Gisele Antoniazzi Cardoso

Evolução da expressão gênica em Calliphoridae (Diptera, Calyptratae): um modelo para o estudo do hábito de parasitismo

Gene expression evolution in Calliphoridae (Diptera, Calyptrate): a model to study feeding habits

São Paulo
2018

Gisele Antoniazzi Cardoso

Evolução da expressão gênica em Calliphoridae (Diptera, Calyptrate): um modelo para o estudo do hábito de parasitismo

Gene expression evolution in Calliphoridae (Diptera, Calyptrate): a model to study feeding habits

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Doutor em Ciências Biológicas, na Área de Biologia/Genética.

Orientadora: Tatiana Teixeira Torres

São Paulo
2018

Introdução Geral

Um dos objetivos da biologia é estudar e compreender a grande diversidade fenotípica que observamos na natureza. Com o crescente avanço da tecnologia, pode-se facilmente utilizar dados genéticos para entender as bases de um determinado fenótipo assim como sua evolução ao longo do tempo. Sobretudo dois tipos de variação são responsáveis por essa diversidade: mutações em regiões codificadoras, que tem potencial de alterar a função gênica, e em regiões regulatórias, que são responsáveis por determinar quanto, quando e onde um gene é expresso em um organismo. Este trabalho descreve as buscas das variações subjacentes aos diferentes hábitos alimentares de moscas da família *Caliphoridae* e sua evolução.

Evolução de sequências codificantes

A comparação de sequências de DNA é uma das ferramentas mais utilizadas para a reconstrução da história evolutiva de uma espécie. Em especial, as sequências codificantes (ou codificadoras) que são traduzidas em proteína, contam a história evolutiva de um ponto de vista funcional em que mutações podem alterar diretamente a função gênica.

Um exemplo clássico é a resistência a pesticidas. Um organismo resistente é aquele capaz de sobreviver a uma dose de pesticida que é letal para a maior parte de uma população (Hemingway et al. 2002). Existem diversos mecanismos que levam à resistência e um deles é a substituição de aminoácidos em receptores e/ou enzimas que alteram as moléculas alvo dos pesticidas (Hemingway et al. 2004). Para o vetor da malária *Anopheles gambiae*, por exemplo, já foram descritas pelo menos três mutações pontuais na sequência da proteína do canal de sódio desse inseto (mutações neste canal são genericamente chamadas de *knockdown resistance* ou *kdr*) que conferem resistência a piretróides e ao DDT (Ranson et al. 2000; Santolamazza et al. 2008; Dabiré et al. 2009). O fenótipo *kdr* também foi descrito em outras populações resistentes de dípteros como *Drosophila melanogaster* (Daborn et al. 2002), *Lucilia cuprina* (Newcomb et al. 2005) e *Musca domestica* (Soderlund and Knipple 2003). Este exemplo mostra como uma mudança proteica

pode aumentar o valor adaptativo de um indivíduo sob pressão de seleção e aumentar a frequência de um fenótipo dentro de uma população. Por isso, é essencial identificar essas mutações e acompanhar sua flutuação em populações que são constantemente expostas a pesticidas.

As mutações que podem causar uma alteração na função gênica podem ser facilmente estudadas uma vez que o código genético é bem conhecido. Pressupõe-se que substituições sinônimas (d_S ou K_S) e que não alteram a proteína, evoluem neutramente. Por outro lado, as substituições não sinônimas (d_N ou K_A), que têm potencial para alterar a função proteica, estão sujeitas a seleção. Com isso, a razão da taxa de substituições sinônimas e não sinônimas (d_N/d_S , K_A/K_S ou ω) é utilizada para inferir a ação da seleção em regiões genômicas codificadoras de proteína (Nielsen 2005). Os testes de seleção partem assim de pressupostos simples: regiões que não estão sujeitas a seleção (evoluindo neutramente) apresentam taxas de d_N e d_S iguais, logo, $\omega = 1$. Na presença de seleção purificadora (ou negativa), ω assume valores menores que um e na presença de seleção positiva ω assume valores maiores que um. Na prática, as análises são complicadas por algumas limitações. Por exemplo, como as substituições não sinônimas podem alterar a função gênica, é esperado que encontremos mais regiões sob seleção purificadora o que torna esse teste muito conservador para a busca de genes sob seleção positiva (Nielsen, 2005). Entretanto, existem métodos que comparam as sequências de DNA dentro de um contexto filogenético, utilizando uma distribuição estatística em que os valores de ω podem variar ao longo dos sítios. Então, se a distribuição desses valores se ajusta melhor a um modelo em que $\omega > 1$, que a um modelo com $\omega = 1$, essa região estaria sob seleção positiva (Nielsen 2005; Yang 2007).

Outro método é o teste de taxas relativas de Tajima em que testa-se a hipótese de que duas espécies evoluem a uma taxa constante, denominada relógio molecular (Tajima 1993). Esse teste infere o número de substituições entre duas espécies a partir de seu ancestral comum, incluindo um grupo externo. Cada espécie do grupo interno é comparada ao grupo externo independentemente para determinar quão relacionadas as duas espécies testadas são e calcular a estimativa do tempo de divergência de seu ancestral comum mais próximo (Figura 1). Assim, como no teste de ω , a hipótese nula é que as

duas espécies testadas apresentem taxas iguais (evolução neutra). Se essa hipótese for refutada, a hipótese alternativa é de que uma das espécies testada está evoluindo mais rapidamente.

Figura 1. Teste de taxas relativas de Tajima. O número de substituições (s) entre duas espécies equivale a soma do número de substituições comparada a seu ancestral comum (em vermelho). A taxa de $S_{AC} = S_A + S_C$; $S_{BC} = S_B + S_C$. Do lado esquerdo, um exemplo em que as duas espécies testadas, A e B, evoluem sob uma mesma taxa. À esquerda um exemplo em que as duas espécies evoluem sob taxas diferentes e, portanto, a hipótese do relógio molecular seria refutada.

As forças evolutivas que atuam nas substituições em regiões codificadoras estão diretamente relacionadas com o valor adaptativo do fenótipo resultante. Tanto o teste de taxas relativas como o cálculo de ω são capazes de inferir se há evidência de ação da seleção em um grupo ou ramo específico. Comparar essas regiões genômicas tendo uma hipótese *a priori* pode direcionar a busca de genes envolvidos em fenótipos específicos.

Evolução de regiões regulatórias

Durante muito tempo, acreditou-se que apenas variações nas regiões codificadoras do DNA eram responsáveis pela grande diversidade fenotípica. No entanto, o aprofundamento nessa área mostrou que não era possível explicar toda a diversidade observada apenas com variações nessas regiões. Um dos primeiros trabalhos que tentou entender essa questão foi o de King & Wilson (1975). Os autores quiseram entender por que há uma grande similaridade de sequências codificadoras de proteínas entre o homem e o chimpanzé, já que as duas espécies apresentavam fenótipos tão diferentes. A hipótese

levantada pelos autores é que grande parte das diferenças fenotípicas se deve a variações nas regiões que regulam a expressão dos genes em cada organismo e não só nas regiões codificadoras.

Como visto anteriormente, podemos facilmente comparar regiões codificadoras; com o código genético é possível identificar precisamente as mutações que alteram as sequências proteicas. Porém, não há uma abordagem bem definida para avaliar diretamente as sequências de regiões regulatórias. Elementos regulatórios que atuam em *cis*, normalmente, apresentam sequências curtas e, portanto, são difíceis de identificar no genoma (GuhaThakurta, 2006). Além disso, não há uma definição clara de como mudanças nessas sequências alteram os níveis de expressão (Wray *et al*, 2003). Regiões regulatórias que atuam em *trans* oferecem um desafio adicional; devem ser analisadas tanto a sua sequência proteica, como os elementos regulatórios *cis* que regulam sua expressão. Devido às dificuldades de análise das regiões regulatórias *per se*, variações nessas regiões podem ser estudadas indiretamente, por meio dos níveis de expressão dos genes que elas regulam.

