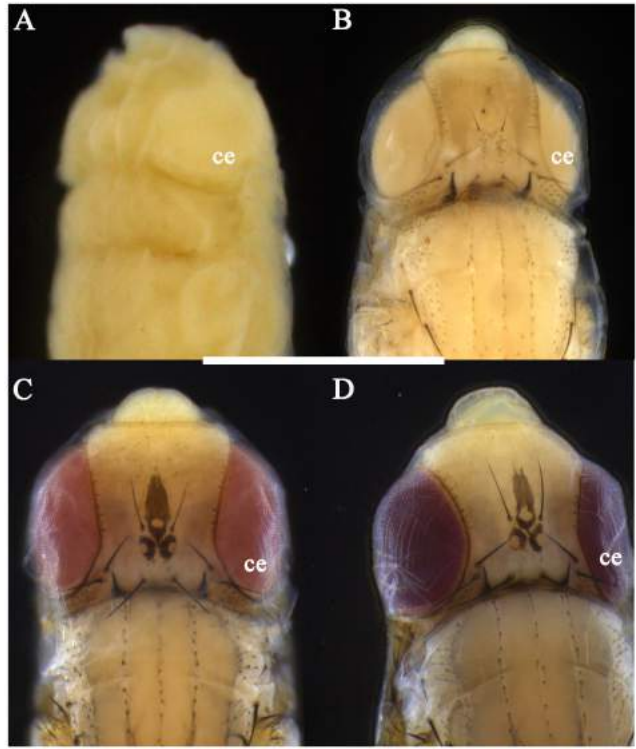


Figura 2.5. Imagens obtidas com microscopia de luz (estereomicroscópio). Adulto farado de *Piophila casei*, desenvolvimento dos olhos compostos. (A) olhos transparentes, (B) olhos amarelos, (C) olhos rosa e (D) olhos vermelhos. Abreviatura: ce, olhos compostos. Escala 1 mm.

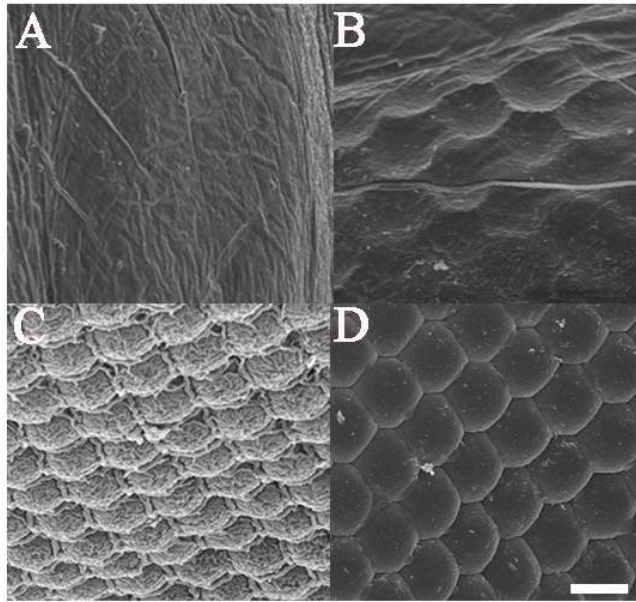


Figura 2.6. Microscopia eletrônica de varredura dos olhos compostos/omatídeos de *Musca domestica*. (A) olhos transparentes, (B) olhos amarelos, (C) olhos rosa e (D) olhos vermelhos. Escala 10 μ m.

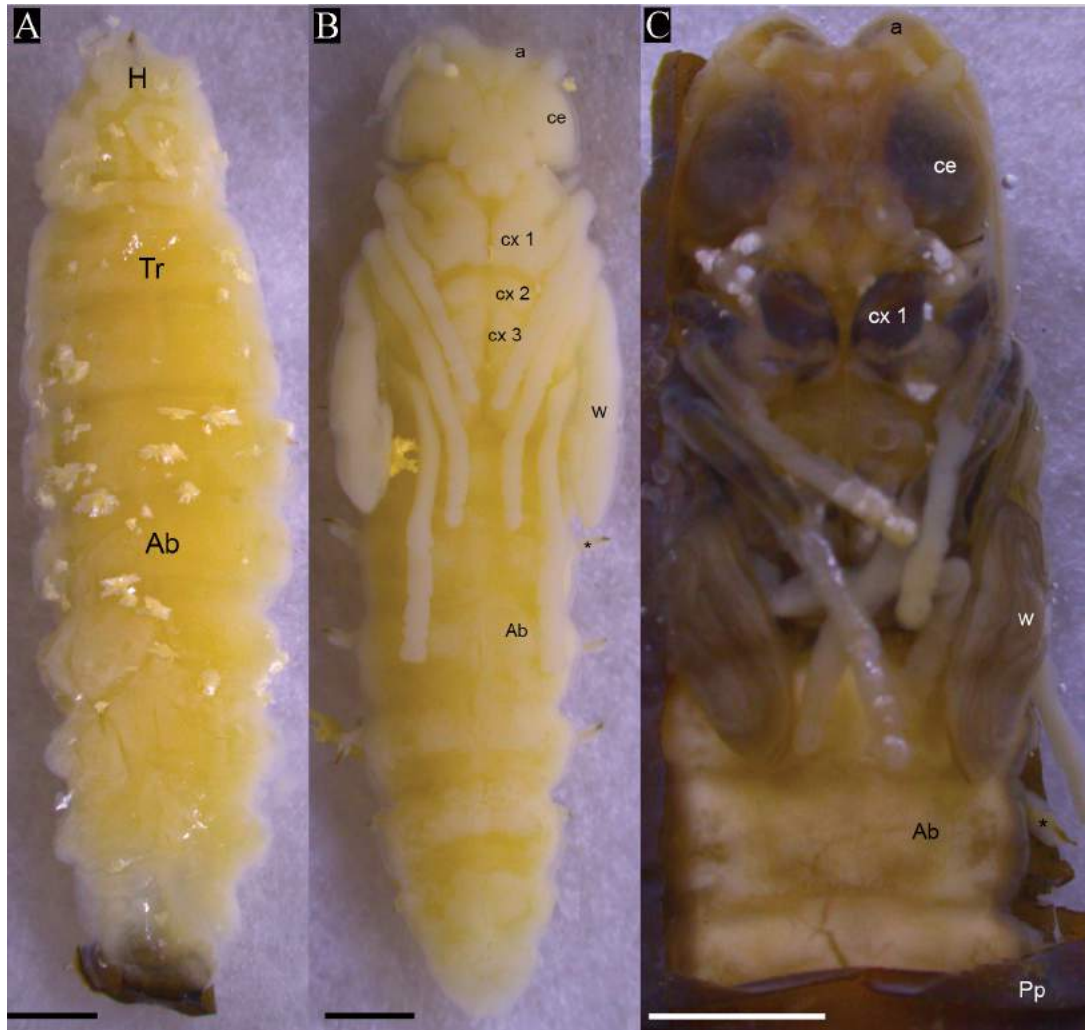


Figura 2.7. Imagens obtidas com microscopia de luz (estereomicroscópio). Desenvolvimento intra-pupário de *Hermetia illucens*. (a) Pupa criptocefálica; (b) adulto farado de olhos compostos amarelo e (c) marrom. Abreviaturas: a, antena; Ab, abdômen; ce, olhos compostos; cx1-3, coxa; H, cabeça; Pp, pupário; Tx, tórax; w, asas. Escala: (a, b) 1,6 mm e (c) 2,5 mm.

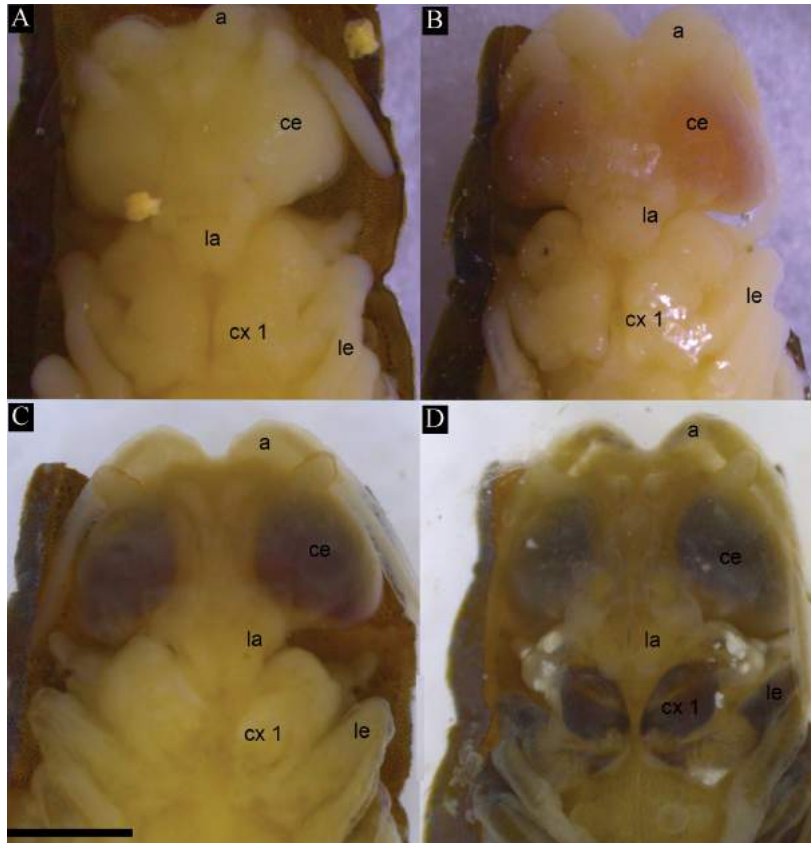


Figura 2.8. Imagens obtidas com microscopia de luz (estereomicroscópio). Adulto farado de *Hermetia illucens*. Olhos compostos (a) amarelo, (b) rosa, (c) vermelho e (d) marrom. Abreviaturas: a, antena; ce, olhos compostos; cx1, coxa; la, labrum; le, pernas; w, asas. Escala: 1,5 mm.