Mesmo sendo mais complexo, existem modelos para inferir como a expressão gênica evolui. Como descrito anteriormente, podemos utilizar a evolução neutra como hipótese nula para testar se há seleção atuando nessas regiões. Khaitovich e colaboradores (2004) observaram que há uma linearidade entre a média da diferença de expressão de 1.998 genes de diferentes tecidos e o tempo de divergência de primatas. Isto é, a correlação desses dois fatores indica que a expressão gênica global evolui neutramente. Mas também deve-se levar em consideração que genes de vias específicas podem estar sujeitos à uma forte ação da seleção negativa. Com isso, a função gênica se manteria na ausência de flutuações significativas na expressão gênica. Uma redução na expressão, por exemplo, seria insuficiente para manter o processo biológico (Rifkin *et al*. 2003; Khaitovich *et al*. 2005; Lemos *et al*. 2005; Whitehead and Crawford 2006; Guschanski *et al*. 2017).

Assim como a seleção negativa, podemos encontrar genes que estão sendo selecionados positivamente. Um dos exemplos mais notáveis são os estudos realizados com os tentilhões de Darwin. Os tentilhões formam um grupo de espécies de aves que apresentam uma grande diversidade no tamanho e forma de seus bicos. Essas diferenças foram

correlacionadas com a dieta de cada espécie. Posteriormente, Abznov e colaboradores (2004, 2006) mostraram a relação da expressão dos genes Calmodulin (CaM) e Bone morphogenetic protein 4 (Bmp4) com a forma e o tamanho dos bicos dessas aves. Isto é, o modo como esses genes são regulados proporciona a diversidade morfológica sobre qual a seleção natural atuará, mostrando que a expressão diferencial reflete diretamente nos valores adaptativos das diferentes espécies de tentilhões (Abzhanov et al., 2004).

Um segundo exemplo é a evolução da carapaça no peixe esgana-gata (*Gasterosteus aculeatus*) que pode ser encontrado tanto em água doce como salgada. A grande diferença entre essas populações é a perda dos espinhos pélvicos nos indivíduos de água doce. Para entender essa diferença, Shapiro e colaboradores (2004) buscaram por regiões gênicas ligadas a esse fenótipo e encontraram o loco que corresponde ao gene Pitx1. Apesar de não encontrarem diferenças na região codificadora em indivíduos dessas populações, eles observaram que esse gene não era expresso em larvas das populações sem espinho. Posteriormente, Chan e colaboradores (2011) observaram que um motivo regulatório do gene Pitx1 era ausente na linhagem sem espinhos. Então, para testar a função desse motivo, eles inseriram um fragmento de 2,5 Kb a montante do gene Pitx1 dos peixes com espinho em larvas de água doce. A expressão do gene não só foi restaurada, como os indivíduos adultos desenvolveram os espinhos pélvicos, mostrando que a variação na regulação gênica tem uma influência direta nesse fenótipo.

Um modo mais robusto para inferir se há seleção nas regiões regulatórias quando não há genes candidatos, é o cálculo da variância inter e intraespecífica da expressão gênica (Nuzhdin et al. 2004; Rohlf and Nielsen 2014; Rohlf and Nielsen 2015). A proposta de Rohlf and Nielsen (2015) utiliza o modelo de Ornstein–Uhlenbeck (OU) para conduzir uma análise filogenética da razão desses valores de variância (β). O modelo assume que a expressão gênica é um caráter quantitativo. É esperado que maioria dos genes tenha um valor de β similar (seleção estabilizadora), então valores de β elevados indicariam um desvio na expressão entre espécies (seleção positiva/direcional) e valores baixos indicariam um desvio dentro da espécie (seleção disruptiva ou respostas a fatores ambientais) quando comparados ao β global (ou, como denominado pelos autores, β compartilhado). De forma análoga ao cálculo de d_N/d_S , para cada valor de β é atribuído um valor de

verossimilhança para avaliar a significância de cada β específico comparado ao global. Como os próprios autores discutem, o método é análogo a um teste de evolução molecular para sequências nucleotídicas, proposto por R. R. Hudson, M. Kreitman e M. Aguadé (Hudson et al. 1987). No teste HKA (sigla derivada da inicial dos sobrenomes dos autores) se estima o polimorfismo (equivalente à variância intraespecífica da expressão) e a divergência (variância interespecífica da expressão) entre uma ou mais sequências de espécies diferentes.

Com os exemplos e métodos expostos é visto que apesar de uma fração muito pequena da expressão gênica evoluir positivamente, é possível identificar esses genes que são alvo de grande interesse para entender diferenças morfológicas, metabólicas e comportamentais entre espécies/populações e, particularmente, para estudar processos envolvidos na especiação.

A família Calliphoridae

A família Calliphoridae (Diptera: Calyptrata) apresenta 1.525 espécies já descritas e distribuídas em 97 gêneros (Shewell 1987). As moscas dessa família têm como principal característica a cor metálica de todo ou, pelo menos, parte do corpo. São popularmente conhecidas como varejeiras (*blowflies*, em inglês) e são amplamente distribuídas pelo globo (Shewell 1987). Uma das características mais marcantes dessa família é a presença de espécies muito próximas que exibem hábitos alimentares contrastantes. Os diferentes hábitos são exibidos durante o estágio larval em que os califorídeos podem se alimentar de: a) sangue e exsudatos; b) tecido vivo de vertebrados e invertebrados; b) tecido em decomposição tanto de carcaças como de hospedeiros vertebrados vivos; c) canibalismo entre outros (Zumpt 1965; Guimaraes and Papavero 1999).

A infestação causada por esses dípteros é denominada miíase, que segundo Zumpt (Zumpt 1965) é toda infestação causada por dípteros que se alimentam de tecido vivo ou necrosado de um hospedeiro vertebrado. As miíases podem ser classificadas em primárias ou secundárias. A primeira se refere aos parasitas obrigatórios que dependem de tecido vivo para completar seu ciclo; a segunda engloba as espécies que são necro-saprófagas e que podem ser encontradas em tecido necrosado de hospedeiros infestados

primariamente por espécies parasitas. Os califorídeos mais estudados na região Neotropical pertencem aos gêneros *Chrysomya*, *Cochliomyia* e *Lucilia* pela sua importância médico-veterinária e forense.

O gênero *Cochliomyia* é endêmico das Américas e apenas quatro espécies foram descritas até o momento: *Cochliomyia hominivorax*, *Cochliomyia macellaria*, *Cochliomyia aldrich* e *Cochliomyia minima* (Guimaraes and Papavero 1999). *Cochliomyia hominivorax*, a mosca da bicheira, é a única espécie parasita obrigatória desse gênero e causa grande impacto à pecuária brasileira. As outras espécies são necro-saprófagas.

Já o gênero *Chrysomya* tinha distribuição restrita apenas ao velho mundo, no entanto, na década de 1970, três espécies foram introduzidas nas Américas; *Chrysomya albiceps*, *Chrysomya megacephala* e *Chrysomya putoria* (Guimarães et al. 1978; Baumgartner and Greenberg 1984). Essas espécies são predominantemente necro-saprófagas, mas já houve relatos confirmados de miíase primária causada por *Ch. albiceps* em bezerros (Leite et al. 1983; Schnur et al. 2009). Há uma única espécie parasita obrigatória nesse gênero, *Chrysomya bezziana*, que continua restrita ao velho mundo e tem grande importância econômica e veterinária por causar miíase primária.

Por fim, o gênero, *Lucilia*, cosmopolita, compreende várias espécies parasitas facultativas, dentre elas *L. cuprina* e *Lucilia eximia* (Guimaraes and Papavero 1999). Os casos de miíase primária causados por *L. eximia* não são frequentes, enquanto *L. cuprina* representa um grande problema na criação de ovelhas principalmente na Austrália (Tellam and Bowles 1997; Sandeman et al. 2014). No Brasil, essa espécie é predominantemente necro-saprófaga.

O impacto de ectoparasitos na pecuária brasileira

No Brasil, a pecuária é uma das principais atividades econômicas e ocupa grandes extensões. A bovinocultura, por exemplo, apresenta um rebanho de aproximadamente 221 milhões de cabeças distribuído em quase 67 milhões de hectares de pasto (www.abiec.com.br). Em 2017, a pecuária movimentou mais de R\$ 525 bilhões o que corresponde a 31% do PIB do agronegócio brasileiro (Associação Brasileira das Indústrias

Exportadoras de Carne: Relatório Anual 2018). Dessa forma, existe um grande esforço para minimizar possíveis perdas e otimizar a bovinocultura em nosso país. No entanto, um grande número de doenças parasitárias causa um grande impacto na produção de carne brasileira; anualmente são perdidos mais de US\$ 13 bilhões (Grisi et al. 2014). Aproximadamente 27% desse valor corresponde a infestações causadas por dípteros (Tabela 1), e esse prejuízo se refere, principalmente, a perda de produtividade animal causada por perda de peso, diminuição na produção de leite e fertilidade, e aumento da mortalidade (FAO 1992; Sereno et al. 1996) .

Tabela 1. Potencial prejuízo causado por dípteros ectoparasitas (Grisi et al. 2014).

Ectoparasita	Perda em bilhões (US\$)
<i>Haematobia irritans</i> (Mosca dos chifres)	2.60
<i>Dermatobia hominis</i> (Mosca do berne)	0.38
<i>Co. hominivorax</i> (Mosca da bicheira)	0.36
<i>Stomoxys calcitrans</i> (Mosca dos estábulos)	0.35
Prejuízo total	3.69

A mosca da bicheira é um ectoparasito obrigatório de animais de sangue quente e causa miíase primária. Fêmeas adultas fecundadas buscam por feridas abertas ou mucosas para depositar seus ovos (aproximadamente 200). Em menos de 24 horas, os ovos eclodem e as larvas começam a se alimentar obrigatoriamente do tecido vivo disponível. Essas infestações produzem um odor característico capaz de atrair outras fêmeas (Guimaraes and Papavero 1999). Sendo assim, não havendo um manejo constante para a prevenção e tratamento dessa afecção, os hospedeiros podem ser infestados múltiplas vezes, levando a infecções secundárias e, em alguns casos, a morte do animal (Guimaraes and Papavero 1999).

Originalmente, *Co. hominivorax* era distribuída em toda a América desde regiões do sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina (Hall and Wall 1995). Porém, com os grandes prejuízos causados por esta espécie, houve um crescente interesse na implementação de um programa de erradicação por meio da liberação de insetos estéreis (SIT. “Sterile Insect Technique”). De forma simplificada, essa técnica consiste em irradiar pupas com raios gama, tornando-as estéreis em decorrência de rearranjos cromossômicos. As pupas irradiadas são liberadas no ambiente e os machos que emergem delas copulam com fêmeas

selvagens, o que resulta em uma prole inviável e na redução populacional da mosca (Guimaraes and Papavero 1999).

O programa teve início em 1958 nos EUA e após 8 anos, o país foi declarado livre de casos de *Co. hominivorax*. Com esse resultado, grande parte dos países da América Central implementaram o programa de erradicação (Wyss 2006). O Panamá mantém uma barreira permanente com a liberação constante de machos estéreis para impedir a recolonização por moscas vindas da América do Sul.

No Brasil, o uso de inseticidas à base de organofosforados é muito popular para prevenção e tratamento das infestações devido ao seu baixo custo e boa atuação (Tellam and Bowles 1997). No entanto, já se sabe que linhagens de larvas resistentes ao inseticida estão sendo selecionadas, dificultando ainda mais o tratamento dos animais infestados (de Carvalho et al. 2006; Carvalho 2007). Deve-se levar em consideração também que os resíduos dos inseticidas organofosforados podem contaminar a carne, o leite e o meio ambiente (Nolan and Schnitzerling 1986; Fagnani et al. 2011). Uma alternativa seria a implementação da técnica do inseto estéril. No entanto, existem algumas controvérsias com relação ao potencial desta técnica na América do Sul e Caribe (Lyra et al. 2009; Torres and Azeredo-Espin 2009).

A família Calliphoridae como modelo para o estudo da evolução do parasitismo

O parasitismo, em particular, é um dos hábitos mais comuns entre as espécies e aparece repetidas vezes de forma independente na história evolutiva de diversos grupos (Poulin and Morand 2000; Weinstein and Kuris 2016). Um exemplo é a ordem Diptera, que compreende um dos grupos mais diversos de insetos e apresenta um grande número de espécies parasitas e/ou pragas que causam grande impacto nas atividades humanas. No caso da família Calliphoridae, o parasitismo obrigatório aparece em, pelo menos, cinco ocasiões independentes de acordo com Stevens (Stevens 2003). Na subfamília Chrysomyinae que inclui os gêneros *Chrysomya*, *Cochliomyia* e *Lucilia*, o parasitismo obrigatório aparece em duas ocasiões independentes (Figura 2). Além disso, em alguns gêneros como *Cochliomyia* e *Chrysomya*, para cada espécie parasita existe uma espécie irmã necro-saprófaga, o que torna essa família ideal para estudos comparativos (Stevens et al. 2006).

As origens evolutivas do hábito de parasitismo na família Calliphoridae são desconhecidas. No entanto, tem sido proposto que essa divisão entre os hábitos alimentares reflita a evolução progressiva do parasitismo em Calliphoridae (Stevens 2003).

Figura 2. Parte da filogenia de Calliphoridae. Adaptado de Marinho et al (2012). O parasitismo obrigatório aparece em duas ocasiões independentes no ramo mostrado.

Existem diversas abordagens para estudar a evolução do parasitismo em Calliphoridae. Uma delas é a inferência das relações evolutivas entre as diferentes espécies. No entanto, para este tipo de estudo é utilizado um número limitado de dados – apenas alguns genes mitocondriais e nucleares – que não mostram as principais diferenças biológicas entre as espécies e, principalmente, como os hábitos alimentares são modulados dentro desta família. Para isso, é necessário buscar por variações em dados genômicos globais que possam ser relacionados a esses fenótipos de um ponto de vista funcional.

Uma estratégia é comparar variações na expressão gênica global em busca de genes envolvidos no hábito alimentar. Muitos trabalhos já mostraram como essa abordagem pode ser eficiente na busca da relação de um gene com um determinado fenótipo (Abzhanov et al. 2006; Bibiloni et al. 2007; Garelli et al. 2012). Anteriormente, Cardoso e colaboradores (2016) buscaram por genes candidatos e compararam o perfil de expressão via qPCR desses genes em quatro espécies de califorídeos (*Ch. albiceps*, *Ch. megacephala*, *Co. hominivorax* e *Co. macellaria*). Com esse trabalho foi possível encontrar um gene envolvido na transdução de sinal gustatório (*Malvolio*), que pode estar associado com o hábito alimentar. Esse gene apresentou um padrão específico de expressão na espécie parasita enquanto as espécies necro-saprófagas mostraram um padrão distinto da parasita, mas

similar entre elas. Esse foi o primeiro estudo funcional para o estudo do hábito de parasitismo em Calliphoridae.