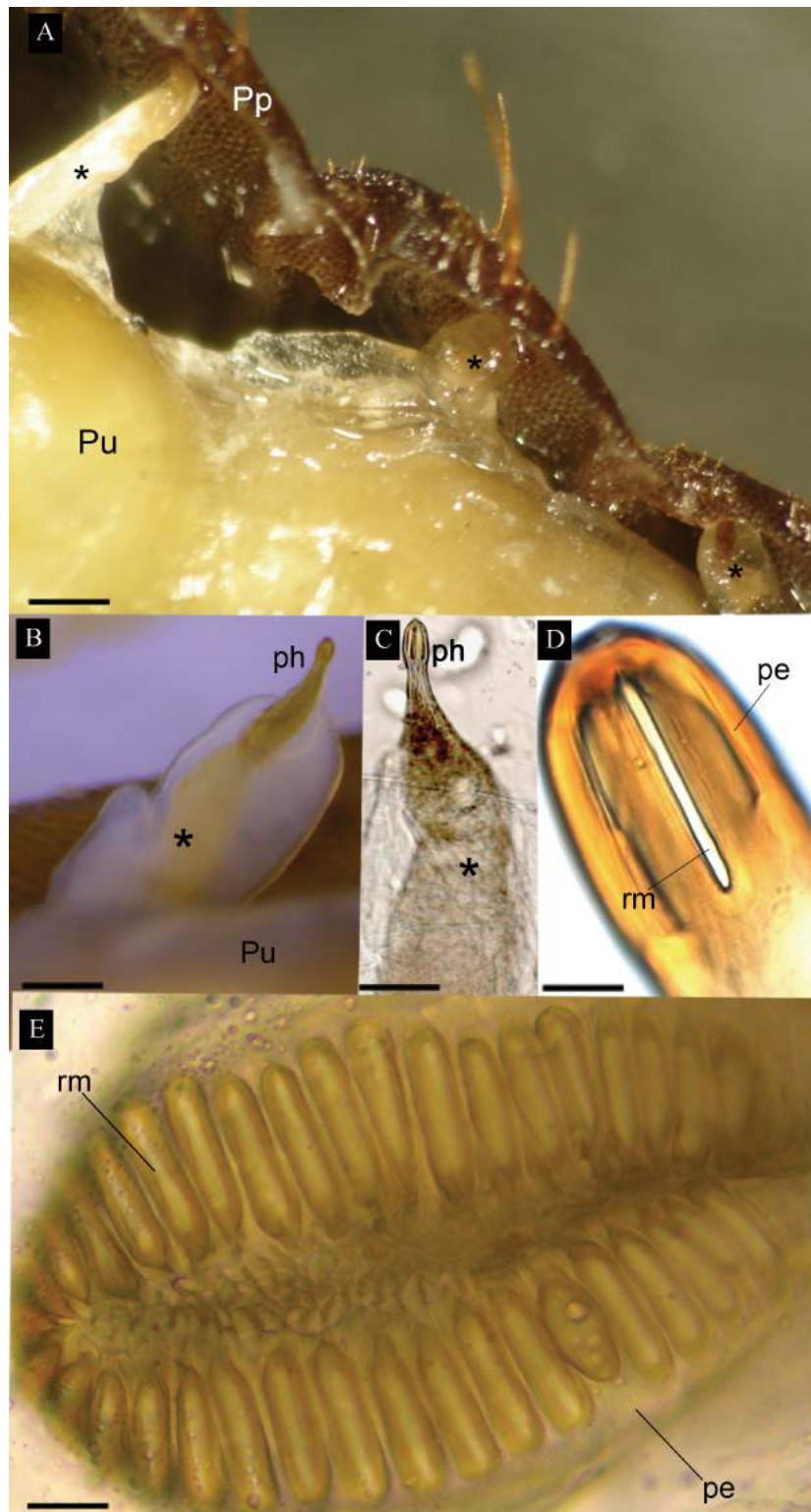


Figura 2.9. Imagens obtidas com microscopia de luz (estereomicroscópio). Morfologia dos cornos respiratórios de *Hermetia illucens*. (a) Projeção lateral do corno respiratório da pupa; (b - c) corno respiratório; (d) fendas do corno respiratório, (e) corno respiratório em formato de coroa. Abreviaturas: pe, peritrema; ph, corno respiratório pupal; Pp, pupário; Pu, pupa; rm, rima; * tubo respiratório. Escala: (a) 0,3 mm, (b) 2,5 mm, (c) 3,4 mm, (d) 0,6 mm, (e) 1,6 mm.

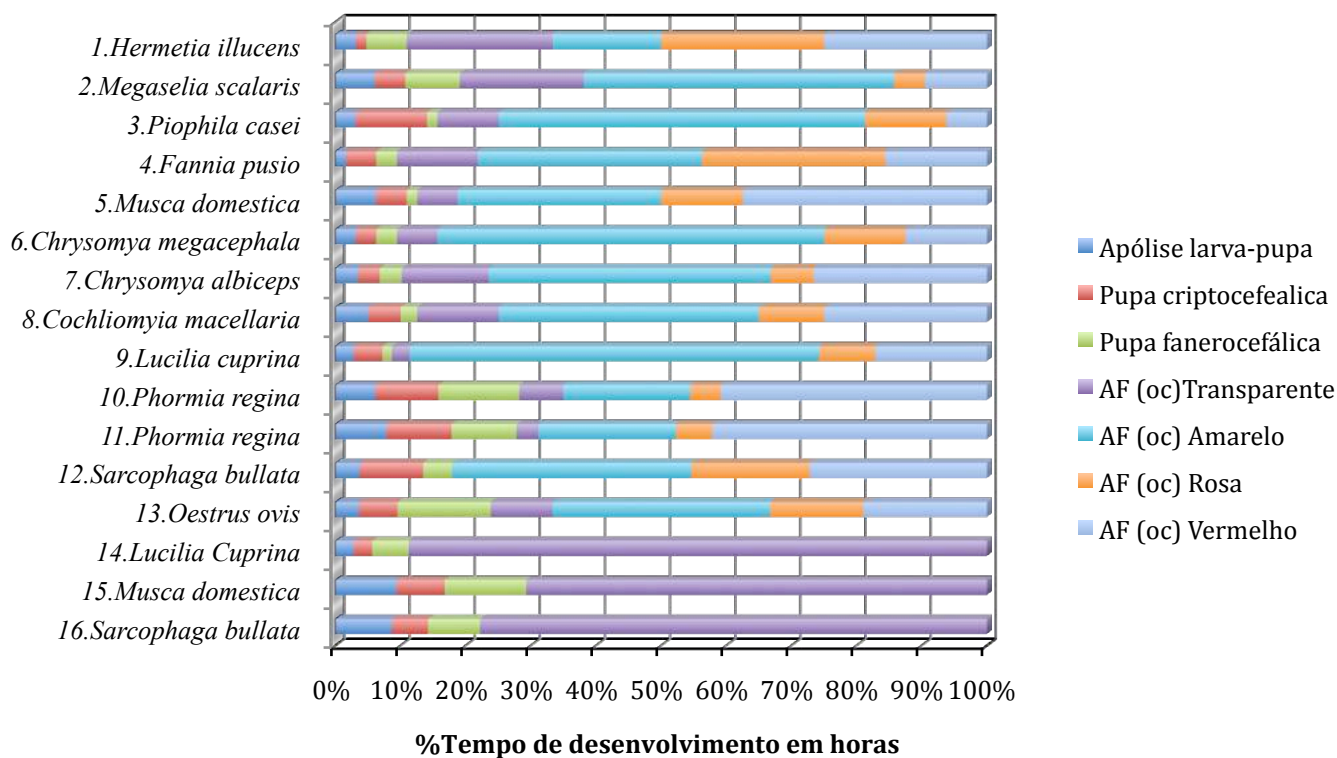


Figura 2.10. Gráfico comparativo do tempo de desenvolvimento intra-pupário para as espécies estudadas e conhecidas; o tempo de desenvolvimento, de cada etapa, foi padronizado em horas e posteriormente em %. **Tempo total da fase de pupa em horas (h):** 1, 192 h; 2, 252 h; 3, 192 h; 4, 192 h; 5, 192 h; 6, 96 h; 7, 90 h; 8, 120 h; 9, 210 h; 10, 149 h; 11, 90 h; 12, 264 h; 13, 504 h; 14, 144h; 15, 96 h; 16, 324 h. **Legenda:** AF (adulto farado); oc (olhos compostos); 1-6 (esse estudo); 7 (Pujol-Luz & Barros-Cordeiro, 2012); 8,9 (Barros-Cordeiro *et al.*, 2016); 10,11 (Greenberg, 1991); 12 (Sivasubramanian & Biagi, 1983); 13 (Cepeda-Palacios & Scholl, 2000); 14-16 não possui descrição da etapa farada (Barritt & Birt, 1971; Fraenkel & Bhaskaran, 1973).

DISCUSSÃO

O desenvolvimento intra-pupário ocorreu de forma sequencial e o processo foi determinado por um conjunto de eventos iguais para todas as espécies, aqui analisadas. Todavia, os dados de uma espécie não podem ser usados como fórmula para outros táxons, mas servem de base para a compreensão do desenvolvimento da fase de pupa, e como ferramenta auxiliar para estudos sobre ontogenia e cronologia, dessa fase.

Os resultados permitiram realizar a identificação da espécie durante o desenvolvimento intra-pupário. E a partir dos dados morfológicos, inferir a idade mínima da pupa, principalmente, quando ela alcança a etapa farada. Essas informações são potenciais ferramentas para a entomologia forense, pois, reconhecer a espécie encontrada no cadáver e determinar sua idade é fundamental em uma investigação judicial, quando não houver tempo hábil para sua criação até a fase adulta (Litjens *et al.* 2001; Schroeder *et al.* 2003; Wells & Stevens, 2008; Oliveira-Costa, 2013).

Desta forma, os dados sobre a cronologia e a morfologia da espécie durante a fase de pupa são essenciais. Estudos realizados com diferentes técnicas e análises com *H. illucens* apresentaram resultados diferentes, mas complementares. O primeiro descreveu o desenvolvimento intra-pupário de *H. illucens* com sete etapas, desde a apólise completa até o adulto farado de olhos compostos marrom (Barros-Cordeiro *et al.*, 2014); o segundo estabeleceu oito etapas, mas somente a partir da etapa farada (Li *et al.*, 2016). As diferentes observações confirmam a necessidade de mais estudos e uma padronização das técnicas e análises. Além de corroborarem com tese de não compartilhamento de dados específicos de tempo, principalmente, para diferentes táxons. A identificação de um número maior de caracteres que possibilitem a identificação cada vez mais rápida e precisa da espécie podem auxiliar na identificação da forma jovem, além de serem extremamente úteis para a identificação correta do espécime para fins de controle sanitário ou para a estimativa de intervalo pos-morte (Sukontason, *et al.*, 2005; Szpila *et al.*, 2012; Mendonça *et al.*, 2013)

Assim, pesquisas nessa área são essenciais e complementares. Contudo, uma padronização mínima na forma de apresentar os resultados e na utilização da terminologia são imprescindíveis para uma melhor compreensão da fase de pupa. Atualmente, os trabalhos abordam de quatro a 18 etapas durante o desenvolvimento intra-pupário (Karabey & Sert, 2014; Barros-Cordeiro *et al.*, 2016; Salazar-Souza *et*

al., 2018). Nós padronizamos em quatro eventos principais, sendo 7 etapas (apólise larva-pupa, pupa criptocefálica, pupa fanerocefálica, adulto farado de olhos: transparente, amarelo, rosa e vermelho).

Usando um microtomografo computadorizado *Calliphora vicina* Robineau-Desvoidy, 1830 foi descrita com quatro etapas de desenvolvimento (Richards *et al.*, 2012). Pupas de duas espécies de Phoridae foram observadas sem a necessidade de sua remoção do pupário, que é pouco pigmentado, isso permitiu a visualização do seu interior. Foram descritas, durante o desenvolvimento intra-pupário, 10 etapas para *M. scalaris* e 11 etapas para *Megaselia spiracularis* Schmitz 1933 (Dian-Xing & Guang-Chun, 2013, 2014). Em *Phormia regina* (Meigen, 1826) foram observadas 10 etapas (Greenberg & Kunich, 2002); *Rhagoletis cerasi* (Linnaeus, 1758) foi descrita com seis etapas para o adulto farado (Papanastasiou & Papadopouos, 2014). Em *Lucilia sericata* (Meigen, 1826) os eventos foram apresentados priorizando a hora em que cada estrutura se apresentava, no total 18 etapas (Karabey & Sert, 2014); método semelhante foi realizado para *Melanoma viatrix* Hendel, 1911, com observações diárias foram descritas 15 etapas, o tempo mínimo estabelecido para a fase de pupa (Moreno *et al.*, 2009), para *Chrysomya putoria* (Wiedemann, 1830), cinco etapas (Proença *et al.*, 2014) e quatro para *C. albiceps* (Pujol-Luz & Barros-Cordeiro, 2012; Salazar-Souza *et al.*, 2018).

A pigmentação dos olhos compostos está relacionada com o grau de desenvolvimento dos omatídeos. Assim, quanto mais desenvolvido mais pigmentado, por isso, as quatro etapas da fase farada podem ser descritas em mais etapas, onde existem escalas de cores e de desenvolvimento intermediários, do mais claro para o mais escuro. Isso foi registrado para *M. scalaris*, a fase farada do desenvolvimento intra-pupário das fêmeas foi estabelecida com 33 momentos e os machos com 27 momentos, seguindo, principalmente, o grau de pigmentação dos omatídeos e das estruturas do corpo (Feng & Liu, 2014).

Ademais, as espécies podem apresentar cores de omatídeos diferente na fase adulta, por exemplo, o adulto de *H. illucens* possui olhos compostos de tonalidade marrom escuro, assim as cores da etapa farada foram: transparente, rosa, vermelho e marrom; já o adulto de *C. albiceps* possui olhos compostos de tonalidade vermelha e as cores da etapa farada foram: transparente, amarelo, rosa e vermelho. Essa diferença de cores complementam a tese de que os dados de uma espécie não podem ser generalizados para outra. Nesse exemplo, *H. illucens* apresentou olhos compostos de

tonalidade vermelha uma etapa antes do que *C. albiceps* apresenta (Barros-Cordeiro et al., 2014; Salazar-Souza et al., 2018).

O fenótipo de coloração dos olhos compostos está relacionado com o grau de desenvolvimento dos omatídeos. Essa análise foi realizada com auxílio de microscópio eletrônico de varredura para *P. casei*, *M. domestica*, nesse estudo, e para *L. cuprina* segundo Barrit & Bird (1971). Todos, confirmaram a hipótese de que o amadurecimento do indivíduo pode ser mensurado de acordo com o grau de desenvolvimento dos omatídeos, independente do fenótipo final.

O tempo mínimo para cada evento do desenvolvimento intra-pupário mostrou-se variável, onde a etapa farada correspondeu a mais de 50% do tempo total da fase de pupa, para todas as espécies analisadas, e não ultrapassou 10% do tempo total para a apólise larva-pupa e para a pupa fanerocefálica. O desenvolvimento só pode ser realizado após a separação entre as cutículas da larva e da pupa e da diferenciação e maturação do adulto farado. Denlinger & Ždárek (1994) descreveram o processo de extroversão da capsula cefálica e dos apêndices torácico como sendo um processo muito rápido e com alto gasto energético e por isso, o tempo de desenvolvimento da pupa criptocefálica e fanerocefálica corresponde a apenas 10%, cada uma, do tempo total da fase de pupa. A etapa fanerocefálica tem início no máximo entre 10 e 20% do tempo total de desenvolvimento e a etapa farado de olhos amarelos é a mais longa de todo o processo, para a maioria das espécies já estudadas; e com 80% do tempo total da fase de pupa é possível observar o Imago, ou seja o adulto formado, com todas as estruturas que permitem a sua identificação, por exemplo, em: *H. illucens*, *M. scalaris*, *P. casei*, *C. albiceps*, *L. cuprina* e *O. ovis* (Cepeda-Palacios & Scholl, 2000; Feng & Liu, 2014; Karabey & Sert, 2014; Barros-Cordeiro et al., 2014, 2016; Salazar-Souza et al., 2018).

A divergência de resultados, entre diferentes estudos, para uma mesma espécie pode estar relacionado com a metodologia de criação e a dieta oferecida à mosca, na fase larval. *M. domestica*, por exemplo, foi criada em uma temperatura muito superior (30°C) àquela que adotamos (23°C) e embora tenha sido uma temperatura mais elevada a espécie só chegou na etapa farada com 30-40% do tempo total, enquanto que com temperatura mais baixa alcançou a etapa farada com 10-20% do tempo total da fase de pupa (Fraenkel & Bhaskaran, 1973). *P. regina*, em um mesmo estudo (Greenberg, 1991), foi observada com variação apenas na temperatura. Provavelmente por isso, as etapas do desenvolvimento foram muito semelhantes proporcionalmente;

a divergência foi observada no tempo total da fase de pupa: mais acelerado, 90 horas, à 29°C e mais demorado, 149 horas, à 22°C.

Assim, como ocorre na fase larval, o desenvolvimento que ocorre na fase de pupa, mesmo sendo sequencial, pode ser mais acelerado ou retardado dependendo da temperatura de criação e da biologia de cada espécie (Denlinger & Zdarek, 1994; Barros-Cordeiro *et al.*, 2016; Salazar-Souza *et al.*, 2018). Ademais, é possível estabelecer um padrão global sem ignorar as características específicas de cada táxon.

Segundo Folguera *et al.* (2010), os indivíduos apresentam uma resposta plástica a variações de temperatura, mas respondem de formas distintas as mesmas variações, ou seja, eles não apresentam uma relação linear entre a fisiologia, a sua história de vida e o meio ambiente. Desta forma, pode-se inferir que o tempo para cada evento do desenvolvimento intra-pupário é guiado por comandos internos, genéticos e por fatores extrínsecos como a temperatura e a dieta disponível na fase larval, por isso é espécie específico (Nijhout *et al.*, 2013, Ureña *et al.*, 2014, 2016; Barros-Cordeiro *et al.*, 2016).

CAPÍTULO 3 : GENES PROMOTORES DA METAMORFOSE

Nos insetos holometabolos os processos de muda e metamorfose estão ligados ao crescimento da larva. Logo, a forma imatura precisa alcançar comprimento e peso mínimos para atingir um ponto crítico e só assim, mudar de instar ou entrar na fase de pupa (Novák, 1975; Nijhout, 1994; Jindra *et al.* 2013).

Do ponto de vista endocrinológico, a mudança de instar larval e o processo de pupação são comandados por dois hormônios principais e fundamentais: a ecdisona e o hormônio juvenil (JH). A ecdisona é a responsável por coordenar o processo de muda e de metamorfose e sua síntese independe da presença do hormônio juvenil. Embora, a presença ou ausência do JH é o que determina o tipo de transformação que vai ocorrer: mudança de instar ou de fase. A presença conjunta dos dois hormônios induz o inseto a mudar de instar, que é uma mudança necessária para o crescimento e desenvolvimento do indivíduo; na ausência do JH - ou sua expressão em níveis não significativos - o inseto inicia a formação da pupa, ao processo de metamorfose e à formação do adulto formado (Riddiford, 1978, 2012; Zhou & Riddiford, 2002; Jindra *et al.* 2013; Ureña *et al.*, 2014, 2016). A ecdisona induz os fatores de transcrição do *Broad* (BR: previamente chamado de “broad-complex” BR-C) que são os responsáveis pela formação da pupa e pelo início do processo de metamorfose (Zhou

et al., 1998; Zhou & Riddiford., 2002). As proteínas BR são membros da família Broad-Tramtrack-Bric-a-brac (BTB) que compartilham um domínio N-terminal comum, considerado importante nas interações proteína-proteína (Zollman *et al.*, 1994).

Análises de RNAi (RNA de interferência) em inseto hemimetábolos e holometábolos revelou que Br-C é essencial para a regulação do desenvolvimento da asa (tamanho e venação) (Erezyimaz *et al.*, 2006; Konopova *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2013). Em indivíduos holometábolos essa função se expandiu para o controle do desenvolvimento da pupa, da morfogênese e da inibição da diferenciação em adultos (Erezyimaz *et al.*, 2006; Suzuki *et al.*, 2008; Konopova *et al.*, 2008, 2011; Huang *et al.*, 2013; Ureña *et al.*, 2014, 2016).