Agora, com a redução do custo das tecnologias de sequenciamento de nova geração, é possível gerar dados em larga escala para análise global dos níveis de expressão. Com isso também pode-se incluir análises das regiões codificantes. Nesta tese, foram integrados diversos tipos de dados biológicos para estudar a evolução do hábito de parasitismo obrigatório em Calliphoridae. Dentro deste cenário será possível aprofundar nossa compreensão sobre a biologia da família Calliphoridae, mostrando as características que a tornam ideal como modelo para o estudo da evolução do hábito de parasitismo.

Perguntas e hipóteses

A partir de todo o conhecimento acumulado sobre Calliphoridae e com a geração de novos dados o objetivo deste trabalho foi entender como o hábito de parasitismo obrigatório evoluiu nesta família. Além disso, esta tese tem a finalidade de apresentar os resultados obtidos para ajudar na compreensão das bases genéticas desse hábito. Algumas perguntas motivaram o trabalho apresentado nesta tese:

- Como se deu a transição entre os diferentes hábitos na história de Calliphoridae?

Como já discutido anteriormente, a hipótese vigente é de que o ancestral comum dos califórídeos era necro-saprófago e que a transição para um hábito parasita tenha sido progressiva, do necro-saprófago para facultativo e, por fim, para parasita obrigatório. Apesar dessa hipótese ser a mais citada entre os pesquisadores, ela nunca foi formalmente testada. Assim, a história evolutiva do hábito alimentar foi reconstruída com um método de amostragem aleatória, considerando sua probabilidade *a posteriori* (ou posterior).

- O aparecimento do parasitismo obrigatório foi resultado da escolha da fêmea por um novo substrato?

O hábito de parasitismo obrigatório ou necro-saprófago nas diferentes espécies é observado durante o estágio larval. No entanto, são as fêmeas que buscam pelos sítios ideais para oviposição e uma hipótese alternativa é de que a evolução do hábito alimentar seria resultado da atração das fêmeas por novos substratos. Por isso, foram realizados ensaios de escolha com fêmeas grávidas para calcular um índice de preferência por diferentes substratos.

- As larvas necro-saprófagas e parasitas (obrigatórias e facultativas) conseguem completar seu ciclo de vida em substratos diferentes?

Pensando na pergunta e hipótese anterior, ao mesmo tempo em que as fêmeas podem escolher diferentes substratos, as larvas devem ser capazes de completar seu ciclo nesse substrato. Com isso em mente, foram realizados ensaios que permitissem o

acompanhamento do desenvolvimento das larvas em substratos diferentes e a magnitude de sua preferência por cada substrato.

■ Quais genes podem ter relação com o hábito de parasitismo?

Anteriormente, foi discutido como um fenótipo pode ser resultado de variações tanto em regiões regulatórias como codificadoras. A hipótese inicial deste trabalho é de que existem diferenças nessas regiões entre as espécies que explicariam as diferenças de hábito alimentar presentes em Calliphoridae. A busca por essas diferenças em um contexto evolutivo poderia indicar quais genes estariam relacionados com o hábito de parasitismo obrigatório. Com dados de expressão, foi investigado quais genes evoluem neutramente por meio da correlação da divergência de expressão e distância genética. Um cladograma baseado nos valores de expressão também foi inferido. Variações em regiões regulatórias sob seleção foram identificadas com a estimativa de β em toda árvore e em ramos específicos. Por último, genes diferencialmente expressos foram detectados comparando os diferentes hábitos par-a-par. Para as sequências codificadoras de proteínas, genes com evidência de seleção foram identificados por meio do cálculo da razão de ω e, pelo teste de taxas relativas de Tajima. O conjunto desses resultados poderão indicar potenciais genes candidatos.

Esta tese visa testar a hipótese de que a variação na expressão gênica está diretamente envolvida na preferência alimentar dessas moscas e entender se há uma relação entre a variação de expressão e em regiões codificadoras que explicariam essas diferenças fenotípicas.

Resumo

Espécies muito próximas da família Calliphoridae apresentam hábitos alimentares muito distintos, como alimentação em tecido de um hospedeiro vivo (parasitismo obrigatório) e alimentação em matéria orgânica em decomposição (necro-saprofagia). As origens evolutivas do hábito de parasitismo nesta família ainda são desconhecidas. No entanto, o que a torna ideal para o estudo da evolução do hábito alimentar é o aparecimento do parasitismo obrigatório em pelo menos três ocasiões independentes em sua história. Neste trabalho, foram utilizados métodos para entender a evolução do parasitismo obrigatório assim como os genes envolvidos em três diferentes hábitos alimentares. O primeiro passo foi a inferência do hábito ancestral de Calliphoridae. Com o mapeamento de caracteres na filogenia da família, o hábito ancestral mais provável seria a necro-saprofagia e o parasitismo obrigatório teria surgido posteriormente (independentemente do parasitismo facultativo). Ensaaios de escolha com fêmeas permitiram a classificação precisa das espécies quanto ao hábito alimentar. Ensaaios com as larvas mostraram que tanto espécies necro-saprófagas como parasitas facultativas se alimentam tanto de carne em decomposição como carne fresca. Por outro lado, a espécie parasita obrigatória *Co. hominivorax*, apresentou um comportamento aversivo pela carne em decomposição e se desenvolveu somente na carne fresca. Esses resultados permitiram a formulação da hipótese de que o parasitismo tenha surgido a partir de uma mudança da atração das fêmeas pelos substratos para oviposição, seguida da especialização da larva parasita. A busca dos genes envolvidos nos diferentes hábitos foi realizada por meio da análise de expressão gênica diferencial em dados de RNA-seq gerados para seis califorídeos. No total, foram encontrados 230 potenciais genes candidatos para investigação futura. Além disso, o padrão geral observado indicou que variações tanto nas regiões regulatórias como codificadoras, sofrem a ação predominante de seleção purificadora.

Abstract

Closely related species of the Calliphoridae family have contrasting feeding habits, such as feeding on living tissues of a host (obligate parasitism) and feeding on decaying organic matter (necro-saprophagy). The evolutionary origins of parasitism in Calliphoridae are still unknown. However, what makes this family ideal for the study of the evolution of feeding habits is the appearance of obligate parasitism in at least three independent occasions. In this study, we used methods to understand the evolution of parasitism, as well as the genes involved in in three different feeding habits. First, we inferred the ancestral habit of Calliphoridae. By using stochastic character mapping along the phylogeny of the family, the most likely ancestral habit was revealed as necro-saprophagy. Obligate parasitism could have evolved later (with an independent evolution of the facultative parasitism). Two-choice essays with females allowed the precise classification of the species regarding their feeding habits. Essays with larvae showed that both necro-saprophagous and facultative parasites feed on decaying flesh and fresh meat. On the other hand, the obligate parasite, *Co. hominivorax*, showed an aversive behavior to decaying meat and able to develop only in fresh meat. These results led to the formulation of the hypothesis that parasitism arose from a shift in the attraction of the female attraction to new oviposition sites, followed by the specialization of the parasitic larvae. The search for the genes involved in the different feeding habits was performed through an analysis of differential gene expression using RNA-seq data generated for six califorids. Within a dataset containing more than 1000 candidate genes, 230 genes potential candidate genes were found for future research. In addition, the general pattern observed indicated that both regulatory and coding regions have predominantly undergone the action of purifying selection.