Além do Br-C o E93 é um gene mestre ‘preservado’ responsável pela promoção da metamorfose em insetos hemi e holometábolos (Ureña *et al.*, 2014). A ausência desse gene impede o processo de metamorfose e induz o inseto a sucessivas mudas em hemimetábolos e a repetição do processo de pupariação em holometábolos (Ureña *et al.*, 2014). Além disso, E93 é essencial para reprimir a expressão do Br-C durante os últimos estágios imaturos de insetos hemimetabólicos e holometabólicos, garantindo a transição para as formas adultas (Ureña *et al.*, 2014, 2016).

Nos artrópodes algumas estruturas são as responsáveis por sintetizar os hormônios de muda e metamorfose. O neuropeptídeo protoracicotrópico (PTTH) é produzido pela corpora cardíaca e é o responsável por estimular a secreção das glândulas protorácicas, que por sua vez são responsáveis por produzir e secretar a ecdisona, que é precursora do complexo de ecdisteroides 20-hydroxyecdysone (20E). A corpora allata é quem sintetiza e secreta o hormônio juvenil (JH) (Novák, 1975; Truman & Riddiford, 2002; Costa *et al.* 2006; Ureña *et al.*, 2016).

Em Muscomorpha (Diptera) a corpora cardíaca, a corpora allata, a glândula peritraqueal e a glândula protorácica se fundiram e formaram uma glândula circular em forma de anel (McAlpine & Wood, 1989). Essa glândula produz e libera o hormônio ecdisona para a hemolinfa, que é transportado pelos tecidos periféricos até ser convertida na forma 20E e se ligar aos receptores EcR (Ecdysone receptor) e Usp (Ultraspiracle) (Truman & Riddiford, 2002).

Portanto, o processo de metamorfose é extremamente complexo e a função e expressão de um determinado gene pode ser uma ferramenta útil para a identificação da idade do inseto na fase de pupa, principalmente para estudos sobre ontogenia e sua aplicação no controle biológico de pragas e para as ciências forense. O objetivo desse estudo é avaliar a expressão do gene *Broad* e E93 em diferentes momentos do desenvolvimento intra-pupário: da formação da pupa até o adulto farado de *Drosophila melanogaster* (pré-pupas, pupa hora zero, pupa criptocefálica/fanerocefálica e farado olhos amarelos e farado olhos vermelhos).

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção das amostras

Pré-pupas e pupas de *Drosophila melanogaster* foram obtidas por meio da colônia mantida em laboratório (*Vide capítulo* coleta e criação – Página 24). As pupas foram separadas de acordo com a fase desejada e pesadas para obter no mínimo 30 mg de amostra/etapa de desenvolvimento (pré-pupas, pupa hora zero, pupa criptocefálica/fanerocefálica, farado de olhos amarelos e farado de olhos vermelhos).

Fixação

As amostras foram fixadas em 1,0 ml de solução de RNALater e mantidas por cerca de 12 horas à 4°C e posteriormente conservadas à -80°C até o processamento.

Extração

As amostras foram retiradas do freezer -80°C e o RNA extraído com mini kit (RNA purelink 250 reações). Antes de começar: a bancada foi limpa com álcool 70% e RNase ZAP; a centrifuga ligada e refrigerada para a temperatura de 4°C; e separado todo o material.

Protocolo: Lise e homogeneização da amostra com trizol, por cinco min em temperatura ambiente; adicionado 200 µl de clorofórmio RNase free; depois a amostra foi mantida em temperatura ambiente por três minutos; na sequência foi centrifugada a 10.000 rpm por 15 minutos a 4°C; com uma pipeta p200 retirada apenas a fase límpida e colocada em novo microtubo RNase free; adicionado etanol

70% RNase free (usado mesmo volume da fase lípida) - o etanol usado foi o P.A. diluído em água tratada com DPEC- e misturado o etanol por inversão a fase lípida. Foi transferido 700 µl para a coluna Rneasy + tubo coletor de 2,0 ml (de fundo arredondado); e centrifugado por 15 minutos a 10.000 rpm. Foi descartado o líquido do tubo coletor e remontado a coluna no tubo com cuidado e centrifugado com mais 700 µl da amostra como no passo anterior. Foi adicionado a coluna 700 µl de Tampão I (buffer I) e centrifugado por 15 minutos a 10.000 rpm, o líquido do tubo coletor foi novamente descartado; foi adicionado 500 µl de tampão II (buffer II) e centrifugado a 10.000 rpm por dois minutos o líquido do tubo coletor foi novamente descartado; e repetido o passo anterior uma única vez. A coluna ficou seca, sem resto de etanol, e foi inserida em novo tubo coletor de 1,5 ml e adicionado 30 µl de água RNase free do kit; centrifugado por um minuto a 10.000 rpm e congelado a - 80°C imediatamente.

Quantificação do RNA e conversão em cDNA com Kit

Os tubos foram retirados do freezer -80°C e quantificado o RNA no NanoDrop microvolume. Os tubos passaram por um breve spin, o termociclador foi aquecido. O primeiro mix foi adicionado água 1 µl; novo spin e foi adicionado o segundo mix (martemix Villo 2 µl para cada 2,5 µg de RNA), incubado a 25°C/10' - 42°C/60' - 85°C/5'.

Amplificação e Quantificação - qPCR

Foi realizada utilizando os kits SuperScript® III Reverse Transcriptase e QuantiFast SYBR Green PCR Kit. 2,0 µl de cDNA foi diluído 10 x e adicionado a 1 µl de primer sense e 1,0 µl de primer anti-sense (10 pmol cada) (Tabela 1), 12,5 µl de Master Mix 2X e água destilada e deionizada suficiente para completar 25 µl de reação. As amostras foram incubadas a 95°C por dois minutos e submetidas a 40 ciclos de 95°C por 30 s e 60°C por 30 s.

Tabela 3.1. Sequência de primers usados no estudo

Referência	Primer	Forward primer (5'–3')	Reverse primer (5'–3')
Hackney <i>et al.</i> (2012).	<i>EcR-RA</i>	ATATGTAGCTGTGCGTGGGTGTGT	AAGACTCCTATGCTGCCACCTCCA
	<i>Usp</i>	CCTGTGCCAAGTGGTCAACAAACA	ACATGTAGTTCTCCCTGTCTTTATAGC
	<i>Rp49</i>	AAGAAGCGCACCAAGCACTTCATC	TCTGTTGTCGATACCCTTGGGCTT
	<i>PTHH</i>	TGGTGACCACCAAACGCAATGATG	ATCAGAAAGCGAGGGAAGTGCAGA
Ureña <i>et al</i> (2016)	<i>Br-C</i>	CATCTGGCTCAGATACAGAACCT	CTTCAGCAGCTGGTTGTTGATGT
	<i>E93</i>	TCCACAGATATGCTGCATATTGTG	AACCGGCTATTGCTATGGGCTGTT
Boehme <i>et al.</i> , 2012	<i>Rpl23</i>	TCGGCAGAGAAAACCATTCAGAA	CCCCCGCATTATCCTCAAAGTATAT

RESULTADOS

Todos os genes apresentaram resposta durante a pupariação (Dm1) e o desenvolvimento intra-pupário (Dm2-Dm5). Na etapa de pré-pupa (Fig. 3.1 Tab. 3.2) o E93, o Br e o Pth apresentaram ΔCt maior que nas outras etapas. Posteriormente, sofreram uma redução e voltaram a subir na etapa final, que corresponde ao imago, ou seja, o adulto formado prestes a sair do pupário (farado de olhos vermelhos - Dm5).

Os menores valores do ΔCt , exceto para *Usp*, foram registrados na etapa farado de olhos amarelos (Dm3). Essa é a etapa em que a mosca permanece por mais tempo, durante toda a fase de pupa; nela ocorre a maior parte do desenvolvimento e amadurecimento da mosca. O ΔCt se manteve baixo na etapa Dm3. A expressão do gene *Usp* manteve-se constante durante quase todo o desenvolvimento, elevou-se na etapa final (Dm5), ele é um gene receptor da ecdisona. Os resultados encontrados eram esperados, pois os genes são mais expressivos na etapa anterior àquela que apresenta a sua resposta, nesse caso a endocrinológica.

Usp é um gene receptor da cascata iniciada pelo *Pth*, sendo assim, em Dm3 a expressão do *Usp* é maior que a do *Pth*, na fase seguinte (Dm4) os valores se aproximam e em Dm5 a expressão do *Pth* é maior. Isso se deve também por ser um gene que dá início a sinalização para a ação dos genes *Br* e *E93*.

A expressão do *Br* em Dm5 é maior que nas três etapas anteriores por ser um dos responsáveis pela apólise pupa-adulto, ou seja, ele é um dos responsáveis por informar ao inseto que o desenvolvimento chegou ao fim, que ele pode emergir para a fase adulta.

Os genes utilizados para controle endógeno não se mantiveram constante ao longo das etapas do desenvolvimento, por isso, as variações podem estar sub/superestimadas.

Tabela 3.2. Resultados da qPCR para as diferentes etapas do desenvolvimento intra-pupário de *Drosophila melanogaster*.

Δ CT	Dm1		Dm2		Dm3		Dm4		Dm5	
	Média	\pm SE	Média	\pm SE	Média	\pm SE	Média	\pm SE	Média	\pm SE
PTTH	10,86	0,07	7,25	0,13	4,86	0,14	6,19	0,02	9,91	0,03
USP	6,76	0,06	5,93	0,02	6,20	0,06	6,23	0,02	8,33	0,04
BR	12,94	0,28	8,73	0,11	8,17	0,08	10,82	0,09	12,93	0,08
E93	15,09	0,19	4,24	0,05	5,48	0,06	4,87	0,04	6,23	0,03

SE, erro padrão; Δ Ct, quantificação do gene alvo. Dm1, pré-pupa; Dm2, pupa hora zero; Dm3, pupa criptocefálica/fanerocefálica; Dm4, farado olhos amarelos; Dm5, farado olhos vermelhos.

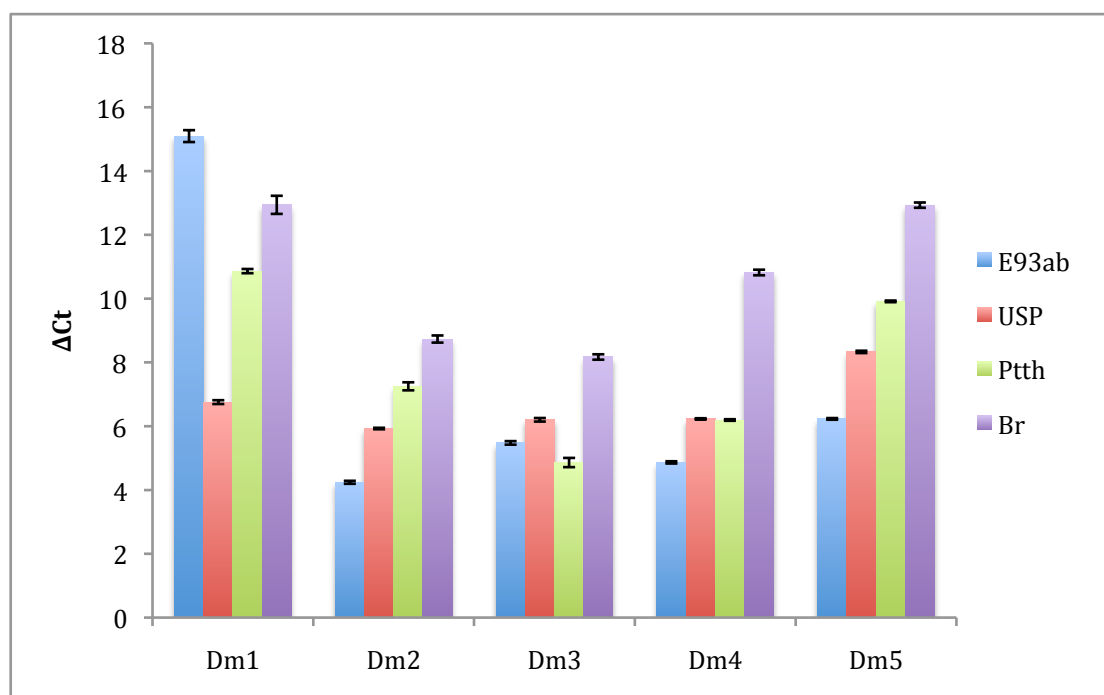


Figura 3.1. Resultados da qPCR para as diferentes etapas do desenvolvimento intra-pupário de *Drosophila melanogaster*. Dm1, pré-pupa; Dm2, pupa hora zero; Dm3, pupa criptocefálica/fanerocefálica; Dm4, farado olhos amarelos; Dm5, farado olhos vermelhos.

DISCUSSÃO

Os níveis elevados de Br e E93 indicam uma maior atuação no processo de pupariação. Alguns estudos demonstraram que o E93 é essencial no processo de apólise larva-pupa, ele é a chave para a morte celular induzida pela ecdisona que ocorre logo após a pupariação (Lee & Baehrecke, 2001; Lee *et al.*, 2002). Nas moscas o Br possui papel fundamental no processo de desenvolvimento das asas, principalmente quanto ao tamanho, forma e formação das veias, além de atuar coordenando toda a morfogênese da pupa, impede a formação prematura do adulto (Erezyimaz *et al.*, 2006; Konopova *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2013; Ureña *et al.*, 2014).

A quantificação desses genes em cada etapa do desenvolvimento, por serem imprescindíveis, podem auxiliar em casos judiciais, pois, permitem inferir ~~uma~~ a idade pupal, mas devem ser avaliados em conjunto com os genes *ptth* e *Usp*. Além disso, os resultados somados à análises morfológicas podem auxiliar nas estimativas de intervalo de morte (Taron & Forane, 2011, Boheme *et al.*, 2013, 2014; Martin-Vega *et al.*, 2017; Zajac *et al.*, 2018).

Como potenciais indicadores da idade da pupa o E93 sinaliza o processo de pupariação com ΔCT médio em 15; o *Ptth* e o *Usp* podem ser usados, em conjunto, para indicar as etapas: apólise larva-pupa, pupa criptocefálica e farado de olhos amarelos, onde o valor mais alto do *Ptth* em relação ao *Usp* indica a primeira etapa, o inverso indica a segunda etapa e valores semelhantes indicam a terceira etapa, respectivamente.

O modelo de aplicação dos genes promotores da pupariação e da pupação em Diptera é recente. O estudo de outros genes marcadores específicos da fase de pupa e uma ampliação desse estudo é necessário para solidificar esses dados a fim de uma aplicação inquestionável não só sobre a idade da pupa, mas também como instrumento para compreender os comandos que guiam todo o desenvolvimento intra-pupário.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

A metamorfose sempre despertou interesse nos seres humanos. Nos insetos foi objeto de estudo e arte há mais de 300 anos, sendo que um dos primeiros registros foi elaborado em 1705 por Maria S. Merian, em seu livro “*Metamorphosis: Insectorum Surinamensium*”. Ela retrata por meio de desenhos as fases de ovo, larva, pupa e adulto, de diversos insetos e anfíbios, todos acompanhados de curtos textos descritivos. Desde então, ao longo dos séculos, o processo de metamorfose, sua origem e a função da fase de pupa são objetos de estudos. Durante esse tempo, as pupas de mosca foram examinadas de diferentes formas e realizadas descrições e análises simples e complexas da morfologia ao estudo molecular.

Acerca desse tema - a fase de pupa – e com base nas nossas observações e análises é possível fazer as seguintes considerações:

- A ultraestrutura dos pupários e suas propriedades mecânicas, obtidas com os microscópios de alta resolução de força atômica e de varredura, permitiram explorar uma nova abordagem em nanoescala. Os pupários apresentaram características diferentes entre as espécies analisadas. Essa nova abordagem tem potencial para ser usada como ferramenta de identificação de espécies de moscas e contribuir para estudos filogenéticos. Além disso, é propício o uso dos pupários como modelo e fonte de novo material para a nanoengenharia.
- O desenvolvimento intra-pupário e a metamorfose em Diptera Brachycera é sequencial, possui sete etapas definidas e sofre influência da temperatura e das calorias ingeridas na fase larval. Além disso, espécies distintas respondem de forma diferente ao mesmo estímulo. Não há isocronismo entre a fisiologia e o meio ambiente, por isso, as características de cada táxon não devem ser ignoradas.

- O processo de metamorfose é iniciado e finalizado por ação de genes específicos e essenciais ao processo de muda e pupação. A quantificação dos genes Br, E93, Usp e Ptth, em cinco etapas pré-estabelecidas do desenvolvimento intra-pupário, permitiu associar sua presença quantitativa a idade da pupa, sendo um importante resultado para compreender onde sua atuação é fundamental: histólise, histogênese ou diferenciação. O E93 obteve um pico no processo de pupariação e o Br é mais atuante no processo de diferenciação. Ambos possuem quantidades que permitem inferir que eles atuam durante todo o processo de desenvolvimento. O pico do Br no final da metamorfose indica que ele é fundamental no processo de emergência da mosca adulta. Esse aspecto pode ser relevante para estudos onde se busca matéria prima para inseticidas, de pragas agrícolas e pecuárias, que não causem danos para humanos e outros animais.

PERSPECTIVAS

- Analisar, com auxílio dos Microscópios Eletrônico de Varredura e de Força Atômica, pupários de outras espécies de Diptera. Além de avaliar se é possível investigar a idade da pupa, por meio do pupário, ao longo do desenvolvimento intra-pupário.
- Estabelecer o tempo de desenvolvimento intra-pupário em diferentes temperaturas e estudar outras espécies de Diptera.
- Testar genes candidatos que possam ser usados para controle endógeno; testar outros genes que possam atuar como marcadores das etapas do desenvolvimento intra-pupário; expandir as análises para a outras espécies.

Adulto farado: É a etapa mais longa do desenvolvimento intra-pupal, corresponde à maturação do adulto (Denlinger & Ždárek, 1994; Cepeda-Palacios & Scholl, 2000)

Apólise: processo de separação e digestão parcial das células epidermais da cutícula velha do inseto e secreção da nova cutícula (Jenkin & Hinton, 1966, Hinton, 1971).

Apólise Larva-Pupa: marca o fim do processo de pupariação. Processo que separa a cutícula da larva modificada, o pupário, da nova epiderme da pupa em formação (Denlinger & Ždárek, 1994).

Ecdise: rompimento da cutícula velha e liberação do inseto, podendo ser de um instar ou estágio (Jenkin & Hinton, 1966, Hinton, 1971).

Eclosão: ação de sair a luz, de surgir. Usado para designar a saída da larva do ovo (Costa *et al.*, 2006).

Emergência: aparecimento, surgimento. Ato no qual o inseto adulto sai do pupário (Borror & DeLong, 1988)

Evento: acontecimento, de caráter eventual. Eventualidade = transitório (Koogan & Houaiss, 1999)

Exúvia: a cutícula velha do inseto deixada após a ecdise (Costa *et al.*, 2006).

Estágio = fase: são etapas do ciclo de vida de um inseto holometábolo (ovo, larva, pupa, adulto) (Hinton, 1946; Costa *et al.*, 2006).

Farado: intervalo entre dois eventos, momento que o inseto se encontra encoberto pela cutícula do instar ou estágio anterior (Hinton, 1946; Costa *et al.*, 2006).

Imago: Imagem. Forma definida do inseto adulto após a evaginação da capsula cefálica e dos apêndices torácicos (modificado de Costa *et al.*, 2006).

Instar: é fisiologicamente definido como o período compreendido entre duas apólises. Usado atualmente para definir cada uma das etapas do estágio larval (Fink, 1983; Costa *et al.*, 2006).

Pupa criptocefálica: ‘cabeça escondida’ ocorre logo após a apólise larva-pupa e termina com a evaginação da cabeça e dos apêndices torácicos. Os discos imaginiais dos apêndices e a vesícula cefálica (gânglio cerebral e cefálico) estão

sob os segmentos do tórax (Imms, 1957; Fraenkel & Bhaskaran, 1973; Denlinger & Ždárek, 1994).

Pupa fanerocefálica: ‘cabeça visível’ ocorre a extroversão, visualização, da capsula cefálica e dos apêndices torácicos. Marca o processo de apólise pupa-adulto (Fraenkel & Bhaskaran, 1973; Denlinger & Ždárek, 1994).

Pupação: finalizado o processo de pupariação, inicia-se logo após a apólise larva-pupa, a pupa formada passa por dois eventos i) extroversão da cabeça e dos apêndices torácicos e ii) desenvolvimento e maturação do adulto formado (Denlinger & Ždárek, 1994).