Referências Bibliográficas

- Abascal F, Zardoya R, Telford MJ (2010) TranslatorX: Multiple alignment of nucleotide sequences guided by amino acid translations. *Nucleic Acids Res.* doi: 10.1093/nar/gkq291
- Abzhinov A, Kuo WP, Hartmann C, et al (2006) The calmodulin pathway and evolution of elongated beak morphology in Darwin's finches. *Nature* 442:563–567. doi: 10.1038/nature04843
- Al-Shareef LAH, Al-Qurashi SID (2016) Study of some biological aspects of the blowfly *Chrysomya albiceps* (Wiedemann 1819) (Diptera: Calliphoridae) in Jeddah, Saudi Arabia. *Egypt J Forensic Sci* 6:11–16. doi: 10.1016/j.ejfs.2015.06.003
- Alexa A, Rahnenfuhrer J (2016) topGO. In: Alexa A Rahnenfuhrer J (2016). topGO Enrich. Anal. Gene Ontol. R Packag. version 2.28.0.
- Alves ACF, Santos WE, Farias RCAP, Creão-Duarte AJ (2014) Blowflies (Diptera, Calliphoridae) Associated with Pig Carcasses in a Caatinga Area, Northeastern Brazil. *Neotrop Entomol* 43:122–126. doi: 10.1007/s13744-013-0195-4
- Andere AA, Platt RN, Ray DA, Picard CJ (2016) Genome sequence of *Phormia regina* Meigen (Diptera: Calliphoridae): Implications for medical, veterinary and forensic research. *BMC Genomics* 17:842. doi: 10.1186/s12864-016-3187-z
- Andrews S (2010) FastQC - A quality control tool for high throughput sequence data. In: Available at <http://www.Bioinformatics.Babraham.Ac.Uk/Projects/Fastqc/>.
- Anstead CA, Korhonen PK, Young ND, et al (2015) *Lucilia cuprina* genome unlocks parasitic fly biology to underpin future interventions. *Nat Commun* 6:7344. doi: 10.1038/ncomms8344
- Bahk S, Jones WD (2016) Insect odorant receptor trafficking requires calmodulin. *BMC Biol* 14:83. doi: 10.1186/s12915-016-0306-x
- Bambaradeniya YTB, Karunaratne WAIP, Tomberlin JK, et al (2018a) Temperature and tissue type impact development of *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae) in Sri Lanka. *J Med Entomol* 55:285–291. doi: 10.1093/jme/tjx211
- Bambaradeniya YTB, Karunaratne WAIP, Tomberlin JK, et al (2018b) Temperature and tissue type impact development of *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae) in Sri Lanka. *J Med Entomol* 55:285–291. doi: 10.1093/jme/tjx211
- Bansode S, More VR, Zambare SP, Abd Algalil FM (2016) Effect of constant temperature (20 OC, 25 OC, 30 OC, 35 OC, 40 OC) on the development of the Calliphorid fly of forensic importance, *Chrysomya megacephala* (Fabricus, 1794). *J Entomol Zool Stud JEZS* 4:193–197.
- Baumgartner DL, Greenberg B (1984) The Genus *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) in the New World1. *J Med Entomol* 21:105–113. doi: 10.1093/jmedent/21.1.105
- Bibiloni AG, Castiglioni MS, Pasquevich AF (2007) Do you know what was LENIH and what it has become now? *Phys B Condens Matter* 389:1–8. doi: 10.1534/genetics.108.093419
- Boatright SA, Tomberlin JK (2010a) Effects of Temperature and Tissue Type on the Development of *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae). *J Med Entomol* 47:917–923. doi: 10.1603/ME09206
- Boatright SA, Tomberlin JK (2010b) Effects of Temperature and Tissue Type on the Development of *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae). *J Med Entomol*. doi: 10.1603/ME09206
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B (2014) Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30:2114–2120. doi: 10.1093/bioinformatics/btu170
- Boulard C (1989) Degradation of bovine C3 by serine proteases from parasites *Hypoderma lineatum*

- (Diptera, Oestridae). *Vet Immunol Immunopathol* 20:387–398. doi: 10.1016/0165-2427(89)90083-4
- Brawand D, Soumillon M, Necsulea A, et al (2011) The evolution of gene expression levels in mammalian organs. *Nature*. doi: 10.1038/nature10532
- Brodie BS, Wong WHL, Vanlaerhoven S, Gries G (2015) Is aggregated oviposition by the blow flies *Lucilia sericata* and *Phormia regina* (Diptera: Calliphoridae) really pheromone-mediated? *Insect Sci* 22:651–660. doi: 10.1111/1744-7917.12160
- Bromham L, Penny D, Rambaut A, Hendy MD (2000) The power of relative rates tests depends on the data. *J Mol Evol* 50:296–301. doi: 10.1007/s002399910034
- Byrd JH, Butler JF (1996) Effects of Temperature on *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae) Development. *J Med Entomol* 33:901–905. doi: 10.1093/jmedent/33.6.901
- Cardoso GA, Marinho MAT, Monfardini RD, et al (2016) Evolution of genes involved in feeding preference and metabolic processes in Calliphoridae (Diptera: Calyptratae). *PeerJ* 4:e2598. doi: 10.7717/peerj.2598
- Carman GM, Han GS (2006) Roles of phosphatidate phosphatase enzymes in lipid metabolism. *Trends Biochem. Sci.*
- Carsten LD, Watts T, Markow TA (2005) Gene expression patterns accompanying a dietary shift in *Drosophila melanogaster*. *Mol Ecol* 14:3203–3208. doi: 10.1111/j.1365-294X.2005.02654.x
- Carvalho LML, Thyssen PJ, Linhares AX, Palhares F (2000) A Checklist of Arthropods Associated with Pig Carrion and Human Corpses in Southeastern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95:135–138. doi: 10.1590/S0074-02762000000100023
- Carvalho RA (2007) Isolamento e caracterização do gene d esterase relacionado a resistência a inseticidas organofosforados na mosca praga da pecuária *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae). Universidade Estadual de Campinas
- Casu RE, Eisemann CH, Vuocolo T, Tellam RL (1996) The major excretory/secretory protease from *Lucilia cuprina* larvae is also a gut digestive protease. *Int J Parasitol* 26:623–628. doi: 10.1016/0020-7519(96)00035-5
- Chan YF, Marks ME, Jones FC, et al (2011) Pitx enhancer. *Science* (80-) 327:302–305. doi: 10.1126/science.1182213.Adaptive
- Chaudhury MF, Skoda SR, Sagel A, Welch JB (2010) Volatiles Emitted From Eight Wound-Isolated Bacteria Differentially Attract Gravid Screwworms (Diptera: Calliphoridae) to Oviposit. *J Med Entomol*. doi: 10.1603/ME09235
- Chaudhury MF, Zhu JJ, Sagel A, et al (2014) Volatiles From Waste Larval Rearing Media Attract Gravid Screwworm Flies (Diptera: Calliphoridae) to Oviposit. *J Med Entomol*. doi: 10.1603/ME13193
- Chaudhury MF, Zhu JJ, Skoda SR (2016) Bacterial volatiles attract gravid secondary screwworms (Diptera: Calliphoridae). *J Econ Entomol*. doi: 10.1093/jee/tov390
- Chen TW, Gan RC, Fang YK, et al (2017) FunctionAnnotator, a versatile and efficient web tool for non-model organism annotation. *Sci Rep* 7:10430. doi: 10.1038/s41598-017-10952-4
- Clyne PJ, Warr CG, Freeman MR, et al (1999) A Novel Family of Divergent Seven-Transmembrane Proteins. *Neuron* 22:327–338. doi: 10.1016/S0896-6273(00)81093-4
- Colombo M, Indermaur A, Meyer BS, Salzburger W (2016) Habitat use and its implications to functional morphology: Niche partitioning and the evolution of locomotory morphology in Lake Tanganyikan cichlids (Perciformes: Cichlidae). *Biol J Linn Soc*. doi: 10.1111/bij.12754
- CONSTABLE SA (1994) A Comparison of Proteases Produced by Larvae of *Lucilia cuprina* (Wiedemann), *L. sericata* (Meigen), *Calliphora augur* (F.) and *C. stygia* (F.) (Diptera: Calliphoridae). *Aust J Entomol* 33:203–210. doi: 10.1111/j.1440-6055.1994.tb01218.x
- Cruickshank RH, Paterson AM (2006) The great escape: do parasites break Dollo's law? *Trends Parasitol* 22:509–515. doi: 10.1016/j.pt.2006.08.014
- Cunningham CW, Omland KE, Oakley TH (1998) Reconstructing ancestral character states: A critical

reappraisal. Trends Ecol. Evol.