Pupariação: processo compreendido entre o abandono da dieta, pela larva madura, até a completa imobilização e redução do comprimento larval. Gradualmente ocorre a redução da sua mobilidade e a retração dos segmentos. A cutícula progressivamente fica mais opaca, pigmentada e esclerotizada (Fraenkel & Bhaskaran, 1973; Denlinger & Ždárek, 1994).

Pré-pupa: ocorre na larva madura, período compreendido entre o abandono da dieta pela larva até a formação da pupa (Costa & Vanin, 1985; Costa *et al.*, 2006).

Pupa: termo usado para definir a fase em que o inseto está inativo, ele é incapaz de se alimentar. Ocorre entre o último instar larval e a fase adulta (Hinton, 1946, 1948; Imms, 1957).

Pupário: envoltório formado pelo endurecimento da cutícula do último estágio larval (Hinton, 1946, 1948; Borror & DeLong, 1988).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrel, I.P.S & A.M. Lundquist. 1973. Physiological and biochemical changes during insect development . *In: Rockstein M (ed). The physiology of insecta.* Academic. New York.
- Amendt, J.; R. Zehner & R. Krettek. 2004. Forensic Entomology. *Natuwissenschaften* **91**: 51-65
- Amorim, D.S. 2009. Neotropical Diptera Diversity: Richness, Paterns and Perspectives. *In: Diptera Diversity: Status Challenges e Tools.* T. Pape, D. Bickel & R. Meir (eds). Chater Three. Koninklijke Brill NV.
- Amorim, D.S.; V.C. Silva & M.I.P.A Balbi. 2002. Estado do conhecimento dos Diptera Neotropicais. *In: Costa, C.; Vanin, S.A., Lobo, J.M. & Melic, A., Proyecto de Red Iberoamericana de Biogeografía y Entomologia Sistemática.* SEA, Saragoza 2: 29- 36.
- Barbosa, E.F. & L.P. Silva. 2012. Qualitative and quantitative topographical surface investigation and solvent effects on internal surface of polypropylene tubes. *Surface and Interface Analysis* **44**: 389–394
- Barrit, L.C. & L.M. Birt. 1971. Development of *Lucilia cuprina*: correlation of biochemical and morphological events. *Journal of Insect Physiology* **17**: 1169-1183.
- Barros-Cordeiro, K.B.; J.R. Pujol-Luz; K.P.O. Name & S.N. Bão. 2016. Intra-puparial development of the *Cochliomyia macellaria* and *Lucilia cuprina* (Diptera, Calliphoridae). *Revista Brasileira de Entomologia* **60**: 334-340
- Barros-Cordeiro, K.B. & J.R. Pujol-Luz. 2010. Morfologia e duração do desenvolvimento pós-embrionário de *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae) em condições de laboratório. *Papeis Avulsos de Zoologia* **50 (47)**: 709-717.
- Barros-Cordeiro, K.B.; S.N. Bão & J.R. Pujol-Luz. 2014. Intra-Puparial Development Of The Black Soldier-Fly, *Hermetia Illucens*. *Journal of Insect Science* **14**: 1-10.
- Berlese, A. 1913. Intorno alle metamorfose degli insetti. *Redia* **9**: 121-136.

- Bernhardt, V.; C. Schomerus; M.A. Verhoff & J. Amendt. 2016. Of pigs and men-comparing the development of *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae) on human and porcine tissue. *International of Journal Legal Medicine*. DOI 10.1007/s00414-016-1487-0
- Boehme, P.; P. Spahn; J. Amendt & R. Zehner. 2013. Differential gene expression during metamorphosis: A promising approach for age estimation of forensically important *Calliphora vicina* pupae (Diptera: Calliphoridae). **International Journal of Legal Medicine** **127**: 243-249.
- Boehma et al 2013
- Boehma et al 2014
- Borror, D.J. & DeLong, D.M., 1988. *Introdução ao estudo dos insetos*. São Paulo, SP: Edgar Blucher, Editora. 655p.
- Brown, B.V.; A. Borkent; J.M. Cumming; D.M. Wood; N.E. Woodley & M.A. Zumbado. 2010. **Manual of Central American Diptera**. V 2. p.1031-1039.
- Brown, K.; A. Thorne & M. Harvey. 2015. *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae) pupae: A timeline of external morphological development and a new age and PMI estimation tool. **International Journal of Legal Medicine** **129**: 835-850.
- Buschbeck, E.K.; J.L. Roosevelt & R.R. Hoy. 2001. Eye stalks or no eye stalks: a structural comparison of pupal development in the stalk-eyed fly *Cyrtodiopsis* and *Drosophila*. **The Journal of Comparative Neurology** **433**: 486-498.
- Carvalho, C.J.B. & C.A. Mello-Patiu. 2008. Key to the adults of the most common forensic species of Diptera in South America. **Revista Brasileira de Entomologia** **52 (3)**: 390-406.
- Carvalho, C.J.B.; J.A. Rafael; M.S. Couri & V.C Silva. 2012. Diptera. *In*: Rafael, J. A; Melo, G.A.R.; Carvalho, C.J.B.; Casari, S.A. & Constantino, R. (eds.). **Insetos do Brasil – Diversidade e Taxonomia**. Holos Editora, Ribeirão Preto, 42pp.
- Catts, E.P & M.L. Goff. 1992. Forensic entomology in criminal investigations. **Annual Review of Entomology** **37**: 253-272.
- Cepeda-Palacios R. & P.J. Scholl. 2000. Intra-Puparial Development in *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae). **Journal of Medical Entomology** **37**: 239-245.
- Cepeda-Palacios, R.; C. Ruiz-Ochoa; R. Ramirez-Orduna; C.E. Angulo-Valadez & P. Dorchie. 2015. The puparium structure of the sheep nasal botfly (*Oestrus ovis* L.). **Revue de Médecine Vétérinaire** **166 (7-8)**: 215-220.

- Costa, C. & S. Ide. 2008. Importância e significado taxonômico e filogenético dos caracteres dos imaturos de Insecta em especial dos Coleoptera. In: **Contribuciones taxonômicas en órdenes de insectos hiperdiversos**. 1 ed. México, D.F.: UNAM, RIBES-CYTED, v.1, p. 37-55.
- Costa, C. & Vanin, S.A., 1985. On the concepts of “pré-pupa”, with special reference to the Coleoptera. *Revista Brasileira de Zoologia* 2(6): 339-345.
- Costa, C. 1984. A origem e função da pupa dos Endopterygota. 1. Revisão histórica e considerações gerais. **Ciência e Cultura**: 1126-1134.
- Costa, C.; S. Ide & C.E. Simonka. 2006. **Insetos Imaturos: metamorfose e identificação**. Ribeirão Preto: Holos, Editora. 249p.
- Cunha-e-Silva, S.L. & E.M.V. Milward-de-Azevedo. 1992. Estudo comparado do desenvolvimento de dois morfotipos larvais de *Cochliomyia macellaria* (Fabricius) (Diptera, Calliphoridae). **Revista Brasileira de Zoologia** 9 (3/4): 181-186.
- Dadour, I.R.; D.F. Cook; J.N. Fissioli & W.J. Bailey. 2001. Forensic entomology: application, education and research in Western Australia. **Forensic Science International** 120 (1-2): 48-52.
- Daimon T.; M. Uchibori; H. Nakao; H. Sezutsu & T. Shinoda. 2015. Knockout silkworms reveal a dispensable role for juvenile hormones in holometabolous life cycle. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 112: E4226–E4235. doi: 10.1073/pnas.1506645112
- Defilippo F.; P. Bonilauri & M. Dottori. 2013. Effect of temperature on six diferente developmental landmarks within the pupal stage of the forensically importante blowfly *Calliphora vicina* (Robeneau-Desvoidy) (Diptera: Calliphoridae). **Journal of Forensic Science** 58 (6): 1554-1557.
- Denlinger, D.L. & J. Ždárek. 1994. Metamorphosis behavior of flies. **Annual Review Entomology** 39: 243-266.
- Dian-Xing, F. & L. Guang-Chun. 2013. Pupal age estimation of forensically importante *Megaselia spiracularis* Schmitz (Diptera: Phoridae). **Forensic Science International** 231: 199-203.
- Dian-Xing, F. & L. Guang-Chun. 2014. Pupal age estimation of forensically importante *Megaselia scalaris* (Loew) (Diptera: Phoridae). **Forensic Science International** 231: 199-203.

- Erezyilmaz, D.F.; L.M. Riddiford & J.W. Truman. 2006. The pupal specifier broad directs progressive morphogenesis in a direct-developing insect. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** **103**: 6925-6930. doi: 10.1073/pnas.0509983103
- Ferreira, M.J.M. 1978. Sinantropia de dípteros muscóides de Curitiba, Paraná. I. Caliphoridae. **Revista Brasileira de Biologia** **38**: 445-454.
- Fink, T., 1983. A further note in the use of terms *instar*, *stadium*, and *stage*. *Ann Entomol Soc Am* 76 (3): 316-317.
- Florez, E. & M. Wolff. 2009. Descripción y clave de los estadios inmaduros de las principales especies de Calliphoridae (Diptera) de importancia forense em Colombia. **Neotropica Entomology** **38 (3)**: 418-429.
- Folguera, G.; J. Mensch; J.L. Munoz; S.G. Ceballos; E. Hasson & F. Bozinovic. 2010. Ontogenetic stage-dependent effect of temperature on developmental and metabolic rates in a holometabolous insect. **Journal of Insect Physiology** **56**: 1679-1684.
- Fraenkel, G. & G. Bhaskaran. 1973. Pupariation and pupation in Cyclorhaphous flies (Diptera): terminology and interpretation. **Annual Entomology Society of America** **66**: 418-422.
- Fukutomi, Y.; M. Keiji; K. Agata; N. Funayama & S. Koshikawa. 2017. Pupal development and pigmentation process of a polka-dotted fruit fly, *Drosophila guttifera* (Insecta, Diptera). **Development Genes and Evolution** **227**: 171-180. DOI 10.1007/s00427-017-0578-3
- Gomes, L. & C.J. Von Zuben. 2004. Dispersão larval radial pós-alimentar em *Lucilia cuprina* (Diptera, Calliphoridae): profundidade, peso e distância de enterramento para pupação. **Iheringia** **94 (2)**: 135-138.
- Greenberg, B. & J.C. Kunich. 2002. **Entomology and the law: Flies as Forensic indicators**. University press, Cambridge, 306p.
- Greenberg, B. & M.L. Szyska. 1984. Immature Stages and Biology of Fifteen Species of Peruvian Calliphoridae (Diptera). **Annals Entomology Society of America** **77**: 488-517.
- Greenberg, B. 1971. **Flies and disease: Ecology, classification and biotic associations**. Vol. I. Princeton University Press, New Jersey, xii + 856p.
- Greenberg, B. 1973. **Flies and disease: Biology and Disease Transmission**. Vol. II. Princeton University Press, New Jersey, 447p.