Dabiré KR, Diabaté A, Namountougou M, et al (2009) Distribution of pyrethroid and DDT resistance and the L1014F kdr mutation in *Anopheles gambiae* s.l. from Burkina Faso (West Africa). Trans R Soc Trop Med Hyg. doi: 10.1016/j.trstmh.2009.01.008

Daborn PJ, Yen JL, Bogwitz MR, et al (2002) A single P450 allele associated with insecticide resistance in *Drosophila*. Science (80-). doi: 10.1126/science.1074170

Day EH, Hua X, Bromham L (2016) Is specialization an evolutionary dead end? Testing for differences in speciation, extinction and trait transition rates across diverse phylogenies of specialists and generalists. J Evol Biol 29:1257–1267. doi: 10.1111/jeb.12867

de Carvalho RA, Torres TT, de Azeredo-Espin AML (2006) A survey of mutations in the *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae) esterase E3 gene associated with organophosphate resistance and the molecular identification of mutant alleles. Vet Parasitol 140:344–351. doi: 10.1016/j.vetpar.2006.04.010

Del Campo ML, Miles CI, Schroe FC, et al (2001) Host recognition by the tobacco hornworm is mediated by a host plant compound. Nature 411:186–189. doi: 10.1038/35075559

Díaz-Roa A, Patarroyo MA, Bello FJ, Da Silva PI (2018) Sarconesin: *Sarconesiopsis magellanica* Blowfly Larval Excretions and Secretions With Antibacterial Properties. Front Microbiol 9:1–13. doi: 10.3389/fmicb.2018.02249

Diniz-Filho JAF, de Sant’Ana CER, Bini LM (1998) An Eigenvector Method for Estimating Phylogenetic Inertia. Evolution (N Y). doi: 10.2307/2411294

Dunn OJ (1964) Multiple Comparisons Using Rank Sums. Technometrics. doi: 10.1080/00401706.1964.10490181

East IJ, Eisemann CGH (1993) Vaccination against *Lucilia cuprina*: The causative agent of sheep blowfly strike. Immunol Cell Biol 71:453–462. doi: 10.1111/j.1440-1711.1993.tb03433.x

Edgar RC (2004) MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. Nucleic Acids Res 32:1792–1797. doi: 10.1093/nar/gkh340

Erzinclioglu YZ (1989) The origin of parasitism in blowflies. Br J Entomol Nat Hist 2:125–127.

Fagnani R, Beloti V, Battaglini APP, et al (2011) Organophosphorus and carbamates residues in milk and feedstuff supplied to dairy cattle. Pesqui Veterinária Bras 31:598–602. doi: 10.1590/S0100-736X2011000700009

FAO (1992) The new world screwworm eradication program, North Africa 1988-1992. Rome

Futuyma DJ, Moreno G (1988) The Evolution of Ecological Specialization. Annu Rev Ecol Syst 19:207–233. doi: 10.1146/annurev.es.19.110188.001231

Garelli A, Gontijo AM, Miguella V, et al (2012) Imaginal discs secrete insulin-like peptide 8 to mediate plasticity of growth and maturation. Science (80-) 336:579–582. doi: 10.1126/science.1216735

Geiser DL, Shen MC, Mayo JJ, Winzerling JJ (2009) Iron loaded ferritin secretion and inhibition by CI-976 in *Aedes aegypti* larval cells. Comp Biochem Physiol - B Biochem Mol Biol 152:352–363. doi: 10.1016/j.cbpb.2009.01.002

Geiser DL, Zhang D, Winzerling JJ (2006) Secreted ferritin: Mosquito defense against iron overload? Insect Biochem Mol Biol 36:177–187. doi: 10.1016/j.ibmb.2005.12.001

Gerstein M, Zheng D (2006) The real life of pseudogenes. Sci. Am. 295:48–55.

Gillespie RG, Benjamin SP, Brewer MS, et al (2018) Repeated Diversification of Ecomorphs in Hawaiian Stick Spiders. Curr Biol 28:941–947.e3. doi: 10.1016/j.cub.2018.01.083

Gori K, Suchan T, Alvarez N, et al (2016) Clustering Genes of Common Evolutionary History. Mol Biol Evol 33:1590–1605. doi: 10.1093/molbev/msw038

Grabherr MG, Haas BJ, Yassour M, et al (2011) Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. Nat Biotechnol 29:644–652. doi: 10.1038/nbt.1883

- Grassberger M, Reiter C (2002) Effect of temperature on development of the forensically important holarctic blow fly *Protophormia terraenovae* (Robineau-Desvoidy) (Diptera: Calliphoridae). *Forensic Sci Int* 128:177–182. doi: 10.1016/S0379-0738(02)00199-8
- Grisi L, Leite RC, Martins JR de S, et al (2014) Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. *Rev Bras Parasitol Veterinária* 23:150–156. doi: 10.1590/S1984-29612014042
- Guimaraes JH, Papavero N (1999) Myiasis in man and animals in the Neotropical region. *Plêiade*
- Guimarães JH, Prado ÂP, Linhares AX (1978) Three newly introduced blowfly species in southern Brazil (Diptera, Calliphoridae). *Rev Bras Entomol* 22:53–60.
- Guschanski K, Warnefors M, Kaessmann H (2017) The evolution of duplicate gene expression in mammalian organs. *Genome Res* 27:1461–1474. doi: 10.1101/gr.215566.116
- Hall M, Wall R (1995) Myiasis of Humans and Domestic Animals.
- Heiman RG, Atkinson RC, Andruss BF, et al (1996) Spontaneous avoidance behavior in *Drosophila* null for calmodulin expression. *Proc Natl Acad Sci*. doi: 10.1073/pnas.93.6.2420
- Hemingway J, Field L, Vontas J (2002) An overview of insecticide resistance. *Science* (80-.).
- Hemingway J, Hawkes NJ, McCarroll L, Ranson H (2004) The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. In: *Insect Biochemistry and Molecular Biology*.
- Huelsenbeck JP, Nielsen R, Bollback JP (2003) Stochastic mapping of morphological characters. *Syst Biol* 52:131–158. doi: 10.1080/10635150390192780
- Jones CD (2004) Genetics of egg production in *Drosophila sechellia*. *Heredity* (Edinb) 92:235–241. doi: 10.1038/sj.hdy.6800401
- Jones CD (1998) The genetic basis of *Drosophila sechellia*'s resistance to a host plant toxin. *Genetics* 149:1899–1908. doi: 10.1017/S0016672301005298
- Junqueira ACM, Azeredo-Espin AML, Paulo DF, et al (2016) Large-scale mitogenomics enables insights into *Schizophora* (Diptera) radiation and population diversity. *Sci Rep* 6:21762. doi: 10.1038/srep21762
- Khaitovich P, Pääbo S, Weiss G (2005) Toward a neutral evolutionary model of gene expression. *Genetics* 170:929–939. doi: 10.1534/genetics.104.037135
- Khaitovich P, Weiss G, Lachmann M, et al (2004) A neutral model of transcriptome evolution. *PLoS Biol*. doi: 10.1371/journal.pbio.0020132
- King MC, Wilson AC (1975) Evolution at two levels in humans and chimpanzees. *Science* (80-) 188:107–116. doi: 10.1126/science.1090005
- Kosmann C, Macedo MP, Barbosa TAF, Pujol-Luz JR (2011) *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) and *Hemilucilia segmentaria* (Fabricius) (Diptera, Calliphoridae) used to estimate the postmortem interval in a forensic case in Minas Gerais, Brazil. *Rev Bras Entomol* 55:621–623. doi: 10.1590/S0085-56262011000400022
- Kumar S, Stecher G, Tamura K (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol* 33:1870–1874. doi: 10.1093/molbev/msw054
- Langmead B, Salzberg SL (2012) Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods* 9:357–359. doi: 10.1038/nmeth.1923
- Larsson MC, Domingos AI, Jones WD, et al (2004) Or83b encodes a broadly expressed odorant receptor essential for *Drosophila* olfaction. *Neuron*. doi: 10.1016/j.neuron.2004.08.019
- Lecheta MC, Thyssen PJ, Moura MO (2015) The effect of temperature on development of *Sarconesia chlorogaster*, a blowfly of forensic importance. *Forensic Sci Med Pathol* 11:538–543. doi: 10.1007/s12024-015-9727-z
- Lee J, Lee H, Chang K, Lee K (1992) Yolk protein and the oocyte development in *Lucilia illustris*.
- Lee KS, You KH, Choo JK, et al (2004) *Drosophila* short neuropeptide F regulates food intake and body size. *J Biol Chem* 279:50781–50789. doi: 10.1074/jbc.M407842200

- Leek JT, Johnson WE, Parker HS, et al (2012) The SVA package for removing batch effects and other unwanted variation in high-throughput experiments. *Bioinformatics* 28:882–883. doi: 10.1093/bioinformatics/bts034
- Leite ACR, Madeira NG, Guimarães M., et al (1983) Primeira ocorrência no Brasil de miíase em bezerro por *Chrysomya albiceps* (Diptera: Calliphoridae). *Arq Bras Med Vet e Zootec* 35:287–288.
- Lemos B, Meiklejohn CD, Cáceres M, Hartl DL (2005) Rates of divergence in gene expression profiles of primates, mice, and flies: Stabilizing selection and variability among functional categories. *Evolution* (N Y) 59:126–137. doi: 10.1111/j.0014-3820.2005.tb00900.x
- Li B, Dewey CN (2011) RSEM: Accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics* 12:323. doi: 10.1186/1471-2105-12-323
- Ling K -Y, Maley ME, Preston RR, et al (1994) New non-lethal calmodulin mutations in *Paramecium* A structural and functional bipartition hypothesis. *Eur J Biochem*. doi: 10.1111/j.1432-1033.1994.tb18882.x
- Lyra ML, Klaczko LB, Azeredo-Espin AML (2009) Complex patterns of genetic variability in populations of the New World screwworm fly revealed by mitochondrial DNA markers. *Med Vet Entomol* 23:32–42. doi: 10.1111/j.1365-2915.2008.00776.x
- Mähler B, Wappler T, Sanmugaraja M, et al (2016) Upper Pleistocene blow flies (Diptera: Calliphoridae) trapped in fossilized crania of large mammals discovered from gravel pits in the Rhine rift valley from Hesse (Germany). *Palaeontol Electron* 19.2.13A:1–12. doi: <https://doi.org/10.26879/612>
- Marinho MAT, Junqueira ACM, Paulo DF, et al (2012) Molecular phylogenetics of Oestroidea (Diptera: Calyptratae) with emphasis on Calliphoridae: Insights into the inter-familial relationships and additional evidence for paraphyly among blowflies. *Mol Phylogenet Evol* 65:840–854. doi: 10.1016/j.ympev.2012.08.007
- Mooers A, Schluter D (1999) Reconstructing ancestor states with maximum likelihood: Support for one- and two-rate models. *Syst Biol*. doi: 10.1080/106351599260193
- Moon SJ, Lee Y, Jiao Y, Montell C (2009) A *Drosophila* Gustatory Receptor Essential for Aversive Taste and Inhibiting Male-to-Male Courtship. *Curr Biol*. doi: 10.1016/j.cub.2009.07.061
- Moretti TC, Thyssen PJ (2006) Miíase primária em coelho doméstico causada por *Lucilia eximia* (Diptera: Calliphoridae) no Brasil: Relato de caso. *Arq Bras Med Vet e Zootec* 58:28–30.
- Moura MO, De Carvalho CJB, Monteiro-Filho ELA (1997) A Preliminary Analysis of Insects of Medico-legal Importance in Curitiba, State of Paraná. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 92:269–274. doi: 10.1590/S0074-02761997000200023
- Muharsini S, Dalrymple B, Vuocolo T, et al (2001) Biochemical and molecular characterization of serine proteases from larvae of *Chrysomya bezziana*, the Old World Screwworm fly. *Insect Biochem Mol Biol* 31:1029–1040. doi: 10.1016/S0965-1748(01)00051-0
- Muharsini S, Sukarsih, Riding G, et al (2000) Identification and characterisation of the excreted/secreted serine proteases of larvae of the Old World Screwworm Fly, *Chrysomya bezziana*. *Int J Parasitol* 30:705–714. doi: 10.1016/S0020-7519(00)00055-2
- Nabity PD, Higley LG, Heng-Moss TM (2007) Light-induced variability in development of forensically important blow fly *Phormia regina* (Diptera: Calliphoridae). *J Med Entomol* 44:351–358. doi: 10.1603/0022-2585(2007)44[351:LVIDOF]2.0.CO;2
- Newcomb RD, Gleeson DM, Yong CG, et al (2005) Multiple mutations and gene duplications conferring organophosphorus insecticide resistance have been selected at the Rop-1 locus of the sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. *J Mol Evol*. doi: 10.1007/s00239-004-0104-x
- Nichol H, Locke M (1989) The characterization of ferritin in an insect. *Insect Biochem* 19:587–602. doi: 10.1016/0020-1790(89)90024-3
- Nielsen R (2005) Molecular Signatures of Natural Selection. *Annu Rev Genet* 39:197–218. doi: 10.1146/annurev.genet.39.073003.112420
- Nolan J, Schnitzerling H (1986) Drug resistance in arthropod parasites. In: *Chemoteraphy of parasitic*

diseases. New York, plenum Press, pp 603–620

Nuzhdin S V., Wayne ML, Harmon KL, McIntyre LM (2004) Common pattern of evolution of gene expression level and protein sequence in *Drosophila*. *Mol Biol Evol* 21:1308–1317. doi: 10.1093/molbev/msh128

Oliveira DL, Vasconcelos SD (2018) Diversity, Daily Flight Activity and Temporal Occurrence of Necrophagous Diptera Associated with Decomposing Carcasses in a Semi-Arid Environment. *Neotrop Entomol* 47:470–477. doi: 10.1007/s13744-017-0540-0

Paradis E, Claude J, Strimmer K (2004) APE: Analyses of phylogenetics and evolution in R language. *Bioinformatics* 20:289–290. doi: 10.1093/bioinformatics/btg412

Pierce W (1945) A case of Pleistocene myiasis from the La Brea pits. *California Acad Sci* 44:8–9.