- Greenberg, B. 1991. Flies as forensic indicators. **Journal of Medical Entomology** **28** (5): 565-577.
- Grimaldi, D. & M.S Engel. 2005. **Evolution of insect**. Cambridge University Press. Cambridge, New York. 770p.
- Guimarães, J.H. & N. Papavero. 1999. **Myiasis in man and animals in the neotropical region- bibliographic database**. São Paulo: FAPESP and Editora Plêiade.
- Hackney, J.F.; O. Zolali-Meubodi & P. Cherbas. 2012. Tissue damage disrupts developmental progression and ecdysteroid biosynthesis in *Drosophila*. **Plos One** **7**: 1-12.
- Hinton, H.E. 1958. On the nature and metamorphosis of the colour pattern of *Thaumalea* (Diptera: Thaumaleidae). **Journal of Insect Physiology** **2**: 249-260.
- Hinton, H.E. 1963. The origin and function of the pupal stage. **Royal Entomological Society of London** **38**: 4-6.
- Hinton, H.E. 1946. Concealed phases in the metamorphosis. **Nature** **157** (3991): 552-553.
- Hinton, H.E. 1948. On the origin and function of the pupal stage. **Entomologic Society London** **99** (12): 395-409.
- Hinton, H.E., 1971. Some neglected phases in metamorphosis. **Review Entomologic Society London** **35**: 55-64
- Huang, J.H.; J. Lozano & X. Bellés. 2013. Broad-complex functions in postembryonic development of the cockroach *Blattella germanica* shed new light on the evolution of insect metamorphosis. **Biochim Biophys Acta** **1830**: 2178–2187. doi: 10.1016/j.bbagen.2012.09.025
- Imms, A.D. 1957. **A General Textbook of Entomology**. 9^a Ed. London: Methuen & CO LTD. 886p.
- Jenkin, P.M. & Hinton, H.E., 1966. Apolysis in arthropod moulting cycles. *Nature* **5051**: 871.
- Jindra, M.; S.R. Palli & L.M. Riddiford. 2013. The Juvenil Hormone signaling pathway in Insect Development. **Annual Review Entomology** **58**: 181-204.
- Kanti-Sinha, S. & S. Mahato. 2016. Intra-puparial development of flesh fly *Sarcophaga dux* (Thomson) (Diptera, Sarcophagidae). **Current Science** **111**: 1063–1070.

- Karabey, T. & O. Sert. 2014. The analysis of pupal development period in *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) forensically important insect. **International of Journal Legal Medicine**. Doi: 10.1007/s00414-014-0968-2
- Khomchu W. & P. Malakul. 2017. Material flow analysis (MFA) and life cycle assessment of PVC wastes in Thailand (phase iii). **Computer Aided Chemical Engineering** **40**: 535-540.
- Konopova, B. & M. Jindra. 2008. Broad-Complex acts downstream of Met in juvenile hormone signaling to coordinate primitive holometabola metamorphosis. **Development** **135**: 559–568. doi: 10.1242/dev. 016097
- Konopova, B.; V. Smykal & M. Jindra. 2011. Common and distinct roles of juvenile hormone signaling genes in metamorphosis of holometabolous and hemimetabolous insects. **PLoS ONE** **6**: e28728. doi: 10.1371/journal.pone.0028728
- Koogan, A. & Houaiss, A., 1999. Enciclopédia e dicionário ilustrado. 4^a ed. Rio de Janeiro, RJ: Seinfer. 1808p.
- Kristensen, N.P. 1991. Phylogeny of extant hexapods 5: 125-140 *In*: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization (Australia). **The insects of Australia**. 2nd edition. Volume 1. Melbourne: Melbourne University Press.543p.
- Kukalova-Peck, J. 1991. Fossil history and the evolution of hexapod structures. *In*: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization (Australia). **The insects of Australia**. 2nd edition. Volume 1. Melbourne: Melbourne University Press.543p.
- Lee, C.Y. & E.H. Baehrecke. 2001. Steroid regulation of autophagic programmed cell death during development. **Development** **128**: 1443-1453.
- Lee, C.Y.; C.R. Simon; C.T. Woodard & E.H. Baehrecke. 2002. Genetic mechanism for the stage- and tissue-specific regulation of steroid triggered programmed cell death in *Drosophila*. **Development of Biology** **252**: 138-148.
- Li, L.; Y. Wang & J. Wang. 2016. Intra-puparial development and age estimation of forensically important *Hermetia illucens* (L.). **Journal of Asian Pacific Entomology** **19**: 233–237.
- Litjens, P.; A.C. Lessinger & A.M.L. Azeredo-Espin. 2001. Characterization of the screwworm flies *Cochliomyia hominivorax* and *Cochliomyia macellaria* by

- PCR-RFLP of mitochondrial DNA. **Medical and Veterinary Entomology** **15**: 183-188.
- Maldonado, M.A. & N. Centeno. 2003. Quantifying the potential pathogens transmission of the blowflies (Diptera: Calliphoridae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** **98 (2)**: 213-216.
- Markou, T.A. & P.M. O'Grady. 2006. **Drosophila: a guide to species identification and use**. Copyrighted material. Oxford, UK. 259pp.
- Martin-Vega, D.; T.J. Simonsen & M.J.R. Hall. 2017. Looking into the puparium: Micro-CT visualization of the internal morphological changes during metamorphosis of the blow fly, *Calliphora vicina*, with the first quantitative analysis of organ development in cyclorrhaphous dipterans. **Journal of Morphology** **278**: 629-651.
- McAlpine, J.F. & D.M. Wood (eds.). 1989. **Manual of Nearctic Diptera**. Vol. 3. Research Branch, Agriculture Canada, Monograph (Canada. Agriculture Canada); 27-28, 32. Ottawa. 1333-1581p.
- McAlpine, J.F.; B.V. Peterson; G.E. Shewell; H.J. Teskey; J.R. Vockeroth & D.M. Wood (eds.). 1981. **Manual of Nearctic Diptera**, vol. 1. Research Branch, Agriculture Canada, Monograph no27, Ottawa, 674 pp.
- McAlpine, J.F.; B.V. Peterson; G.E. Shewell; H.J. Teskey; J.R. Vockeroth & D.M. Wood (eds.). 1987. **Manual of Nearctic Diptera**, vol. 2. Research Branch, Agriculture Canada, Monograph n28, Ottawa, pp. 675-1332.
- Mello, R.P.; R. Gredilha & E.G. Guimarães-Neto. 2004. Dados preliminares sobre sinantropia de califorídeos (Diptera: Calliphoridae) no município de Paracambi/RJ. **Revista da Universidade Federal Rural, Série Ciências da Vida, Rio de Janeiro, EDUR** **24(2)**: 97-101.
- Mendonça, P.M.; R.R. Barbosa; L.B. Cortinhas; J.R. Santos-Mallet & M.M.C. Queiroz. 2013. Ultrastructure of immature stages of *Peckia* (Euboetcheria) *collusor* (Diptera: Sarcophagidae). **Acta Tropica** **128**: 522-527.
- Moreno, A.V.L.; M.J.C. Agudelo; S.A.F. Barajas; Q.S. Herrera & J.C. Cespedes. 2009. Cambios morfológicos durante la ontogenia del estado pupal de *Melanoma viatrix* (Diptera: Richardidae). **Revista Colombiana de Entomología** **35 (1)**: 98-100.
- Nijhout, H.F. 1994. **Insect Hormones**. Princeton: Princeton University.Press.

- Novák, V.J.A. 1975. **Insect Hormone** (2nd English ed.). Wiley, New York. 600 p.
- Nuorteva, P. 1963. Synanthropy of blowflies (Diptera; Calliphoridae) in Finland. **Annals Entomologica Fennica** **29**: 1-49.
- Nuorteva, P. 1971. The synanthropy of birds as an expression of the ecological cycle disorder caused by urbanization. **Annals Zoologica Fennica** **8**: 547-553.
- Oliveira-Costa, J. 2003. **Entomologia Forense: Quando os insetos são vestígios**. Campinas, SP: Millenium. 257p.
- Paes, M.J.; L.G. Brito; G.E. Moya-Borja & E. Daemon. 2001. Determinação das exigências térmicas para o desenvolvimento pós-embrionário de *Lucilia cuprina* (Wied., 1830) (Diptera: Calliphoridae). **Parasitología al día** **25 (3-4)**: 93-99
- Papanastasiou, S.A. & N.T. Papadopoulos. 2014. Description of *Rhagoletis cerasi* (Diptera: Tephritidae) pupal development stages: indications of prolonged diapause. **Journal of Insect Science** **14 (156)**. Online.
- Pape, T.; V. Blagoderov & M.B. Mostovski. 2011. Order Diptera. **Zootaxa** **3148**: 222-229.
- Proença, B.; A.C. Ribeiro; R.T. Luz; V.M. Magalhães-de-Aguiar; V.C. Maia & M.S. Couri. 2014. Intrapuparial development of *Chrysomya putoria* (Diptera: Calliphoridae). **Journal of Medical Entomology** **51**: 908–914.
- Pujol-Luz, J.R. & C.V.A. Pujol-Luz. 2014. Stratiomyidae. in: roig-juñent, s., claps l.e. & morrone, j.j. (eds.). **Biodiversidad de artrópodos argentinos**. vol. 4. editorial insueunt, san miguel de tucumán, argentina, pp. 399– 406.
- Pujol-Luz, J.R. & K.B. Barros-Cordeiro. 2012. Intra-pupal development of the females of *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera, Calliphoridae). **Revista Brasileira de Entomologia** **56 (3)**: 269-272.
- Pujol-Luz, J.R.; F.S.P. Godoi & K.B. Barros-Cordeiro. 2016. Description of the puparium of hermetia pulchra (diptera: stratiomyidae) from Brazil. **Zootaxa** **4205 (4)**: 357–364.
- Pujol-Luz, J.R.; H. Marques, A. Ururahy-Rodrigues; J.A. Rafael; F.H.A. Santana; L.C. Arantes & R. Constantino. 2006. A Forensic Entomology Case from the Amazon Rain Forest of Brazil. **Journal Forensic Science** **51(5)**: 1151-1153.
- Pujol-Luz, J.R.; L.C. Arantes & R. Constantino. 2008. Cem anos da Entomologia Forense no Brasil (1908-2008). **Revista Brasileira de Entomologia** **52(4)**: 485-492.

- Queiroz, S.M.P. & C.J.B. Carvalho. 1987. Chave pictórica e descrição de larvas de 3° instar de Diptera (Calliphoridae, Muscidae e Fanniidae) em Vazadouros de Resíduos Sólidos Domésticos em Curitiba, Paraná. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil** **16 (2)**: 265-288.
- Ramos-Pastrana, Y.; C.A. Londono & M. Wolff. (2017). Intra-puparial development of *Lucilia eximia* (Diptera, Calliphoridae). **Acta Amazonica** **47 (1)**: 63-70.
- Richards, C.S.; T.J. Simonsen; R.L. Abel; M.J.R. Hall; D.A. Schwyn & M. Wicklein. 2012. Virtual forensic entomology: improving estimates of minimum post-mortem interval with 3D micro-computed tomography. **Forensic Science International** **220**: 251-264.
- Riddiford, L.M. 1978. Ecdysone-induced change in cellular commitment of the epidermis of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, at the initiation of metamorphosis. **General and Comparative Endocrinology** **34**: 438-446.
- Riddiford, L.M. 2012. How does juvenile hormone control insect metamorphosis and reproduction. **General and Comparative Endocrinology** **179**: 477-484.
- Riddiford, L.M.; K. Hiruma; X. Zhou & C.A. Nelson. 2003. Insights into the molecular basis of the hormonal control of molting and metamorphosis from *Manduca sexta* and *Drosophila melanogaster*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** **33**: 1327-1338.
- Rozkošný R. 1982. **A Biosystematic Study of the European Stratiomyidae (Diptera)**. Volume 2. W. Junk.
- Salazar-Souza, M.; M.S. Couri & V.M. Aguiar. 2018. Post-embryonic development of *Chrysomya putoria* (Diptera: Calliphoridae) in swine and bovine tissues in South America: implications for forensic entomology. **Austral Entomology**. Doi: 0.1111/aen.12311.
- Sanit, S.; K. Sukontason; H. Kurahashi; J.K. Tomberlin; A. Wannasan; R. Kraisittapanit & K.L. Sukontason. 2017. Morphology of immature stages of blow fly, *Lucilia sinensis* Aubertin (Diptera: Calliphoridae), a potential species of forensic importance. **Acta Tropica** **176**: 395-401.
- Santos, R.V. & C.E.A. Coimbra JR. 1984. Criação e comercialização de larvas de *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae) em uma comunidade no Distrito Federal. **Ciência e Cultura**, **36 (12)**: 2212-2215.

- Schroeder, H.; H. Klotzbach; S. Elias; C. Augustin & K. Pueschel. 2003. Use of PCR-RFLP for differentiation of calliphorid larvae (Diptera, Calliphoridae) on human corpses. **Forensic Science International** **132**: 76-81.
- Sehnal, F.; P. Svácha & J. Zrzavy. 1996. Evolution of Insect metamorphosis. *In*: **Metamorphosis: Postembryonic reprogramming of gene expression in amphibian and insect cells**. Gilbert, L. I; Rybczynski, R. & Tobe, S. S. (eds). San Diego, CA: Academic. 3-58p.
- Silva, L.P. & E.L. Rech. 2013. Unravelling the biodiversity of nanoscale signatures of spider silk fibres. **Nature**. DOI: 10.1038/ncomms4014
- Silva, S.M.; K.P. Vairo & M.O. Moura. 2018. Description of larval instars to fill a gap in Forensic Entomology: the larvae of *Paralucilia pseudolyrcea* (Diptera: Calliphoridae). **Journal of Medical Entomology** **55** (3/4): 575-586.
- Sivasubramanian, P. & M. Biagi. 1983. Scientific note morphology of the pupal stage of the fleshfly, *Sarcophaga bullata* (Parker) (Diptera: Sarcophagidae). **Journal of Insect Morphology & Embriology** **12** (3/6): 355-359.
- Skevington, J.H. & P.T. Dang. 2002. Exploring the diversity of flies (Diptera). **Biodiversity** **3** (4): 3-27
- Smykal, V.; T. Daimon; T. Kayukawa; K. Takaki & T. Shinoda. 2014. Importance of juvenile hormone signaling arises with competence of insect larvae to metamorphose. **Developmental Biology** **390**: 221-230. doi: 10.1016/j.ydbio.2014.03.006
- Sukontason, K.L.; R. Ngern-Klun; D. Sripakdee & K. Sukontason. 2007. Identifying fly puparia by clearing technique: application to forensic entomology. **Parasitology Research** **101**: 1407-1416.
- Sukontason, K.L.; R.C. Vogtsberger; N. Boonchu; T. Chaiwong; D. Sripakdee; R. Ngern- Klun; S. Piangjai & K. Sukontason. 2005. Larval morphology of *Chrysomya nigripes* (Diptera: Calliphoridae), a fly species of forensic importance. **Journal of Medical Entomology** **42** (3): 233-240.
- Suzuki, Y.; J.W. Truman & L.M. Riddiford. 2008. The role of Broad in the development of *Tribolium castaneum*: implications for the evolution of the holometabolous insect pupa. **Development** **135**: 569-577. doi: 10.1242/dev.015263
- Szpila, K.; M.J.R. Hall; K.L. Sukontason & T.I. Tantawi. 2012. Morphology and identification of first instars of the European and Mediterranean blowflies of

- forensic importance. Part I: Chrysomyinae. **Medical and Veterinary Entomology**: 1-13.
- Tarone, A.M. & D.R. Foran. 2011. Gene expression during blow fly development: improving the precision of age estimates in forensic entomology. **Journal of Forensic Science** **56**: S112–S122.
- Teskey, H.J. 1976. Diptera larvae associated with trees in North America. **Memoirs of the Entomological Society of Canada** **100**: 1-53.
- Truman, J.W. & L.M. Riddiford. 1999. The origins of insect metamorphosis. **Nature** **401**: 447-452.
- Truman, J.W. & L.M. Riddiford. 2002. Endocrine insights into the evolution of metamorphosis in insect. **Annual Review Entomology** **47**: 467-500.
- Ureña, E.; C. Manjon; X. Franch-Marro & D. Martín. 2014. Transcription factor E93 specifies adult metamorphosis in hemimetabolous and holometabolous insects. **Proceedings of the National Academy of Sciences** **111**: 7024-7029. doi: 10.1073/pnas.1401478111
- Ureña, E.; C. Silvia; M. Cristina; X. Franch-Marro & D. Martín. 2016. The Occurrence of the Holometabolous Pupal Stage Requires the Interaction between E93, Krüppel-Homolog 1 and Broad-Complex. **PLOS Genetics**. DOI:10.1371/journal.pgen.1006020
- Watts, N. 1997. **The oxford Greek minidictionary: Greek-English, English-Greek**. Oxford University Press. New York. 653p.
- Wells, J.D. & F.A.H. Sperling. 2001. DNA-based identification of forensically important Chrysomyinae (Diptera: Calliphoridae). **Forensic Science International** **120**: 110-115.
- White, K. P.; S.A. Rifkin; P. Hurban & D.S. Hogness. 1999. Microarray analysis of *Drosophila* development during metamorphosis. **Science** **286**: 2179-2184.
- Whitworth, T.L. 2003. A key to the puparia of 27 species of North American *Protocalliphora* Hough (Diptera: Calliphoridae) from bird nests and two new puparial descriptions. **Procedural Entomological Society of Washington** **105** (4): 995-1033.
- Wiegmann, B.M. & D.K. Yeates. 2007. Diptera. True Flies. Version 29 November 2007. <http://tolweb.org/Diptera/8226/2007.11.29> In: **The Tree of Life** Web Project, <http://tolweb.org/>

- Zajac, B.K. 2011. Morphologische und histologische Methoden zur Bestimmung des Alters forensisch relevanter Fliegenpuppen. Diplomarbeit. Goethe-Universität Frankfurt am Main
- Zajac, B.K.; J. Amendt; M.A. Verhoff & R. Zehner. 2018. Dating Pupae of the Blow Fly *Calliphora vicina* Robineau-Desvoidy 1830 (Diptera: Calliphoridae) for Post Mortem Interval-Estimation: Validation of Molecular Age Markers. **Genes (9) 153**: 1-19. Doi:10.3390/genes9030153
- Zdarek, J. & D.L. Denlinger. 1991. Wandering behavior and pupariation in tsetse larvae. **Physiological Entomology 16**: 523-529.
- Zdarek, J. & G. Fraenkel. 1972. The mechanism of puparium formation in flies. **Journal of Experimental Zoology 179**: 315-324.
- Zehner, R.; J. Amendt & P. Boehme. 2009. Gene expression analysis as a tool for age estimation of blowfly pupae. **Forensic Science International: genetics supplement series 2**: 292-293.
- Zhou, B.; K. Hiruma; T. Shinoda & L.M. Riddiford. 1998. Juvenile hormone prevents ecdysteroid-induced expression of Broad Complex RNAs in the epidermis of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. **Development of Biology 203**: 233-244.
- Zhou, X. & Riddiford, L.M. 2002. Broad specifies pupal development and mediates the 'status quo' action of juvenile hormone on the pupal-adult transformation in *Drosophila* and *Manduca*. **Development 129**: 2259-2269.
- Zollman, S., Godt, D., Prive, G. G., Couderc, J. L. and Laski, F. A. 1994. The BTB domain, found primarily in zinc finger proteins, defines an evolutionarily conserved family that includes several developmentally regulated genes in *Drosophila*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91**: 10717-10721.
- Zumpt, F. 1965. **Myiasis in man and animals in the old world**. London, Butterworths, 267p.