Pinilla YT, Moreno-Pérez DA, Patarroyo MA, Bello FJ (2013) Proteolytic activity regarding *Sarconesiopsis magellanica* (Diptera: Calliphoridae) larval excretions and secretions. *Acta Trop* 128:686–691. doi: 10.1016/j.actatropica.2013.09.020

Poulin R, Morand S (2000) The Diversity of Parasites. *Q Rev Biol* 75:277–293. doi: 10.1086/393500

Queiroz MMDC (1996) Temperature requirements of *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819) (Diptera, Calliphoridae) under laboratory conditions. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 91:785–788. doi: 10.1590/S0074-02761996000600027

Ranson H, Jensen B, Vulule JM, et al (2000) Identification of a point mutation in the voltage-gated sodium channel gene of Kenyan *Anopheles gambiae* associated with resistance to DDT and pyrethroids. *Insect Mol Biol*. doi: 10.1046/j.1365-2583.2000.00209.x

Revell LJ (2012) phytools: An R package for phylogenetic comparative biology (and other things). *Methods Ecol Evol* 3:217–223. doi: 10.1111/j.2041-210X.2011.00169.x

Richard RD, Gerrish RR (1983) The First Confirmed Field Case of Myiasis Produced by *Chrysomya* Sp. (Diptera: Calliphoridae) in the Continental United States. *J Med Entomol* 20:685–685. doi: 10.1093/jmedent/20.6.685

Richards CS, Crous KL, Villet MH (2009a) Models of development for blowfly sister species *Chrysomya chloropyga* and *Chrysomya putoria*. *Med Vet Entomol* 23:56–61. doi: 10.1111/j.1365-2915.2008.00767.x

Richards CS, Price BW, Villet MH (2009b) Thermal ecophysiology of seven carrion-feeding blowflies in Southern Africa. *Entomol Exp Appl* 131:11–19. doi: 10.1111/j.1570-7458.2009.00824.x

Rifkin SA, Kim J, White KP (2003) Evolution of gene expression in the *Drosophila melanogaster* subgroup. *Nat Genet* 33:138–144. doi: 10.1038/ng1086

Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK (2009) edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26:139–140. doi: 10.1093/bioinformatics/btp616

Rohlf R, Nielsen R (2014) Identifying adaptive and plastic gene expression levels using a unified model for expression variance between and within species. *bioRxiv* 0–21. doi: 10.1101/004374

Rohlf R V., Nielsen R (2015) Phylogenetic ANOVA: The expression variance and evolution model for quantitative trait evolution. *Syst Biol* 64:695–708. doi: 10.1093/sysbio/syv042

Romiguier J, Lourenco J, Gayral P, et al (2014) Population genomics of eusocial insects: the costs of a vertebrate-like effective population size. *J Evol Biol* 27:593–603. doi: 10.1111/jeb.12331

Ruan H, Su Z, Gu X (2016) TreeExp1.0: R Package for Analyzing Expression Evolution Based on RNA-Seq Data. *J Exp Zool Part B Mol Dev Evol* 326:394–402. doi: 10.1002/jez.b.22707

SA B, VR M, SP Z (2016) Effect of Different Constant Temperature on the Life Cycle of a Fly of Forensic Importance *Lucilia cuprina*. *Entomol Ornithol Herpetol Curr Res*. doi: 10.4172/2161-0983.1000183

Salveti M, Corbellini C, Aggiusti C, et al (2012) *Calliphora vicina* human myiasis: A case report. *Intern. Emerg. Med*.

Sandeman RM, Levot GW, Heath ACG, et al (2014) Control of the sheep blowfly in Australia and New Zealand - are we there yet? *Int J Parasitol* 44:879–891. doi: 10.1016/j.ijpara.2014.08.009

- Santolamazza F, Calzetta M, Etang J, et al (2008) Distribution of knock-down resistance mutations in *Anopheles gambiae* molecular forms in west and west-central Africa. *Malar J*. doi: 10.1186/1475-2875-7-74
- Schnur HJ, Zivotofsky D, Wilamowski A (2009) Myiasis in domestic animals in Israel. *Vet Parasitol*. doi: 10.1016/j.vetpar.2009.01.026
- Sereno J, Catto J, Sereno F (1996) Prevenção de miíases umbilicais em bezerros criados extensivamente, no Pantanal, através da utilização de ivermectina. *Comun técnico – Embrapa Pantana* 16:1–5.
- Shapiro MD, Marks ME, Peichel CL, et al (2004) Genetic and developmental basis of evolutionary pelvic reduction in threespine sticklebacks. *Nature* 428:717–723. doi: 10.1038/nature02415
- Shewell G (1987) Calliphoridae. In: *Manual of Nearctic Diptera*. pp 1133–1145
- Simão FA, Waterhouse RM, Ioannidis P, et al (2015) BUSCO: Assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. *Bioinformatics* 31:3210–3212. doi: 10.1093/bioinformatics/btv351
- Sinha SK (2012) Myiasis in domestic animals: new records of calyptate Diptera. *J Parasit Dis* 36:277–279. doi: 10.1007/s12639-012-0109-0
- Soderlund DM, Knipple DC (2003) The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides. *Insect Biochem Mol Biol* 33:563–577. doi: 10.1016/S0965-1748(03)00023-7
- Spindola AF, Zheng L, Tomberlin JK, Thyssen PJ (2016) Attraction and Oviposition of *Lucilia eximia* (Diptera: Calliphoridae) to Resources Colonized by the Invasive Competitor *Chrysomya albiceps* (Diptera: Calliphoridae). *J Med Entomol* 54:tjw170. doi: 10.1093/jme/tjw170
- Stevens J, Wall R (1997) The evolution of ectoparasitism in the genus *Lucilia* (Diptera: Calliphoridae). *Int J Parasitol* 27:51–59. doi: 10.1016/S0020-7519(96)00155-5
- Stevens JR (2003) The evolution of myiasis in blowflies (Calliphoridae). *Int J Parasitol* 33:1105–1113. doi: 10.1016/S0020-7519(03)00136-X
- Stevens JR, Wallman JF, Otranto D, et al (2006) The evolution of myiasis in humans and other animals in the Old and New Worlds (part II): Biological and life-history studies. *Trends Parasitol* 22:181–188. doi: 10.1016/j.pt.2006.02.010
- Tajima F (1993) Simple methods for testing the molecular evolutionary clock hypothesis. *Genetics* 135:599–607. doi: citeulike-article-id:785176
- Takahashi R, Watanabe K, Nishida M, Hori M (2007) Evolution of feeding specialization in Tanganyikan scale-eating cichlids: A molecular phylogenetic approach. *BMC Evol Biol*. doi: 10.1186/1471-2148-7-195
- Talavera G, Castresana J (2007) Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. *Syst Biol* 56:564–577. doi: 10.1080/10635150701472164
- Tang X, Zhou B (2013) Ferritin is the key to dietary iron absorption and tissue iron detoxification in *Drosophila melanogaster*. *FASEB J* 27:288–298. doi: 10.1096/fj.12-213595
- Team RC (2013) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org/> 2013. doi: 10.1348/000712608X366867
- Tellam RL, Bowles VM (1997) Control of blowfly strike in sheep: Current strategies and future prospects. *Int J Parasitol* 27:261–273. doi: 10.1016/S0020-7519(96)00174-9
- Tomberlin JK, Crippen TL, Tarone AM, et al (2017) A review of bacterial interactions with blow flies (diptera: Calliphoridae) of medical, veterinary, and forensic importance. *Ann Entomol Soc Am* 110:19–36. doi: 10.1093/aesa/saw086
- Torres TT, Azeredo-Espin AML (2009) Population genetics of New World screwworm from the Caribbean: Insights from microsatellite data. *Med Vet Entomol* 23:23–31. doi: 10.1111/j.1365-2915.2008.00786.x
- Vandelook F, Newton RJ, Carta A (2018) Photophobia in lilioid monocots: Photoinhibition of seed germination explained by seed traits, habitat adaptation and phylogenetic inertia. *Ann Bot* 121:405–413. doi: