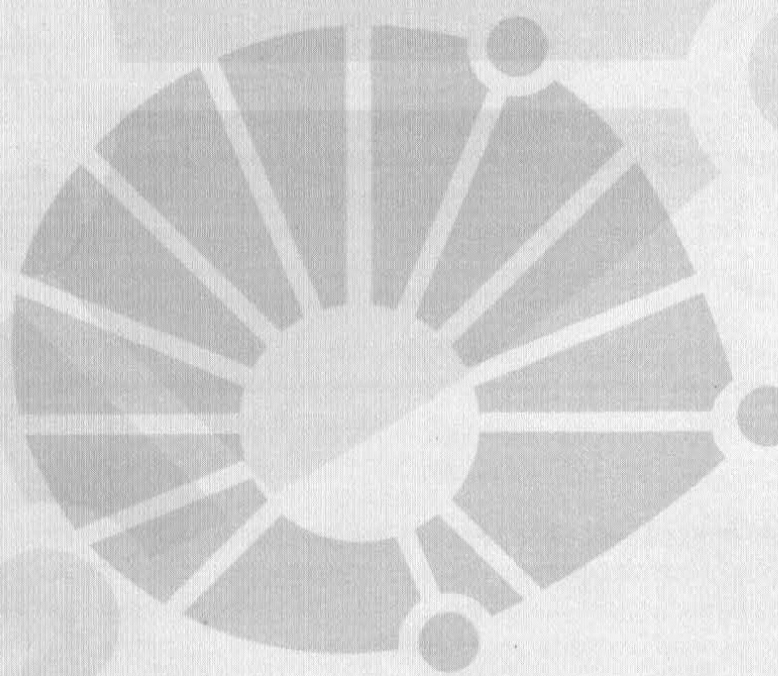


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

BC/42324
IB/81560



UNICAMP

INSTITUTO DE BIOLOGIA

T/UNICAMP

L544_c



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS-UNICAMP
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO

TAÍLA ANDRADE LEMOS

CARACTERIZAÇÃO DA VARIABILIDADE DA MOSCA DO
BERNE *Dermatobia hominis* (DIPTERA:OESTRIDAE) ATRAVÉS
DE DOIS MARCADORES MOLECULARES.

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato(a)
Taíla Andrade Lemos
e aprovada pela Comissão Julgadora.
19/05/2000

Tese apresentada ao Instituto de Biologia
para obtenção do título de MESTRE em
Genética e Biologia Molecular na área de
Genética Animal e Evolução.

Orientadora: Prof.^a Dra. Ana Maria Lima de Azeredo-Espin

Campinas-SP
2000



UNIDADE I 3 / 8156 0
 N.º CHAMADA: TIUM: 712.0
1. 112
 V. Ex
 TOMBO BC/ 423.24
 PROC. 16-278/00
 C ☐ D ☒
 PREÇO RS 11,00
 DATA 22/09/00
 N.º CPD

CM-00146963-3

**FICHA CATALOGRAFICA ELABORADA PELA
 BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

Lemos, Taila Andrade

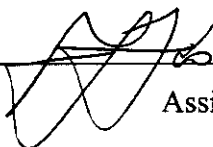
B777a Caracterização da variabilidade da mosca do berne
 L544 *Dematobia hominis* (Diptera: oestridae) através de dois
 marcadores moleculares/Taila Andrade Lemos. - -
 Campinas, SP: [s.n.], 2000.
 104f.:ilus.

Orientadora: Ana Maria Lima de Azevedo-Espin
 Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
 Campinas. Instituto de Biologia.

1. Genética - variabilidade. 2. Estrutura de populações.
3. *Dematobia hominis*. I. Azeredo-Espin, Ana Maria Lima de.
- II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.
- III. Título.

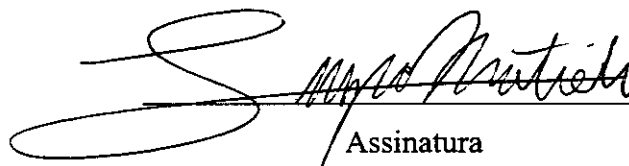
Banca Examinadora

Dra. Ana Maria Lima de Azeredo-Espin



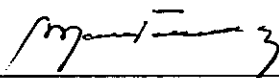
Assinatura

Dr. Sérgio Russo Matioli



Assinatura

Dr. Roland Vencovsky



Assinatura

Dra. Sílvia Nassif Del Lama

Assinatura

*Foi preparando o solo com amor,
Semeando com paciência,
Cuidando com carinho e atenção,
Que você transformou este solo árido em um
solo fértil,
e hoje nós dois podemos juntos colher os frutos
da maturidade, perseverança fé e amor.*

*A você que me ensinou a acreditar na
humanidade Fernando Leme Zaia. Dedico.*

À minha mãe, “Cidinha” Lemos, que soube desempenhar muito bem a difícil tarefa de ser minha mãe e que além disso conseguiu ser uma amiga sempre presente.

Ao meu Pai, Zenon Lemos, em quem sempre me espelhei buscando manter meus princípios de moral e ética.

Aos meus avós João de Sá Lemos (in memorian), Elza Veloso Lemos (in memorian) e Isaura Magalhães de Andrade pelo amor incondicional

Ofereço

Agradecimentos

À Profª Drª Ana Maria Lima de Azeredo-Espin por ter acreditado no meu potencial dando subsídios para que este trabalho fosse desenvolvido, contribuindo na minha formação profissional.

À Profª Drª Sílvia Nassif Del Lama pelas correções e sugestões na análise prévia deste trabalho e por ter me colocado no caminho da genética.

Aos Professores Dr. Roland Vencovsky e Dr. Sérgio Russo Mاتيoli pela participação na análise prévia deste trabalho e pela discussão edificante dos dados que foi mais uma oportunidade de aprendizado.

À tia Edu pelos momentos de reflexão, pelos conselhos e pelos esclarecimentos sobre os radicais livres, além de ter me acolhido em sua casa como parte integrante de sua família.

À Tamara que esteve sempre disposta a ouvir todas as minhas queixas

Aos meus irmãos Fernando, Zenon e Juliana pela amizade incondicional , pelo amor e apoio sempre presente em qualquer situação.

À minha amiga Karla, pela amizade, carinho e participação em todos os momentos do desenvolvimento deste trabalho.

À amiga Rosangela pelo companheirismo, amizade, dedicação constante e pela paciência de tirar minhas dúvidas quase todos os dias.

Aos colegas de laboratório Ana Cláudia, Salete, Patrick, Ana Carolina, Maria Elena, Marco Antonio, Sílvia e aos recém chegados Fabio, Fernando e Tatiana pela amizade dentro e fora do ambiente de trabalho, pela colaboração constante e pelo apoio nos momentos de desânimo.

À Profª Drª Vera Niasaka Soferini pelos conselhos profissionais e pessoais de forma carinhosa e sábia.

Aos meus familiares tio Cri, tia Vólia, tia Neusa, Simone. Davi, Tania, Josi... pelos finais de semanas agradáveis durante os quais recarregava minhas energias para recomeçar a semana de trabalho com mais disposição.

Aos amigos Tiburcio, Sonia, Flavia e Juliana pela compreensão e amizade.

Aos amigos de graduação que nunca se ausentaram Pati, Alemão, Bia, Caio pelo amor e carinho que a distância não foi capaz de apagar.

À Família Zaia, Valdemar, Lia, Camila Raquel e Alexandre por me acolherem em sua casa, fazendo que eu me sentisse sempre muito amada e amparada e pelas vezes que

abdicaram de seus deveres para me ajudarem no desenvolvimento deste trabalho, principalmente na redação final.

À todos os proprietários de fazendas e instituições que colaboraram nas coletas e obtenção do material sem o qual não seria realizado este trabalho.

À Fundação de amparo à Pesquisa do Estados de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de estudo durante a realização do mestrado. Ao Conselho de Desenvolvimento Científico e tecnológico CNPq e a Coordenadoria de Aperfeiçoamento pessoal de Ensino (CAPES), pelo suporte financeiro dado ao projeto, do qual este trabalho faz parte.

“Não basta ensinar aos homens uma especialidade, porque se tornará assim, uma máquina. É necessário que se adquira um sentimento, um senso prático daquilo que é belo, do que é moralmente correto.”

Albert Einstein

ÍNDICE:

Dedicatória	i
Agradecimentos	iii
Epígrafe	v
Resumo	1
Abstract	2
I. Introdução	
I.1 Míases e a espécie <i>Dermatobia hominis</i>	3
I.2 Impacto econômico	7
I.3 Estrutura geográfica de populações	9
I.4 RAPD – Princípios e aplicações da técnica	10
I.5 RFLP – Princípios e aplicações da técnica	14
I.6 Estudos comparativos de marcadores moleculares	17
II Objetivos	20
III Material e métodos	
III.1 Material	21
III.2 Métodos	25
III.2.1 Extração de DNA	25
III.2.2 RAPD-PCR	26
III.2.2.1 Análise dos dados de RAPD	28
III.2.3 RFLP do mtDNA	31
III.2.3.1 Digestão por endonuclease de restrição	31
III.2.3.2 Hibridação	32
III.2.3.3 Análise dos dados de RFLP do mtDNA	35

IV Resultados	
IV.1 Resultados de RAPD	37
IV.2 Resultados de RFLP do mtDNA	48
V Discussão	59
VI Considerações gerais	73
VII Referências bibliográficas	74
Apêndice	

RESUMO

Dermatobia hominis (Linnaeus Jr.) conhecida popularmente como mosca do berne, é uma das principais causadoras de miíase primária em vertebrados, sendo uma das principais pragas da pecuária nacional, causando grandes prejuízos à indústria coureira, laticínios e frigoríficos.

A mosca do berne apresenta uma biologia interessante e ciclo de vida bastante peculiar, o que dificulta a observação da espécie na natureza e a manutenção desta em laboratório. Por estes motivos, a caracterização da variabilidade genética e da estrutura populacional são importantes ferramentas na compreensão da evolução de *D. hominis*. Para este fim, foram utilizadas as técnicas de RAPD, com seis populações, e de RFLP do DNA mitocondrial, com doze populações. Os resultados foram comparados entre si e com estudos anteriores. Além disso, foram comparadas diferentes abordagens que podem ser aplicadas aos dados obtidos com RAPD.

Os resultados de RAPD e RFLP do DNA mitocondrial sugerem que a espécie comporta-se como uma metapopulação, na qual as populações são altamente variáveis e apresentam fluxo gênico entre si.

Quanto às diferentes abordagens aplicáveis aos dados de RAPD foi observado que as medidas de Dice e Jaccard, calculadas a partir da matriz completa, e a distância de Nei (1972) calculada com as modificações de Lynch & Milligan (1994), foram as mais adequadas ao estudo da variabilidade de *D. hominis*.

Com o uso do RFLP do mtDNA foram detectados setenta e dois haplótipos, o que denota alta variabilidade para a espécie.

ABSTRACT

Dermatobia hominis (Linnaeus Jr.), the human bot fly, is one of the most important agent of primary myiasis in vertebrates and one of the most important pests of the national cattle breeding and causes large losses in the industry of leather, milk and meat.

The bot fly has an interesting biology and a very peculiar life cycle. These facts make difficult to observe the specie in nature and to breed it in laboratory. Due to these reasons, the characterization of the genetic variability and structure are important tools in the understanding of the *D. hominis* evolution. Techniques based on RAPD, with six populations, and RFLP of mitochondrial DNA, with twelve populations were applied for this purpose. Estimates of several biometrical procedures applied to the data were compared. Comparisons were also made with results of previous studies. Different approaches for analyzing RAPD data were also compared.

The results of RAPD and mtDNA suggest that the specie behave as a metapopulation whose populations are variable and present gene flow among themselves.

Results of different methods based on RAPD indicated that the Dice and Jaccard measures, calculated from the complete matrix of data, and of Nei distances (1972) with the modifications of Lynch & Milligan (1994) were more adequate for the study of the variability of *D. hominis*.

With the use of mtDNA RFLP, seventy-two haplotypes were detected, indicating high variability for this specie.

I Introdução

I.1 Miíases e a espécie *Dermatobia hominis*

O termo miíase designa a infestação causada por larvas de dípteros em órgãos ou tecidos de animais, incluindo a espécie humana. Hope (1840) utilizou, pela primeira vez, o termo (do grego *myia*, mosca), para diferenciar estas doenças daquelas causadas por larvas de lepidópteros e coleópteros. Zumpt (1965), definiu miíase como sendo a infestação de vertebrados vivos por larvas de dípteros que, em pelo menos uma fase do desenvolvimento, alimentam-se de tecidos vivos ou mortos do hospedeiro, de suas substâncias corporais líquidas ou do alimento por ele ingerido. Estes vertebrados usualmente infestados são mamíferos, aves e répteis (revisão em Hall & Wall, 1995).

As diferentes formas de miíases têm sido classificadas segundo dois critérios: o critério anatômico, baseado na parte do corpo do hospedeiro que foi infestada (miíase cutânea, miíase nasal, etc) e o critério parasitológico, que descreve o tipo de relação entre parasita-hospedeiro (Hall & Wall, 1995).

Segundo o critério parasitológico, existem dois grupos de espécies causadoras de miíase, as que são parasitas obrigatórias, que se desenvolvem necessariamente em hospedeiros vivos, e as parasitas facultativas, que podem se desenvolver em hospedeiros vivos ou mortos. Os parasitas facultativos podem ser divididos em dois grupos: espécies causadoras de miíases primárias, cujas larvas são capazes de iniciar a doença; e espécies causadoras de miíases secundárias, que ocorrem depois que as espécies obrigatórias ou primárias tenham desenvolvido a ferida (Zumpt, 1965 em Hall & Wall, 1995).

Dentre os dípteros causadores de miíases, destacam-se os pertencentes às famílias Calliphoridae, Oestridae e Sarcophagidae, que incluem espécies de grande importância clínica e econômica por infestarem o homem e causarem grandes prejuízos à pecuária (Hall & Wall, 1995).

Na família Oestridae destaca-se a espécie *Dermatobia hominis* (figura 1) pertencente à sub-família Cuterebrinae (Hall and Wall, 1995), conhecida pelo nome vulgar de mosca do berne. Esta espécie é a principal causadora de miíase do tipo furuncular e dermal no homem, animais domésticos e silvestres.

D. hominis apresenta ampla distribuição geográfica ocorrendo do sul do México (24-26 °N) ao norte da Argentina (30-32 °S), em todos os países da América Latina exceto o Chile (Roncalli & Usher,1988; Uribe et. al., 1989).

O grande impacto econômico devido ao prejuízo causado pelas larvas de *D. hominis* nas indústrias coureiras, de laticínios e frigoríficas estimularam vários estudos sobre a biologia, comportamento e estrutura das populações desta espécie.

A mosca do berne foi primeiramente descrita por Linnaeus Jr. 1781, e recebeu o nome de *Oestrus hominis*, pelo fato de suas larvas terem sido encontradas primeiramente parasitando a espécie humana. O histórico dos estudos com *D. hominis* demonstra que esta mosca recebeu diversos nomes específicos, já que era descrita algumas vezes por sua larva e outras através do adulto, que levaram muito tempo até serem definitivamente associados. Em 1903, a espécie foi definida como *Dermatobia hominis* por Ward (Guimarães & Papavero, 1966).



B



C



Figura 1: A) *Dermatobia hominis* adulto .B)Vetor com os ovos da mosca do berne (indicado na seta) presos ao seu abdômen. C) Larva de terceiro estágio da mosca do berne.

A dificuldade encontrada na sistemática da espécie também é encontrada no estudo da morfologia e ecologia pois, *D. hominis* apresenta características bastante peculiares. Os adultos refugiam-se em florestas, matas galeria e bosques de eucaliptos (Andrade, 1929 em Guimarães & Papavero, 1966), pois são muito suscetíveis à dessecação por altas temperaturas e baixa umidade, o que é um fator limitante na capacidade de dispersão. Outra característica do adulto é a ausência de aparelho bucal, determinando um período de vida efêmero, que varia de três a onze dias nas fêmeas e dois a onze dias nos machos em condições de laboratório (Ribeiro et. al. 1993).

Durante a fase adulta, esta espécie dedica-se exclusivamente à reprodução. As fêmeas produzem cerca de 1000 ovos que são depositados em dípteros de hábitos zoófilos, denominados vetores, que por sua vez transportam os ovos até os hospedeiros definitivos. Em cada vetor são depositados cerca de 30 ovos, de modo a não prejudicar a capacidade de voo dos mesmos (Guimarães et al. 1983).

A mosca do berne não apresenta especificidade por vetores, dentre os vetores utilizados, foram identificados alguns dípteros das famílias Culicidae, Simuliidae, Tabanidae, Anthomyiidae, Muscidae, Sarcophagidae, Calliphoridae e até mesmo Oestridae (outros indivíduos de *D. hominis*) em condições de laboratório (Guimarães & Papavero, 1966).

Os ovos de *D. hominis* passam por um período de incubação no vetor de quatro a nove dias, numa temperatura de 20 a 30°C (Koonen & Banegas, 1959; Laake, 1948 em Catts, 1992) e, quando do contato com o hospedeiro vertebrado, estimulada pela elevação da temperatura, ocorre a eclosão das larvas, que penetram a epiderme do hospedeiro através do

folículo capilar, onde se desenvolvem produzindo uma miíase furuncular (Knab, 1914 em Catts, 1992).

O período larval pode variar de acordo com o hospedeiro e foi estimado entre 27 e 128 dias (Banegas & Mourier, 1967 em Catts, 1982). No gado bovino este período foi estimado em 47 dias (Dunn, 1930 em Guimarães & Papavero, 1996). Após o desenvolvimento de três estádios larvais, as larvas maduras abandonam o hospedeiro e caem no solo. Sob condições ideais de umidade e temperatura, transformam-se em pupas. O período de pupa pode variar de 34 a 78 dias (Guimarães & Papavero, 1966) em condições de laboratório, não existindo dados sobre este período em condições naturais. Após o término da fase de pupa, reinicia-se o ciclo de vida da espécie.

Até o momento, a estratégia mais adequada para compreender algumas características da mosca do berne são os métodos indiretos, tais como a análise da variabilidade e estrutura genética das populações através de marcadores moleculares. Dois trabalhos foram realizados com esta espécie utilizando marcadores moleculares. Yotoko (1998) analisando seis populações brasileiras de *D. hominis* através do RAPD concluiu que a mosca do berne é uma espécie panmítica altamente variável. Geurgas (1998) e Geurgas et al (no prelo) estudando 14 populações da mosca do berne encontrou 48 haplótipos mitocondriais, que estão agrupados em três clados mitocondriais, o que estaria sugerindo a introdução de três linhagens maternas distintas no rebanho bovino.

1.2 Impacto Econômico

Em termos econômicos, *D. hominis* causa um prejuízo anual na produção de couro na ordem de milhões de dólares, devido às cicatrizes deixadas pelos orifícios produzidos

quando das infestações por esta praga (Oliveira,1985). Segundo números do Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte da Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), 70% da produção nacional de couro, calculada em 26 milhões de unidades/ano, apresenta algum defeito. Dentre os defeitos apresentados pelo couro produzido no Brasil destacam-se as perfurações produzidas pelas larvas de berne. Além disso o manejo inadequado do couro bovino acarreta ao Brasil um prejuízo anual estimado em US\$ 500 milhões, somando-se o que o país deixa de ganhar com as exportações e com o comércio interno. Há também prejuízos importantes na produção de carne e leite, em decorrência da irritação provocada pelas larvas do berne (Guimarães & Papavero, 1966). As perdas aumentam ainda mais em proporção quando são consideradas as possibilidades de ocorrência de infestações secundárias e infecções nos orifícios deixados pela larva de *D. hominis* (Maia & Guimarães, 1985).

Por todos estes fatores de ordem econômica, estudos envolvendo a variabilidade genética de *D.hominis* são necessários para o desenvolvimento de novas formas de controle, preferencialmente a utilização mais racional de inseticidas (Ivermectina e Abamectina), que ao longo do tempo tornam-se ineficazes por induzirem um processo seletivo que leva à aquisição de resistência genética, exigindo o aumento das doses utilizadas no controle e comprometendo a qualidade da carne e do leite. Alguns pesquisadores alertaram para a ocorrência de traços destes inseticidas no leite e na carne, acarretando consequentemente uma série de problemas à saúde pública (Folha de São Paulo, 10/10/1998).

Métodos alternativos de controle como a esterilização de machos, desenvolvida por Knipling (1937) para a mosca da bicheira *C. hominivorax*, poderiam ser propostos desde que haja um estudo prévio da variabilidade de *D. hominis*, pois no caso da mosca da

bicheira, no Brasil o método de machos estéreis não é o mais indicado, pois foi constatado que esta espécie apresentou alta variabilidade.

I.3 Estrutura geográfica de populações

A estrutura geográfica de populações é um componente fundamental da ecologia e da evolução. O estudo desta estrutura tenta explicar a distribuição e a abundância dos genótipos dentro e entre as populações, e pode ser dividido em dois componentes distintos porém correlacionados: a estrutura demográfica e a estrutura genética (Slatkin, 1994 e Roderick, 1996).

A estrutura demográfica consiste em processos e fenômenos que alteram o número e a distribuição fenotípica dos indivíduos. As classes fenotípicas podem ser idade, razão sexual, história de vida, etc. Os processos incluem nascimento, morte, imigração e emigração. Estes dados dependem da observação e manipulação direta (Slatkin, 1987).

A estrutura genética consiste na compreensão da distribuição genética e é resultado da migração, seleção, mutação, deriva genética e fatores relacionados. Estes dados são obtidos através de marcadores morfológicos e genéticos (Slatkin, 1987).

A vida efêmera dos adultos do berne e a extrema dificuldade de encontrá-los no campo, tanto para a observação do seu comportamento quanto para sua captura e, a dificuldade de criação desta espécie em laboratório (Zeledón & Silva 1987) faz com que seja muito difícil determinar a estrutura demográfica desta espécie. Já a estrutura genética pode ser mais facilmente estimada com a ajuda de uma grande variedade de marcadores moleculares, que podem ser aplicados às larvas de *D. hominis*. Estas larvas podem ser

facilmente coletadas em seus hospedeiros, especialmente o gado bovino, como será explicado posteriormente.

Recentes adaptações às teorias clássicas de genética de populações permitem seu uso em marcadores baseados no polimorfismo de DNA, não só expandindo os dados disponíveis, mas facilitando e ampliando a interpretação dos mesmos (Roderick, 1996).

Os marcadores moleculares podem diferir quanto ao tipo de herança, nível de polimorfismo detectado e natureza da seleção à qual estão sujeitos, desta forma podem diferir quanto aos valores atribuídos à estrutura genética e seus determinantes (Ross et al., 1997). Por estas razões não existe um marcador universal, que possa responder todas as questões levantadas no estudo de populações. E para uma melhor compreensão da estrutura de populações de uma espécie, quanto maior o número de marcadores utilizados mais consistentes será a análise e as conclusões sobre a espécie.

Neste trabalho, foram utilizados dois marcadores moleculares, que possuem heranças diferentes: o RAPD (Random Polymorphic Amplified DNA) e RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) do DNA mitocondrial, dando continuidade aos trabalhos de Yotoko (1998) e Geurgas (1998), buscando uma melhor compreensão dos processos envolvidos na evolução da espécie *D. hominis*.

I.4 RAPD- Princípios e Aplicações da Técnica

A biologia molecular teve um grande avanço com o desenvolvimento da técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction, Saiki et. al., 1988) que consiste na amplificação de fragmentos de DNA através de ciclos alternados de temperatura. Posteriormente surgiram

derivações desta técnica que produziram classes específicas de marcadores moleculares, entre elas o RAPD (Williams et. al. , 1990; Welsh & McClelland., 1990).

O RAPD é baseado na amplificação por PCR de fragmentos aleatórios de DNA (Williams et al., 1990), através do uso de oligonucleotídeos de sequência arbitrária conhecidos como “primers”. Estes oligonucleotídeos possuem poucos pares de base (pb) de comprimento, de sequência aleatória, alto conteúdo de CG (de 50 a 80%), para cada reação é utilizado apenas um “primer” e a temperatura de hibridação é baixa (baixa estringência). Os produtos de amplificação do RAPD podem ser facilmente separados por eletroforese em gel de agarose, corados com Brometo de Etídeo e visualizados através de luz Ultravioleta (U.V.).

Centenas de sítios polimórficos (aparentemente neutros) podem ser detectados rapidamente (Bowditch et al. 1993), sem o conhecimento prévio de qualquer sequência de DNA referente à espécie estudada, utilizando uma quantidade relativamente baixa de DNA, já que a técnica se baseia no uso do PCR. Além disso, não há a necessidade do uso de radioisótopos (Hadrys et al., 1992 e Black, 1993).

Em sua maioria, os loci amplificados por RAPD correspondem a regiões não codificadoras e, neste sentido, a deriva genética e as mutações assumem um papel muito mais importante que a seleção natural, na evolução destas sequências, o que faz com que o RAPD seja interessante no estudo de forças evolutivas estocásticas em dinâmicas de populações (Haymer, 1994b)

Apesar destas vantagens, o RAPD apresenta baixa reprodutibilidade (Meunier & Grimont, 1993; Ellsworthy et al., 1993; Michel et al., 1994), homologia duvidosa entre produtos co-migrantes (Cognato et al., 1995; Rieseberg, 1996) e herança dominante (Williams et al., 1990). A reprodutibilidade dos fragmentos amplificados depende de vários

fatores tais como, a concentração do “primer”, a concentração da amostra e a temperatura de hibridação. Além disso, após a padronização, nenhum fator pode ser alterado, incluindo a marca da polimerase utilizada e o termociclador, até o fim do trabalho.(Yong-h & Kohel, 1994; Riedy et al., 1992 e Scott, 1992).

Cenis et al. (1993) considera que os problemas na reprodutibilidade do RAPD podem ser resolvidos com uma boa padronização, eliminando os fragmentos não reproduzíveis da análise. Porém, considera que enquanto não haja uma padronização mais efetiva, os resultados de diferentes laboratórios serão dificilmente comparáveis, devido à grande variedade de termocicladores e fabricantes de reagentes disponíveis.

O polimorfismo detectado pelo RAPD pode ser devido a mutações pontuais nos sítios de ligação do “primer” ou a inserções e deleções que alterem a distância entre estes sítios. O polimorfismo é reconhecido pela presença de um fragmento amplificado em um dos genótipos em relação à ausência do mesmo fragmento no outro (Williams et al., 1993).

O RAPD é utilizado em estudos de genética de populações e de taxonomia molecular (Welsh & Mc Clelland, 1990; Lanham et al., 1995); mapeamento genético (Binelli & Bucci, 1994; Plomion *et al.*, 1995); tipagem molecular de genótipos e de espécies, melhoramento e biossistemática (Hillis, 1995).

Esta técnica tem sido aplicada a uma ampla variedade de organismos incluindo bactérias, fungos, plantas, invertebrados e vertebrados (Welsh & McClelland, 1990; Williams et al., 1990; Welsh et al., 1991; Chapco et al., 1992; Waugh & Powell, 1992; Williams et al., 1993).

Uma das primeiras aplicações do RAPD em espécies de insetos foi a diferenciação entre populações naturais de duas espécies de grilo *Melanoplus sanguinipes* e *M. femurrubrum* (Chapco et al., 1992) que, pelas análises morfométricas, de mtDNA e de

isozimas não foram diferenciadas . Esta metodologia também foi eficiente para diferenciar e identificar populações de mosquito *Aedes aegypti* (Ballinger-Crabtree et al.1992), subespécies de *A. scutellaris* (Kambamphati et al. 1992) e para caracterizar espécies crípticas de *Anopheles gambiae* e *A. arabiensis* (Wilkerson et al., 1993).

Em populações naturais da mosca das frutas *Ceratitis capitata*, a técnica de RAPD-PCR tem sido eficiente na caracterização da variabilidade em populações de diferentes localidades geográficas nos Estados Unidos, Havaí, Argentina e Israel (Haymer & McInnis, 1993), entre populações do Havaí e Okinawa (Haymer, 1995) e em populações africanas desta espécie (Baruffi *et al.*, 1995).

Na sistemática de insetos, a identificação de espécies e a filogenia de um grupo de coleópteros (*Ipes grandicollis*) foi realizada através de RAPD. Estas espécies têm morfologia muito semelhante e são simpátricas. A filogenia baseada nos dados de RAPD foi congruente com a reconstrução por dados de isoenzimas (Cognato et al., 1995).

Outros grupos de insetos analisados através desta técnica foram afídeos e seus parasitóides (Black *et al.*,1992; 1993), homópteros (Gawel & Bartlett, 1993; Mendel *et al.*, 1994), himenópteros (Vanlerberghe-Masutti, 1994; Edwards & Hoy, 1995), coccinélidos (Roehrdanz & Flanders, 1993), lepidópteros (Dowdy & McGaughey, 1996), mosca doméstica (Chen & Bull, 1994) e no califorídeo *Lucilia sericata* (Stevens & Wall, 1995).

Landry & Lapointe (1996) analisaram a utilização do marcador RAPD em estudos filogenéticos e questionaram qual a medida de distância seria mais apropriada para este fim e qual seria a mais estável quanto à variação no número de “ primers” utilizados. Estes autores concluíram que as melhores medidas de distância genética em estudos filogenéticos são Dice (Dice, 1945) e Jaccard (Jaccard, 1901), pois os dados apresentaram-se concordantes e estas duas medidas não apresentaram grandes flutuações quando o número

de “primers” era alterado . A medida de Coincidências simples (Sokal & Michener, 1958) apresentou resultados semelhantes aos encontrados com Dice e Jaccard, porém apresentou uma alta flutuação quando foi alterado o número de “primers” utilizados.

I.5 RFLP: Princípios e Aplicações da Técnica

Em marcadores moleculares do tipo RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism – Botstien et al. 1980, em Nei, 1987), a detecção do polimorfismo entre indivíduos é baseada na diferença de tamanho dos fragmentos de restrição do DNA, digerido por uma determinada endonuclease. Os fragmentos são observados em autoradiogramas após hibridização em uma membrana com uma sonda específica (Southern, 1975). Uma vez que as endonucleases de restrição cortam o DNA em sítios específicos (Linn & Arber, 1968; Meselson & Yuan, 1968 em Avise, 1979), qualquer mutação pontual dentro de um determinado sítio resulta na perda ou ganho de um sítio de reconhecimento gerando fragmentos de tamanhos diferentes. Os tamanhos dos fragmentos também podem variar a partir de eventos de inserção e deleção entre os sítios de restrição.

O mtDNA animal tem sido utilizado freqüentemente para análise de RFLP devido à sua organização simples e uniforme, ausência de recombinação, herança materna na maioria dos casos e taxa de substituição nucleotídica relativamente alta (Brown et al., 1979). O genoma mitocondrial animal ocorre normalmente na forma de uma molécula de dupla fita circular fechada, exceto para alguns cnidários e em *Tetrahymena*, onde foi observado na forma de uma ou duas moléculas lineares (Flavel & Jones, 1970; Arnberg et al., 1975; Bridge et al., 1992). A molécula de mtDNA animal possui informação para codificar 12 ou 13 genes responsáveis pelas subunidades protéicas dos complexos

respiratórios da membrana interna da mitocôndria, 2 RNAs ribossômicos (rRNA) e 22 RNAs transportadores (tRNA) (revisão em Moritz et al. 1987). Existe ainda uma região não codificadora que contém a origem de replicação para a cadeia pesada do mtDNA. Em vertebrados, é conhecida como região “D-loop” (Brown, 1983) e, em invertebrados, como região rica em A+T (Clary & Wolstenholme, 1987). A estrutura compacta do mtDNA animal faz com que grande parte da variação detectada esteja localizada nesta região não codificadora ou em pequenas regiões intergênicas (revisão em Gray, 1989).

A partir da década de 80, o mtDNA começou a ser amplamente utilizado em estudos evolutivos, principalmente nos níveis intra e interespecíficos (Wilson et al., 1985; Powell, 1994). Devido às suas características, a variação populacional detectada com essa molécula é maior que aquela obtida com o uso de isozimas, que eram, até então, os marcadores moleculares mais utilizados.

Estudos, utilizando vários táxons de animais, têm demonstrado que a análise do MtDNA é um método sensível para detectar a estrutura populacional de uma espécie e/ou espécies crípticas (Avice & Lansman, 1983). É também utilizado em estudos de padrões de variação geográfica e padrões de colonização de uma espécie (Avice et al., 1987). Grande parte dos trabalhos que envolvem a análise do mtDNA foram revisados por Wilson et al. (1985), Avice et al., (1987), Moritz et al., (1987) e Wolstenholme (1992).

A análise do mtDNA em populações do roedor *Peromyscus maniculatus* da América do Norte revelou que esta espécie é estruturada em populações distintas, enquanto que a análise de alozimas não permitiu mostrar tal subdivisão (Avice et al. 1979). Lamb & Avice (1992), analisando 53 indivíduos de populações da serpente *Malaclemys terrapin* utilizando 18 endonucleases, verificaram polimorfismo de tamanho, heteroplasmia (presença de mais de um tipo de mtDNA no indivíduo), e um único sítio de restrição pareceu ser geograficamente

informativo. Com apenas este sítio polimórfico, foi possível demonstrar que esta espécie está subdividida em dois grupos um ao norte e outro ao sul da Flórida, região de Cabo Canaveral nos Estados Unidos. Em invertebrados, principalmente em insetos, vários autores (Clary & Wolstenholme, 1983; Moritz et al., 1987; Crozier et al., 1989; Harrison, 1989; Yoon & Aquadro, 1994 e Simon et al., 1994) têm utilizado o genoma mitocondrial com o objetivo de obter dados comparativos que indiquem similaridade genética, taxas de evolução e relações filogenéticas.

Entre os insetos, as espécies de dípteros têm sido as mais analisadas em estudos genéticos utilizando o mtDNA. Em mosquitos dos gêneros *Aedes* e *Anopheles*, juntamente com estudos do RNA ribossomal e alozimas, verificou-se a utilidade do mtDNA para detecção de espécies crípticas e comprovou-se que vários subgrupos de *Aedes*, (*A. albopictus* e *A. scutellaris*) que não exibem uma divergência morfológica significativa, podem ser diferenciadas através do MtDNA (Mitchell et al., 1992; Kambhampati et al., 1992a; Kambhampati & Karamjit, 1991 e Cann et al., 1993). Sheppard et al. (1992), analisando o mtDNA com endonucleases de restrição de populações naturais e de laboratório da mosca das frutas, *Ceratitis capitata*, provenientes do Havaí, Venezuela, Argentina, Califórnia e Guatemala, verificaram a existência de dois haplótipos mitocondriais entre todas as populações estudadas. O haplótipo observado na amostra do Havaí não correspondeu ao apresentado pela população da Califórnia, fornecendo uma forte evidência de que a infestação na Califórnia não foi causada por *Ceratitis* provenientes do Havaí. Szalanski et al. (1996) não encontraram variação no mtDNA de *Stomoxys calcitrans* entre populações do Canadá, Nebraska e Texas, o que é um indicativo de que existe um alto fluxo gênico entre elas.

Dentre os dípteros, espécies do gênero *Drosophila* são as que apresentam o mtDNA mais amplamente estudado, a nível bioquímico, genético e populacional. (Goldring &

Peacock, 1977; Hale & Beckenbach, 1985; Latorre et al., 1986; De Salle et al., 1986, 1987a, 1987b; De Salle & Templeton, 1992; Afonso et al., 1990; Hale & Singh, 1991; Halliburton & Barker, 1993; Pissios & Scouras, 1993).

1.6 Estudos Comparativos de Marcadores Moleculares

Visto que não existe um marcador universal vários autores realizaram estudos comparativos, em diversos organismos, utilizando mais de um marcador. Estes estudos visavam identificar qual a melhor técnica se aplicaria ao estudo em questão, ou apenas confirmar dados anteriormente obtidos com outros marcadores.

Puterka et al, (1993) estudaram a variação genética e relações filogenéticas em populações russas de *Diuraphis noxia*, utilizando isozimas e RAPD. A análise de isozimas não revelou variabilidade e a média da heterozigosidade esperada foi de 4,9 %. Em contraste, a análise com o RAPD revelou alta variabilidade nas mesmas populações. As árvores resolvidas por ambos os métodos foram concordantes.

A análise de sequência de genes mitocondriais e RAPD foi utilizada por Stevens & Wall (1996b), para caracterizar a variação genética intraespecífica de duas espécies de Calliphoridae consideradas pragas, *Lucilia sericata* e *L. cuprina*. Para *L. sericata* não foi observada nenhuma evidência de isolamento genético, apesar da separação geográfica entre as populações estudadas. Para *L. cuprina* foram detectados diversos padrões de variação genéticos, possivelmente associados ao isolamento geográfico. Para estas espécies de Calliphoridae, as conclusões obtidas pela análise de RAPD foram corroboradas pelos dados de sequência do mtDNA.

Reyes & Ochando (1998) utilizaram o RFLP do mtDNA, isozimas e RAPD para determinar a origem geográfica de 4 populações de *Ceratitis capitata* de três diferentes regiões da Espanha e uma população de laboratório. Os resultados obtidos tanto com RAPD quanto o RFLP do mtDNA indicaram a origem correta da população de laboratório, o que não aconteceu com a análise de isozimas, provavelmente, porque esta é uma técnica fortemente afetada por restrições seletivas. Os autores discutem os efeitos do afunilamento populacional sofrido pela população do laboratório, que influencia a variabilidade genética e a capacidade dos diversos marcadores para detectar a origem geográfica da mesma.

Para a espécie *Cochliomyia hominivorax* foi detectada uma alta estruturação entre populações do sudeste do Brasil e norte da Argentina, acompanhada de alta variabilidade nestas populações. Estas conclusões foram obtidas com a análise de RAPD (com um índice de fixação de 0,12) (Infante et al. 1999), de isoenzimas ($F_{st} = 0,21$) (Infante et al. in prep) e do RFLP do DNA mitocondrial ($F_{st} = 0,23$) (Infante & Azeredo-Espin, 1995).

Yotoko (1998) estudando a variabilidade genética de seis populações do Sudeste brasileiro de *D. hominis* com sete “primers” de RAPD, encontrou uma alta variabilidade; pouca divergência entre as populações analisadas, o que estaria indicando a ocorrência de fluxo gênico entre elas. O valor de F'_{ST} (0,058) indicou a não estruturação destas espécie. Geurgas (1998) e Geurgas e Azeredo-Espin (no prelo) analisou a variabilidade da mosca do berne em 14 populações do sudeste brasileiro utilizando, como marcador, o RFLP do DNA mitocondrial, com oito enzimas de restrição, foram identificados 48 haplótipos mitocondriais agrupados em 3 clados distintos. A existência de diferentes clados mitocondriais nas populações analisadas é resultado, provavelmente, da introdução de, pelo menos, 3 linhagens maternas no rebanho bovino. A ausência de estruturação da espécie em relação ao mtDNA (ϕ_{ST}) e a presença de haplótipos raros compartilhados entre as

localidades sugerem a existência de fluxo gênico. Portanto, ambos os estudos sugerem que as amostras analisadas são parte de uma única população panmítica altamente variável.

II Objetivos

O presente trabalho tem como objetivos:

- a) Dar continuidade às análises de variabilidade de *D. hominis* através dos marcadores RAPD e RFLP do mtDNA, aumentando o número de populações, expandindo a amostragem para outras regiões do país no intuito de prosseguir os estudos e fortalecer as hipóteses anteriormente propostas.
- b) Comparar os resultados do presente trabalho com os resultados obtidos anteriormente, para RAPD e RFLP, a fim de verificar a reprodutibilidade dos marcadores.
- c) Comparar os resultados obtidos com RAPD e RFLP do mtDNA para verificar se estes marcadores, com padrões diferentes de herança, levam às mesmas inferências a respeito da história evolutiva da espécie.
- d) Comparar as diferentes abordagens estatísticas freqüentemente utilizadas para quantificar a variabilidade visualizada via RAPD, através da manipulação dos dados obtidos para *D. hominis*.
- e) Fornecer subsídios básicos sobre a variabilidade desta espécie para que programas de controle alternativos possam ser desenvolvidos.

III Material e Métodos

III.1 Material

D. hominis apresenta uma ampla distribuição geográfica e é encontrada em quase todo território brasileiro. Porém não foi registrada a ocorrência desta espécie nas regiões Norte e Nordeste de acordo com informações obtidas por consulta ao Impa e Casa da Agricultura e Pecuária da Bahia (comunicação pessoal, out/98). Por isso, a amostragem abrangeu as regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul, sendo melhor a amostragem da região Sudeste por ter uma grande prática pecuarista. A proximidade do nosso local de trabalho, facilitou os contatos e as coletas, visto que alguns produtores ainda possuem uma certa resistência quanto a realização de coletas em suas propriedades.

As coletas foram realizadas no período compreendido entre março de 1998 a abril de 1999. Todos os indivíduos analisados foram coletados diretamente do hospedeiro vivo em fazendas de criação de gado de corte e/ou leite. À medida do possível, foram utilizados indivíduos coletados em diferentes hospedeiros, buscando evitar a amostragem de indivíduos irmãos. As coletas foram realizadas nas seguintes localidades (Figura 2):

- a) Socorro, São Paulo, coletado no frigorífico, no dia 04/03/1998, (11 indivíduos).
- b) Campinas, São Paulo, coletado em duas fazendas, no dia 06/03/1998, (11 indivíduos) 5 de uma fazenda e 6 de outra.
- c) Patrocínio Paulista, de São Paulo, coletado em duas fazendas, no dia 15/08/1998,(11 indivíduos) 5 de uma fazenda e 6 de outra.

- d) São Roque de Minas, Minas Gerais, coletado em quatro fazendas, no dia 03/09/1998, (11 indivíduos) 3 indivíduos de 3 fazendas e 2 de outra fazenda.
- e) Pelotas, Rio Grande do Sul, coletado em uma fazenda, no dia 16/01/1999, (8 indivíduos)
- f) Cáceres, de Mato Grosso, coletado em cinco fazendas, no dia 27/04/1999, (11 indivíduos) 6 de uma fazendas, 2 de outra e 1 de cada um das outras 3 fazendas.

Após a coleta, as larvas classificadas como terceiro estágio foram mantidas em estufa de temperatura e umidade controladas (BOD) a 27° C e 90% de umidade até atingirem a fase de pupa. As pupas foram mantidas por mais 20 dias em BOD nas mesmas condições, sendo, posteriormente, congeladas e preservadas em freezer -70°C, até o momento da extração do DNA.

Para a análise do DNA mitocondrial através do RFLP foram analisadas também mais seis populações, que já haviam sido analisadas com o RAPD, para que as mesmas populações e indivíduos fossem analisados com os dois marcadores. As populações que haviam sido analisadas com RFLP do mtDNA não foram utilizadas para o RAPD pois, muitas das amostras haviam sido extraídas de larvas e como padronizados por Yotoko (1998) para a reação de RAPD só pode ser utilizado DNA extraído de pupas. As seis amostras utilizadas para análise de RFLP do mtDNA foram:

- g) Anápolis, Goiás, coletado em duas fazendas, no dia 09/11/1997, 11 indivíduos, 7 de uma fazenda e 5 da outra.
- h) Brasópolis, Minas Gerais, coletado em uma fazenda, no dia 26/10/1996, 11 indivíduos.
- i) Pirassununga, São Paulo, coletado em cinco fazendas, no dia 29/04/1996, 11 indivíduos, 5 em uma fazenda, 2 em outras duas e 1 em cada uma das outras três fazendas.

j) Presidente Prudente, São Paulo, coletado em uma fazendas, no dia 07/05/1997, 7 indivíduos.

l) São Carlos, São Paulo, coletado em cinco fazendas, no dia 19/09/1997, 11 indivíduos, 4 em uma fazenda, 2 em outras 3 três fazendas e 1 em cada um das outras duas fazendas.

m) Ponta Grossa, Paraná, coletado em duas fazendas, no dia 27/01/1997, 11 indivíduos, 10 em uma fazenda e um, na outra.

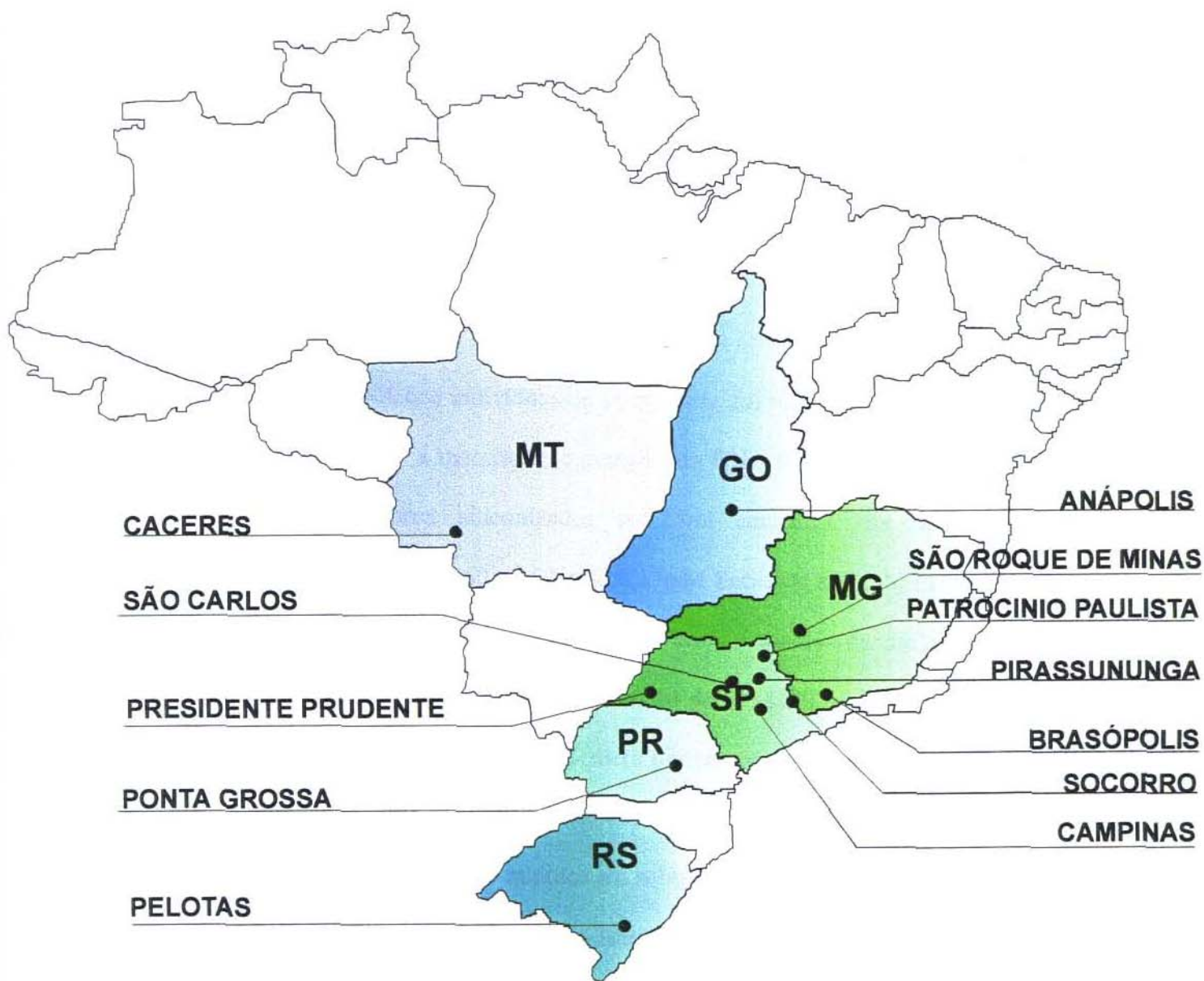


Figura 2. Mapa das regiões onde foram coletadas as 12 populações de *D. hominis* analisadas

III.2 Métodos:

O estudo da variabilidade genética da mosca do berne *D. hominis* foi realizado a partir da análise do polimorfismo do DNA genômico, através do marcador RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), descrito por Williams et al. (1990) e do DNA mitocondrial, através do marcador de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (Wilson et al., 1985), segundo as etapas descritas a seguir:

III.2.1 Extração do DNA:

A extração do DNA dos indivíduos de *D. hominis*, foi realizada utilizando-se pupas, sem o casulo, para facilitar a maceração e extração do DNA (Geurgas, 1998). Estas foram separadas em tubos Corex siliconizados de 15ml contendo 1ml de tampão de homogeneização (10mM TRIS, 60 mM NaCl, 0,15mM Sacarose e 10mM EDTA) pH 7,5. Cada indivíduo foi homogeneizado manualmente com o auxílio de um macerador de “teflon”. Em seguida, foi adicionado 1ml de tampão de lise (300 mM TRIS, 1,24% SDS, 20 mM EDTA e 0,7% do volume de DEPC- dietil pirocarbonato), seguido de incubação no gelo por 15 minutos. A cada tubo, foram adicionados 2ml de Fenol. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 3000g por 10 minutos e o sobrenadante foi transferido para um tubo Corex de 15ml. Foram então adicionados 1ml de fenol e 1ml de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). Cada tubo foi centrifugado a 3000g por 10 minutos e o sobrenadante transferido para um tubo Corex de 15ml onde foram adicionados mais 2ml de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). Os tubos foram novamente centrifugados a 3000g. Uma vez retirado o sobrenadante, foram a ele adicionados 1,5ml de TE (10mM TRIS-CL, 1mM

EDTA), 150µl de NaOAc 3M e 9 ml de etanol absoluto a -20°C. Esta solução foi incubada a -20°C por 2 horas. Após a incubação, os tubos foram centrifugados a 11000g por 45 minutos a 4°C para a obtenção de um precipitado que foi suspenso em 1ml de TE, 50µl de NaOAc 3M e 2,75ml de etanol absoluto a -20 °C e precipitado novamente por 45 minutos a -70°C. Após uma segunda centrifugação, idêntica à anterior, o precipitado de DNA foi seco à temperatura ambiente, recolocado em suspensão em 400µl de TE e mantido em tubos microtubos a -20°C (mod. a partir de Sambroock *et al.*, 1989).

Para a amplificação por RAPD é necessário realizar a extração do RNA da amostra. Para isto, 100µl de cada amostra foram selecionados e colocados em tubos microtubos com a adição de mais 100µl de TE. O DNA diluído em T.E. restante da extração foi armazenado para o estudo do mtDNA através da técnica de RFLP. As amostras diluídas foram tratadas com 1µl de RNase (10ng/µl) e sofreram uma nova extração com 100µl de fenol e 100µl clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), e logo em seguida com 200µl de clorofórmio : álcool isoamílico (24:1), idêntica à anterior, porém com os volumes reduzidos. Após a extração, o DNA foi mantido em suspensão no volume original de 100µl. Após este procedimento, amostras de 2µl foram submetidas ao procedimento de eletroforese em gel de agarose a 1% a fim de quantificar o DNA a partir da comparação de intensidade das bandas com o DNA de fago λ (5ng/µl). Uma vez quantificado, o DNA de cada amostra foi diluído em tampão TRIS-EDTA para uma concentração final de 1ng/µl, para ser utilizado em reações de amplificação.

III.2.2 RAPD-PCR

As reações de RAPD-PCR foram realizadas com 2,5mM de $MgCl_2$; 5,8pmol de oligo-DNA (“primer”) ; 2,0mM de dNTPs; 2,0 U de *Taq* DNA Polimerase (Gibco BRL) e 2,5 μ l de tampão para PCR (20mM Tris-HCl, pH 8,0); 0,1 mM EDTA; 1mM DTT; 0,5mg/ml BSA; 50% (v/v) glicerol, estabilizadores). Além disso, de cada reação de amplificação, foi feita uma replicata com o dobro da concentração de DNA, a fim de diminuir o erro devido a artefatos de técnica. Assim, as reações continham 5 ou 10 μ l de DNA genômico a uma concentração de 1ng/ μ l, para um volume de 25 μ l foi completado com H_2O milli Q. Além das repetições, foi efetuado, para cada conjunto de amostras amplificadas por um determinado “primer”, um controle no qual o DNA foi substituído pelo mesmo volume de H_2O milli Q, a fim de detectar eventuais contaminações. Fragmentos de tamanho coincidente com algum fragmento presente no controle não foram utilizados na análise.

As amplificações foram realizadas de modo automatizado através de um sistema de variação cíclica e controle de temperatura (*GeneAmp PCR System 9600*,. *Perkin Elmer*) programado da seguinte maneira: um ciclo de cinco min. a 94°C; 45 ciclos de 94°C por 1 min., 36°C por 1 min. e 72°C por 2 min. e 1 ciclo final de 72°C por 7 min.

Neste trabalho, foram utilizados seis “primers” dos sete previamente padronizados por Yotoko (1998) do Kit Operon: OPJ-01, CCCGGCATAA; OPJ-06, TCGTTCCGCA; OPN-03, GGTACTCCCC; OPN-05, ACTGAACGCC; OPN-07, CAGCCCAGAG; OPN-

14, TCGTGCGGGT. Os “primers” previamente selecionados foram aqueles que apresentavam repetibilidade das bandas, e sua melhor visualização.

Os produtos obtidos via RAPD-PCR foram visualizados em géis de agarose (1,5%) e submetidos à eletroforese por quatro horas a uma corrente de 60 a 80 mA. Foram utilizados como marcadores de peso molecular *1kb ladder* e ϕ X 174 digerido com *Hae III*. Após 4 horas de migração dos fragmentos, os géis foram retirados da cuba de eletroforese, corados com EtBr por quinze minutos e lavados em água destilada por vinte minutos, a fim de que os fragmentos de DNA amplificados fossem claramente visualizados e identificados. A visualização foi feita em um transiluminador U.V., sobre o qual os fragmentos amplificados foram visualizados e fotografados com uma câmara Polaroid MP4⁺.

III.2.2.1 Análise dos Dados de RAPD

Cada indivíduo estudado teve seu DNA extraído e examinado com cada um dos seis “primers” utilizados. Foram selecionados todos os fragmentos amplificados que apareceram no gel de eletroforese de forma clara, repetidos nas duas concentrações de cada amostra e ausentes na reação controle.

Uma vez selecionados os fragmentos a serem utilizados na análise, uma matriz de dados foi construída de forma que cada linha contivesse o nome da população e a identificação numérica de cada indivíduo. As informações a respeito das bandas produzidas por RAPD-PCR foram plotadas de forma que ‘1’ representasse a presença e ‘0’ a ausência de cada fragmento em cada indivíduo da matriz original.

A partir desta matriz foram calculadas as similaridades dentro e entre populações com a utilização dos índices de Dice (1945) e Simples coincidência (Sokal & Michener,

1958). Estes índices foram calculados com o auxílio do programa RAPDPLOT (Black, 1997). O índice de Jaccard (1908) foi calculado com o programa JACCARD 2.0 (Mazeron, 2000)

Uma segunda matriz foi derivada da original, restrita aos fragmentos menos frequentes em cada população. Esta restrição foi efetuada a fim de minimizar os possíveis erros de análise, os quais poderiam superestimar ou subestimar a variabilidade encontrada. A redução da matriz foi baseada na restrição dos fragmentos com frequência maior que $1-3N$, onde N é o número de indivíduos por amostra, proposta por Lynch & Milligan (1994). As medidas de similaridade fenética: Dice, Coincidências simples e Jaccard (Jaccard, 1901) também foram calculadas com a matriz reduzida com o auxílio do programa NTSYS 1.7 (Rohlf & Slice, 1992).

A partir da matriz reduzida, seguindo os pressupostos estabelecidos por Lynch & Milligan (1994), é possível obter uma estimativa da distância genética de Nei (1972) (calculada pelo programa RAPDDIST, Black & Antolin, 1997) e da estruturação entre populações (F'_{ST} , semelhante ao F_{ST} de Wright, 1978) (calculada pelo programa RAPDFST, Black, 1997). Os pressupostos estabelecidos por Lynch & Milligan são de que as populações a serem analisadas encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg; que cada fragmento produzido corresponde a um único loco de dois alelos, onde a ausência do fragmento é considerada como do homozigoto recessivo e a presença pode corresponder ao homozigoto dominante ou ao heterozigoto; e ainda que fragmentos comigrantes em dois diferentes indivíduos sejam homólogos, ou seja, não possuam similaridade apenas em tamanho, mas correspondam à mesma região do genoma. O N_m foi calculado a partir do F'_{ST} de Lynch & Milligan (1994) pelo programa RAPDFST (Black IV, 1997).

Excoffier et al. (1992) propuseram outra estimativa de estruturação populacional, o ϕ_{ST} , baseada na análise da variância molecular (AMOVA) para haplótipos mitocondriais. Huff et al. (1993) propuseram a utilização do ϕ_{ST} para dados obtidos com RAPD, partindo do princípio que a variância calculada através das medidas de distância entre indivíduos (por exemplo, distância euclidiana ou distância baseada em coincidências simples) podem ser utilizadas para o cálculo de AMOVA. O ϕ_{ST} foi calculado com o programa WINAMOVA (Excoffier, 1993) após algumas modificações necessárias para que este programa seja utilizado com dados de RAPD realizadas através do programa AMOVA-PREP (Miller, 1998)

Quando calculados para cada par de populações, o F'_{ST} e o ϕ_{ST} podem ser considerados como estimativas da distância genética entre populações.

As medidas de similaridade fenética foram transformadas em medidas de distância (1-similaridade). A correlação entre todas as distâncias calculadas neste trabalho foi testada através do teste de Mantel (1967) com o programa NTSYS 1.7.

Para cada medida de distância estimada, foi construído um dendrograma utilizando o algoritmo UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean) e foram calculadas as correlações cofenéticas entres estes dendrogramas e suas matrizes originais. Foi calculada também a correlação entre distância genética e distância geográfica.

III.2.3 RFLP do mtDNA

III.2.3.1 Digestão por endonuclease de restrição

Para a análise da variabilidade genética das populações de *D. hominis*, o DNA mitocondrial desta espécie foi digerido com 7 endonucleases de restrição que reconhecem 4 ou 6 pares de base: *Bam*HI (G/GATCC), *Cla*I (AT/CGAT), *Eco*RI (G/AATTC), *Eco*RV (GAT/ACT), *Hae*III (GG/CC), *Hind*III (A/AGCTT), *Msp*I (C/CGG), *Sst*I (GAGCT/C).

As condições utilizadas nas reações de digestão foram as recomendadas pelos fabricantes Gibco-BRL e Pharmacia. A digestão foi realizada utilizando-se 10 μ l de mtDNA (aproximadamente 2.5U/ μ g) mais 1/10 do volume total da reação de tampão de digestão. As reações foram interrompidas pela adição de 4 μ l de uma solução contendo 25% de Ficol, 0,5% de SDS, 0,1% de azul de bromofenol e 0,1% de xilenocianol.

Posteriormente, as amostras foram aplicadas em um gel de agarose 1% em tampão TAE, e submetida a uma voltagem de aproximadamente 20V por 15 horas. Os géis foram corados com Brometo de Etídio e analisados em luz U.V.

Em seguida o DNA foi transferido para uma membrana de Nylon segundo a técnica de Southern Blot (Southern,1975). O gel foi primeiramente incubado em 250ml de solução de desnaturação (50% NaOH 0,5M, 50% NaCl 1,5M) por 50 minutos e em seguida foi incubado em 250ml de solução de neutralização (50% NaCl 1,5M, 50% de Tris 1M , pH 7,4) por 1 hora. A transferência dos fragmentos de DNA contidos no gel foi feita para uma membrana de Nylon Hybond-N (Armstrong) em 10xSSC (75mM NaCl, 7,5 mM Na citrato,

pH 7,0) por uma média de 18 horas. Em seguida, o filtro foi lavado em 6xSSC por 30 minutos a temperatura ambiente e a seco, em estufa a 80°C por duas horas, para fixação dos fragmentos de DNA.

III.2.3.2 Hibridação

Para a visualização dos fragmentos de DNA foi utilizada a técnica de hibridação, onde os fragmentos de DNA fixados na membrana, foram hibridados com o DNA de uma sonda heteróloga de *Cochliomyia hominivorax*, previamente marcada com αP^{32} (sonda radioativa ou “quente”) ou com digoxigenina (sonda “fria”) (Infante & Azeredo-Espin, 1995).

Sonda Radioativa (marcação e detecção):

As membranas foram umedecidas, por 5 minutos, em 6xSSC e, posteriormente, incubadas por 2 horas a 37°C , em solução de pré-hibridação, contendo 0,5% de SDS, 5x Denhardt's (1% ficol 400, 1% de Polyvinilpyrrolidone e 1% de Albumina Sérica Bovina fração V), 25% de formamida deionizada, 1% de DNA de esperma de salmão. Em seguida, a solução de pré-hibridação foi removida e as membranas foram incubadas, por 18 horas a 37°C, na solução de hibridação contendo 0,5% de SDS, 50x Denhardt's , 25% de formamida deionizada, 7mM de EDTA e 1% de DNA de esperma de salmão e DNA mitocondrial de *C. hominivorax* previamente marcado com αP^3 e desnaturado a 100°C por 10 minutos.

Em seguida, as membranas foram lavadas em 2xSSC e 1% de SDS à temperatura ambiente e mais duas vezes, por 30 minutos, em uma solução contendo 0,1% de SSC e 0,15 de SDS a 55°C.

As membranas foram expostas ao filme de Raio-X Kodak XAR ou Hyperfilm-MP (Armstrong), em cassete provido de intensificador, para detecção dos fragmentos marcados. O tempo de exposição dependeu do tempo de uso da sonda, quantidade de DNA, intensidade de marcação, e foi, em média, de 18 horas. Transcorrido o tempo de exposição, o filme foi revelado em revelador GBX Kodak e fixado em fixador GBX Kodak.

Sonda Não Radioativa (marcação e detecção)

As membranas foram inoculadas por 2 horas a 37°C em solução de pré-hibridação contendo 5xSSC, 0,1% de sarcosyl, 0,02% de SDS, 1% de solução bloqueadora e 50% de formamida deionizada. Após a pré-hibridação, foi adicionada a solução de hibridação contendo 5xSSC, 0,1% de sarcosyl, 0,02% de SDS, 2% de bloqueadora e 50% de formamida deionizada e a sonda de DNA marcada com digoxigenina previamente desnaturada a 100°C.

Em seguida, os filtros foram lavados duas vezes por 15 minutos, à temperatura ambiente, em solução A (2 x SSC, 0,1% SDS) e duas vezes de 15 minutos, a 55°C em solução B (0,1 xSSC; 0,1% SDS). As membranas foram incubadas por cinco minutos em tampão de lavagem (0,3% Tween20, tampão I (0,1 M Ácido maléico, 0,15 M NaCl)). Posteriormente, as membranas foram incubadas por trinta minutos na bloqueadora. As membranas foram seladas em sacos plásticos, as quais foram adicionado o anticorpo (anti-

DIG-AP). Estas membranas foram incubadas por trinta minutos, a temperatura ambiente. O excesso de anticorpo foi retirado por duas lavagens de quinze minutos em tampão de lavagem, a temperatura ambiente. Após a retirada do excesso de anticorpo, as membranas foram equilibradas em tampão III (0,1M Tris-Cl pH 9,5; 0,1M NaCl; 0,05MgCl₂, H₂O).

A detecção e revelação da hibridação pode ser realizada de duas maneiras, reação colorida e reação quimioluminescente. A segunda foi a mais usada pois o tempo de revelação da reação colorida era muito longo (pelo uso de sonda heteróloga) e o resultado nem sempre era satisfatório.

a) Revelação colorida com X-fosfato/NBT.

A membrana foi incubada por cinco minutos no escuro com 10ml de solução de coloração; 40µl de NBT (*Nitro Blue Tetrazolium*), 35µl de X-fosfato (*3-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, toluidinium salt*) e 10ml de tampão 3 (10mM tris-HCl, 0,1 NaCl, 10mM MgCl₂, p.H. 9,5). O X-fosfato é o substrato da enzima fosfatase alcalina, que se encontra nas soluções da hibridação a frio, e o NBT, cora o produto da reação, apresentando um precipitado de cor azul que aparece onde está localizado o DNA na membrana. O precipitado começa a ser formado logo nos primeiros quinze minutos de incubação. Após atingir a intensidade desejada para análise dos fragmentos, a membrana é seca e guardada.

b) Revelação quimioluminescente com AMPPD

O AMPPD é um substrato quimioluminescente da fosfatase alcalina, e o produto tem um estágio de emissão de luz que é obtido em 15 minutos. Para esta reação, o AMPPD foi diluído (1:100) em tampão III. A membrana foi incubada em 10ml desta solução por 5 minutos, após os quais a solução foi retirada e a membrana foi incubada por 10

minutos a 37°C. Finalmente a membrana foi exposta ao filme de raioX a temperatura ambiente. Como descrito para sonda radioativas, o tempo de exposição variou de acordo com o número de reutilizações do AMPPD diluído e foi, em média, de 15 minutos.

III.2.3.3 Análise dos dados de RFLP do mtDNA.

Após a identificação dos haplótipos, a partir da análise dos fragmentos obtidos pela digestão com as endonucleases de restrição, foram calculadas as frequências dos haplótipos nas populações estudadas. A partir destas frequências, foi calculada a diversidade haplotípica destas populações (Nei, 1987).

Foi construída uma matriz de presença e ausência de fragmentos de restrição para cada haplótipo obtido e, desta matriz, foi calculada a distância entre os haplótipos levando em conta o número de bases dos sítios de restrição de cada enzima utilizada. Combinando estas distâncias com as frequências dos haplótipos em cada população, foi estimada a diversidade nucleotídica dentro e entre populações. A divergência nucleotídica foi calculada pela subtração da diversidade nucleotídica intrapopulacional da diversidade interpopulacional, restando apenas a divergência real entre as populações. Estes cálculos foram realizados com o programa REAP–*The Restriction Enzyme Analysis Package* (Mc Elroy et al., 1992).

Uma segunda matriz de ausências e presenças de fragmentos foi construída levando em conta os fragmentos encontrados em cada indivíduo analisado. A partir desta matriz foi calculada a similaridade de Nei & Li (1979) com o programa RAPDPLOT 3.0 (Black, 1997) e foi estimado o índice de diversidade ϕ_{ST} (Excoffier et al., 1992) com o programa

Arlequin (Scheider et al., 1997.). Um dendrograma foi construído a partir da distância de Nei & Li (1979) (1-Similaridade) utilizando o algoritmo UPGMA, e foi calculada a correlação desta distância com a distância geográfica através do programa NTSYS.

IV Resultados

IV.1 Resultados de RAPD

Os 6 “primers” utilizados na análise do DNA genômico pelo marcador RAPD nas 6 amostras geraram um total de 129 fragmentos para os 62 indivíduos analisados com estes “primers” (Figura 3). O número de fragmentos considerados para cada “primer” variou de 18 (OPJ-01) a 27 (OPN-03) com uma média de 22 fragmentos por “primer”. O tamanho destes fragmentos variou de 0,3 a 4,0 Kb (Tabela 1).

Tabela 1: Número e tamanho dos fragmentos por “primer”.

Primer	n-º de fragmentos analisados	Tamanho dos Fragmentos
OPN-03	27	500 – 2500
OPN-05	20	500 – 3500
OPN-07	23	300 – 4000
OPN-14	21	400 – 3000
OPJ-01	18	400 – 3000
OPJ-06	21	400 – 3500
Total	129	300 – 4000
Média/primer	21,67	

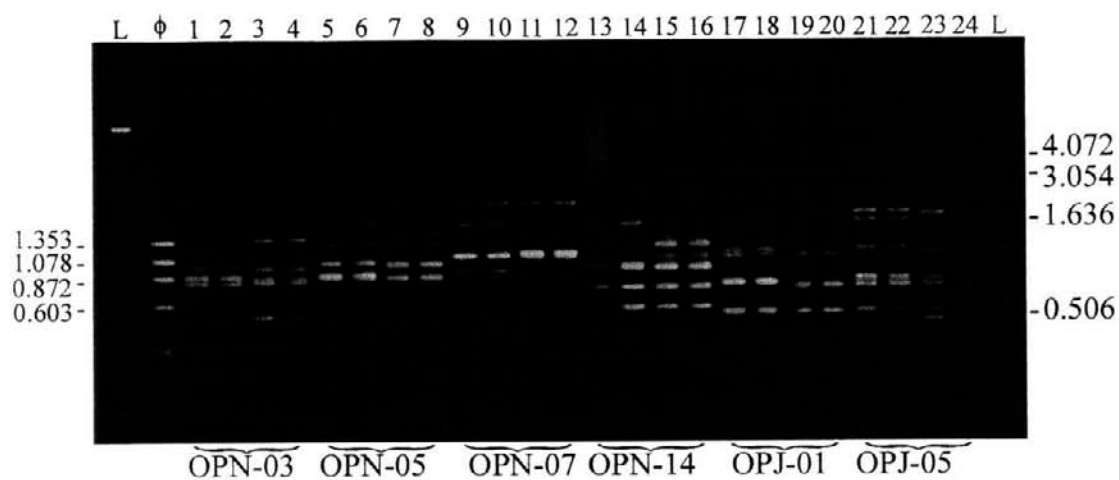


Figura 2. Polimorfismo detectado através de RAPD em *D. Hominis* com seis primers. Nas colunas 1, 2, 5, 6, 9, 10, 13, 14, 17, 18, 21 e 22 são as amplificações de um indivíduo da população de Socorro. Nas colunas 3, 4, 7, 8, 11, 12, 15, 16, 19, 20, 23 e 24 são as amplificações de um indivíduo da população de São Roque de Minas.

Os valores médios de similaridade intrapopulacionais foram levemente mais altos que os valores das médias interpopulacionais, nas medidas Dice (S), Coincidências simples (M) e Jaccard (J), calculadas a partir da matriz reduzida (Tabelas 3, 5 e 7) e a partir da matriz completa (Tabelas 2, 4 e 6). As diferenças entre os valores calculados a partir das matrizes reduzida e completa foram mais evidentes no índice de Dice (S) do que na similaridade baseada em coincidências simples (M).

A similaridade de Dice (S) variou intrapopulacionalmente de 0,565 em Cáceres a 0,718 em Socorro, e interpopulacionalmente de 0,389 entre Pelotas e Campinas a 0,643 entre Cáceres e Pelotas, a partir da matriz completa de dados (tabela 2). Já com a matriz reduzida, estes números foram muito menores, variando, intrapopulacionalmente, de 0,263 em Socorro a 0,411 em Pelotas e, interpopulacionalmente, de 0,113 entre Socorro e Pelotas a 0,296 entre Cáceres e Pelotas (tabela 3).

Tabela 2: Medida de Similaridade (DICE) intrapopulacional (diagonal) e interpopulacional (abaixo da diagonal) nas 6 populações analisadas de *D. hominis* por RAPD calculada a partir da matriz total.

	1	2	3	4	5	6
1.Socorro	0,718					
2.Campinas	0,571	0,586				
3.Patrocínio Paulista	0,468	0,414	0,579			
4.São Roque de Minas	0,470	0,444	0,433	0,688		
5.Pelotas	0,433	0,389	0,443	0,457	0,565	
6.Cáceres	0,454	0,404	0,422	0,470	0,643	0,578

Tabela 3: Medida de Similaridade (DICE) intrapopulacional (diagonal) e interpopulacional (abaixo da diagonal) nas 6 populações analisadas de *D. hominis* por RAPD, calculada a partir da matriz reduzida.

	1	2	3	4	5	6
1.Socorro	0,263					
2.Campinas	0,196	0,294				
3.Patrocínio Paulista	0,166	0,159	0,318			
4.São Roque de Minas	0,138	0,177	0,162	0,351		
5.Pelotas	0,113	0,169	0,223	0,186	0,411	
6.Cáceres	0,158	0,161	0,229	0,249	0,296	0,331

Com a medida de similaridade, baseada em Coincidências simples (M) e calculada a partir da matriz completa, os valores variaram entre 0,710 em Pelotas e 0,826 em Socorro, dentro das populações. Entre populações, estes valores variaram de 0,610 entre Pelotas e Campinas a 0,739 entre Campinas e Socorro (Tabela 4). No entanto, quando a matriz reduzida de dados foi utilizada, a menor similaridade encontrada dentro das populações foi de 0,741 em Patrocínio Paulista e a maior foi de 0,853 em Socorro. As similaridades interpopulacionais variaram de 0,688 entre Cáceres e Patrocínio Paulista a 0,803 entre Campinas e Socorro (Tabela 5).

Tabela 4: Medida de Similaridade (baseada em coincidências simples – M) intrapopulacional (diagonal) e interpopulacional (abaixo da diagonal) nas 6 populações analisadas de *D. hominis* por RAPD, calculada a partir da matriz completa.

	1	2	3	4	5	6
1.Socorro	0,826					
2.Campinas	0,739	0,746				
3.Patrocínio Paulista	0,669	0,633	0,726			
4.São Roque de Minas	0,665	0,646	0,632	0,788		
5.Pelotas	0,639	0,610	0,637	0,640	0,710	
6.Cáceres	0,643	0,612	0,615	0,641	0,643	0,718

Tabela 5: Medida de Similaridade (baseada em coincidências simples – M) intrapopulacional (diagonal) e interpopulacional (abaixo da diagonal) nas 6 populações analisadas de *D. hominis* por RAPD, calculada a partir da matriz reduzida.

	1	2	3	4	5	6
1.Socorro	0,853					
2.Campinas	0,803	0,792				
3.Patrocínio. Pst	0,757	0,719	0,741			
4.S. R. de Minas	0,774	0,748	0,706	0,79		
5.Pelotas	0,725	0,707	0,689	0,7	0,75	
6.Cáceres	0,735	0,702	0,688	0,72	0,701	0,713

Quanto à similaridade baseada em Jaccard (1908) (J), calculada a partir da matriz completa, os valores variaram entre 0,395 em Pelotas e 0,556 em Socorro, dentro das populações. Entre as populações estes valores variaram de 0,243 entre Pelotas e Campinas a 0,403 entre Campinas e Socorro (Tabela 6). No entanto, a similaridade intrapopulacional baseada no cálculo de Jaccard (J) a partir da matriz reduzida variou de 0,171 a 0,264 em Socorro e Pelotas, respectivamente. Os valores da similaridade entre populações variaram de 0,062 entre Pelotas e Socorro a 0,177 entre Cáceres e Pelotas (Tabela 7).

Tabela 6: Medida de Similaridade (Jaccard–J) intrapopulacional (diagonal) e interpopulacional (abaixo da diagonal) nas 6 populações analisadas de *D. hominis* por RAPD, calculada a partir da matriz total.

	1	2	3	4	5	6
1. Socorro	0,556					
2. Campinas	0,403	0,427				
3. Patrocínio Paulista	0,306	0,262	0,403			
4. São Roque de Minas	0,308	0,286	0,278	0,518		
5. Pelotas	0,277	0,243	0,287	0,298	0,395	
6. Cáceres	0,293	0,254	0,269	0,307	0,312	0,408

Tabela 7: Medida de Similaridade (Jaccard-J) intrapopulacional (diagonal) e interpopulacional (abaixo da diagonal) nas 6 populações analisadas de *D. hominis* por RAPD, calculada a partir da matriz reduzida.

	1	2	3	4	5	6
1.Socorro	0,171					
2.Campinas	0,114	0,192				
3.Patrocínio. Paulista	0,095	0,091	0,202			
4.São Roque de Minas	0,078	0,100	0,091	0,214		
5.Pelotas	0,062	0,096	0,13	0,105	0,264	
6.Cáceres	0,089	0,091	0,133	0,147	0,177	0,203

A distância genética de Nei (1992), calculada a partir da matriz reduzida e segundo as modificações propostas por Lynch & Milligan, 1994 variou de 0,011 entre as populações de Campinas e Socorro a 0,036 entre Pelotas e São Roque de Minas (Tabela 8).

Tabela 8: Medida de Distância genética de Nei (1972) modificada por Lynch & Milligan (1994) calculada para as 6 populações analisadas de *D. hominis* por RAPD, obtida a partir da matriz reduzida.

	1	2	3	4	5
1.Socorro					
2.Campinas	0,011				
3.Patrocínio Paulista	0,020	0,026			
4.São Roque de Minas	0,025	0,024	0,032		
5.Pelotas	0,035	0,032	0,032	0,036	
6.Cáceres	0,029	0,034	0,030	0,025	0,026

As estimativas de distância entre as populações baseadas nos cálculos dos coeficientes F_{ST} e ϕ_{ST} para cada par de populações variaram de 0,048 (F'_{st}) e 0,096 (ϕ_{ST}), entre as populações de Campinas e Socorro, a 0,148 (F'_{st}) e 0,288 (ϕ_{ST}), entre Pelotas e Socorro (tabela 9).

Tabela 9: Medidas de distância genética, obtidas a partir do cálculo do F'_{ST} de Lynch & Milligan (1994) (diagonal inferior) e do ϕ_{ST} de Excoffier et al. (1992) (diagonal superior), para cada par de populações, entre as 6 populações analisadas de *D. hominis* por RAPD, a partir da matriz reduzida.

	1	2	3	4	5	6
1.Socorro		0,096	0,159	0,208	0,288	0,177
2.Campinas	0,048		0,168	0,170	0,222	0,169
3.Patrocínio Paulista	0,075	0,088		0,203	0,182	0,125
4.São Roque de Minas	0,112	0,090	0,116		0,238	0,115
5.Pelotas	0,148	0,124	0,097	0,136		0,099
6.Cáceres	0,088	0,090	0,063	0,064	0,051	

A tabela 10 mostra os valores de correlação entre as diferentes medidas utilizadas neste trabalho. Quando as medidas efetuadas a partir da matriz completa de dados e a partir da reduzida são comparadas, nota-se uma falta de correlação para as medidas de Dice, Jaccard e Coincidência simples. Entre estas medidas foi observada uma alta correlação quando do uso da matriz completa de dados $r = 0,94$ entre Dice e Coincidências simples, $r = 0,99$ entre Dice e Jaccard e $0,95$ entre Jaccard e Coincidências simples, o que não ocorreu com o uso da matriz reduzida.

Além disso, Dice, Jaccard e Coincidências simples, calculados com a matriz completa, se correlacionaram significativamente com a distância de Nei, 1972 ($r=0,79$ e $0,85$, respectivamente).

Quanto às medidas calculadas a partir da matriz reduzida de dados, Dice se correlacionou significativamente com Jaccard ($r = 0,99$) e com as distâncias estimadas a partir de coeficientes ϕ_{ST} ($r=0,74$) e F'_{ST} ($r=0,68$), que também se correlacionaram com Jaccard ($r=0,74$ e $0,68$, respectivamente); no entanto, a medida baseada em Coincidências simples não se correlacionou significativamente com nenhuma das distâncias calculadas.

As medidas de distância estimadas a partir dos coeficientes ϕ_{ST} e F'_{ST} apresentaram uma alta correlação entre si ($r = 0,98$) e com a distância genética de Nei 1972 ($r = 0,66$ e $0,70$, respectivamente).

Tabela 10: Correlações das distâncias genéticas interpopulacionais (r).

	ϕ_{ST}	Nei(72)	F_{ST}	$J_{reduzida}$	$J_{completa}$	$M_{reduzida}$	$M_{completa}$	Dice _{reduzida}
Nei(72)	0,98 (0,002)*							
F_{ST}	0,66 (0,020)	0,70 (0,004)						
$J_{reduzida}$	0,74 (0,003)	0,20 (0,200)	0,68 (0,002)					
$J_{completa}$	0,48 (0,005)	0,79 (0,003)	0,49 (0,043)	0,26 (0,184)				
$M_{reduzida}$	0,86 (0,990)	0,81 (0,990)	0,22 (0,770)	-0,31 (0,150)	0,72 (0,001)			
$M_{completa}$	0,34 (0,120)	0,85 (0,002)	0,38 (0,100)	0,01 (0,440)	0,95 (0,002)	0,86 (0,990)		
Dice _{reduzida}	0,74 (0,004)	0,18 (0,190)	0,68 (0,002)	0,99 (0,002)	0,25 (0,178)	-0,32 (0,140)	-0,01 (0,470)	
Dice _{completa}	0,48 (0,070)	0,79 (0,002)	0,50 (0,006)	0,26 (0,180)	1,00 (0,003)	0,71 (0,990)	0,94 (0,002)	0,25 (0,170)

*valores de probabilidade de significância (p)

Cada medida produziu um dendrograma diferente, agrupando as populações de várias maneiras. Foram significativas as correlações cofenéticas das distâncias de Nei, 1972 ($r = 0,86$; $p = 0,007$); Jaccard ($r = 0,88$; $p = 0,010$); Dice, da matriz reduzida ($r = 0,86$; $p = 0,003$) e da matriz completa ($r = 0,86$; $p = 0,009$); e Coincidências simples, das matrizes reduzida ($r = 0,87$; $p = 0,003$) e completa ($r = 0,89$; $p = 0,006$).

Como foram obtidos vários dendrogramas, foi escolhido aquele produzido pela distância genética de Nei (1972) para representar uma possível forma de agrupamento das amostras (Figura 4). O Gráfico da correlação entre distância geográfica e a distancia de Nei 1972 (Figura 5), mostrou que existe correlação entre a distância genética e a distância geográfica ($r = 0,57$, $p = 0,001$).

O F'_{ST} (Lynch & Milligan, 1994) para as seis populações analisadas neste trabalho foi igual a 0,125 com um desvio padrão de 0,084 e Nm de 1,7. A distribuição da frequência dos locos nas classes de valores de F'_{ST} encontra-se no gráfico 1. O F'_{ST} das 12 amostras ,

as seis amostras analisadas neste trabalho juntamente com as seis analisadas por Yotoko (1998), foi de 0,152, com desvio padrão de 0,94 e Nm de 1,4 (Gráfico 2). Yotoko havia encontrado um F'_{ST} de 0,058, com um desvio de 0,1 e Nm de 4,0 para as seis amostras analisadas no seu trabalho.

O valor do índice de diversidade ϕ_{ST} de Excoffier (1992), para as 6 populações analisadas neste trabalho, foi igual a 0,172, sendo que 17,2% da variação encontra-se entre as populações e 82,8% dentro das populações (Tabela 11). Já para as 12 populações de *D. hominis* analisadas até o momento o $\phi_{(ST)}$ foi igual a 0,197, com 19,7% da variação entre as populações e 80,3% dentro das populações (Tabela 12).

Tabela 11: Análise molecular da variância (AMOVA) Excoffier et al. (1992) calculado a partir da distância genética euclidiana na 6 populações analisadas neste trabalho por RAPD.

Tipo de Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Componentes da Variância	Porcentagem da Variação
Entre populações	5	119,4574	1,579948 (va)	17,21 %
Dentro de populações	56	425,7523	7,602719 (vb)	82,79 %
Total	61	545,2097		

Índice de diversidade $\phi_{ST} = 0,172$

Tabela 12: Análise molecular da variância (AMOVA) Excoffier et al. (1992) calculado a partir da distância genética euclidiana na 12 populações analisadas até o momento por RAPD.

Tipo de Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Componentes da Variância	Porcentagem da Variação
Entre populações	11	187,3835	1,18988 (va)	19,68 %
Dentro de populações	111	535,0555	4,85635 (vb)	80,32 %
Total	122	726,4390		

Índice de diversidade $\phi_{ST} = 0,197$

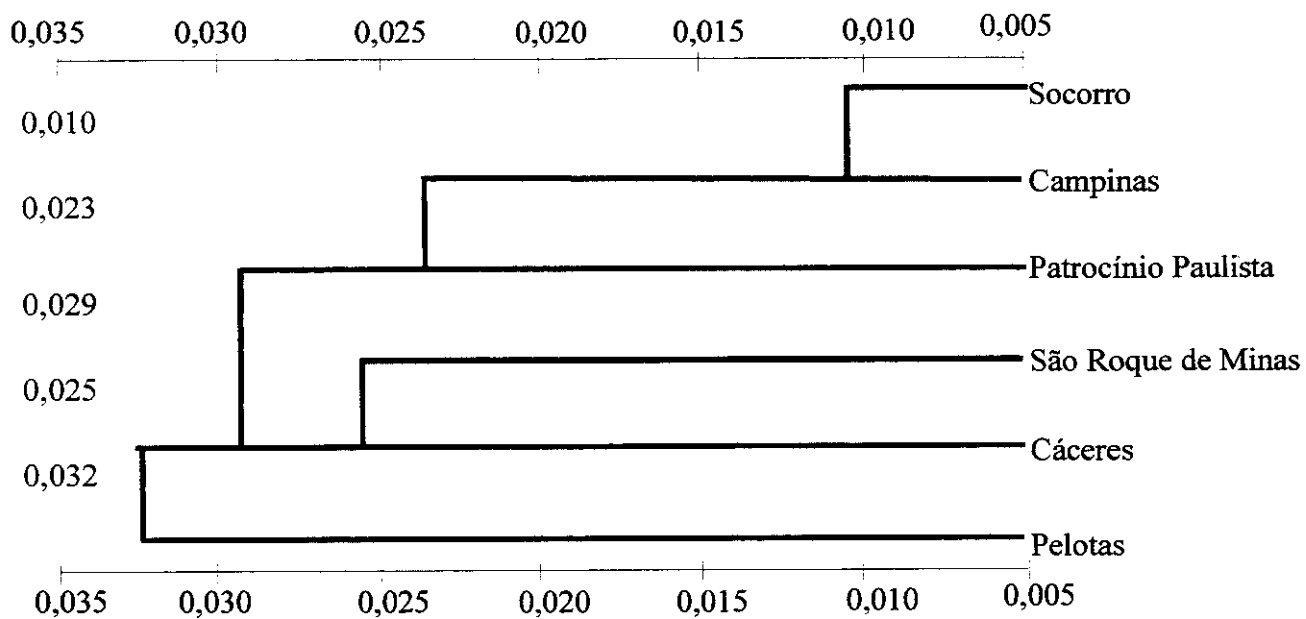


Figura 4: Dendrograma das seis populações analisadas, obtido a partir da distância de Nei 1972, com os dados de RAPD, através o algoritmo UPGMA

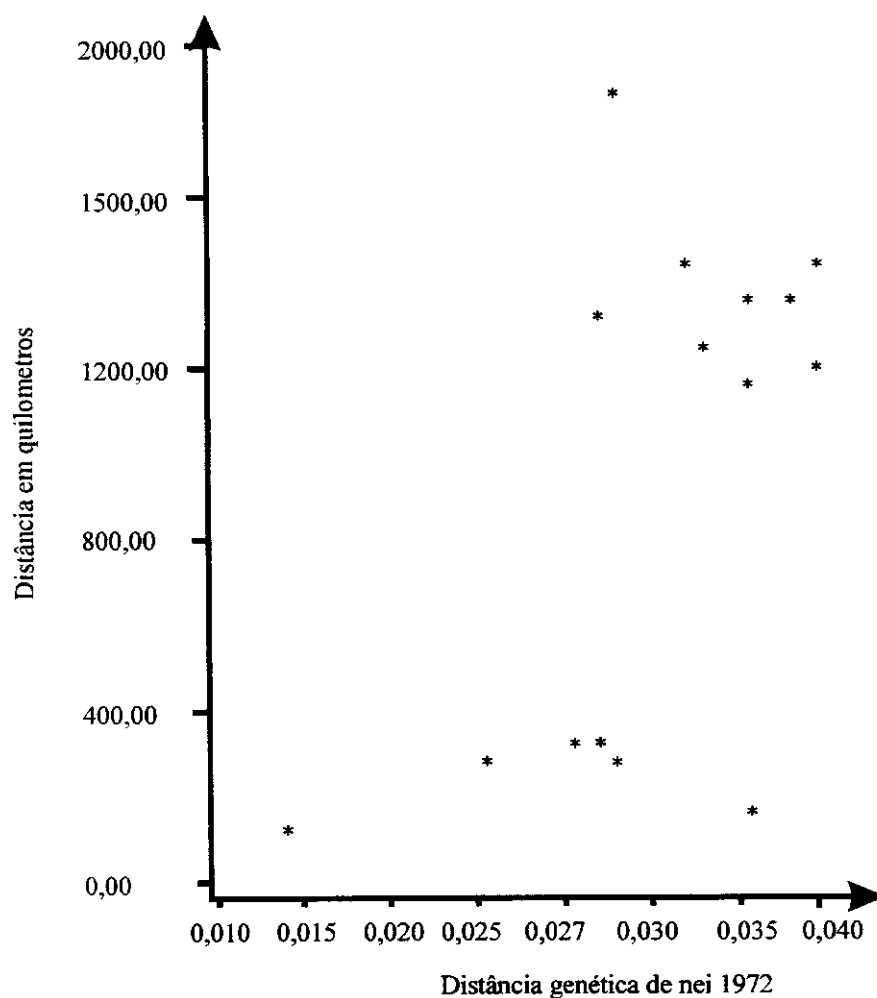


Figura 5: Gráfico de correlação entre a distância geográfica, medida em quilômetros, e a distância genética Nei 1972, nas seis populações analisadas por RAPD.

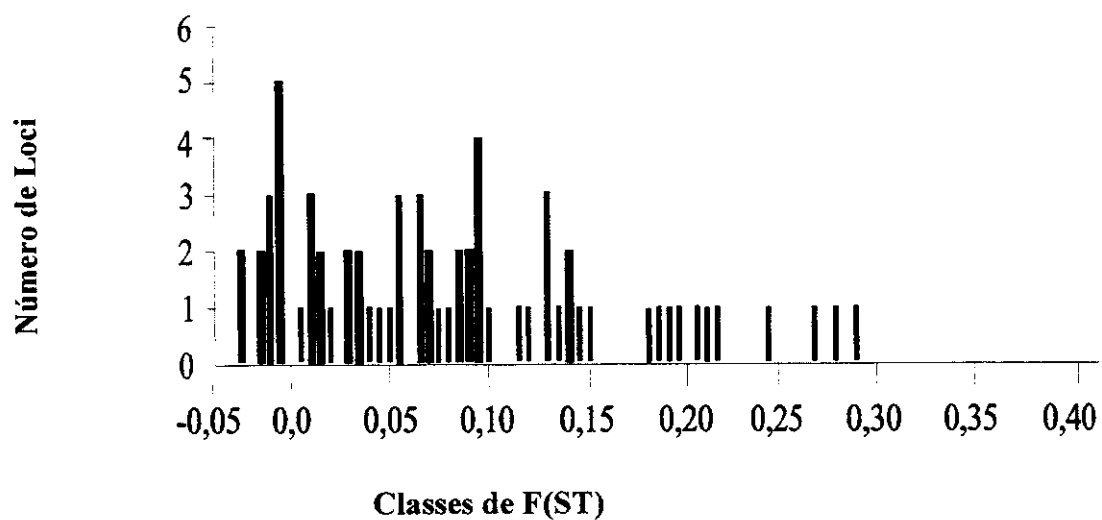


Gráfico 1 Distribuição da frequência dos 53 locos de RADP das 6 populações de *D. hominis* nas classe de F_{ST} de Lynch & Milligan (1994)

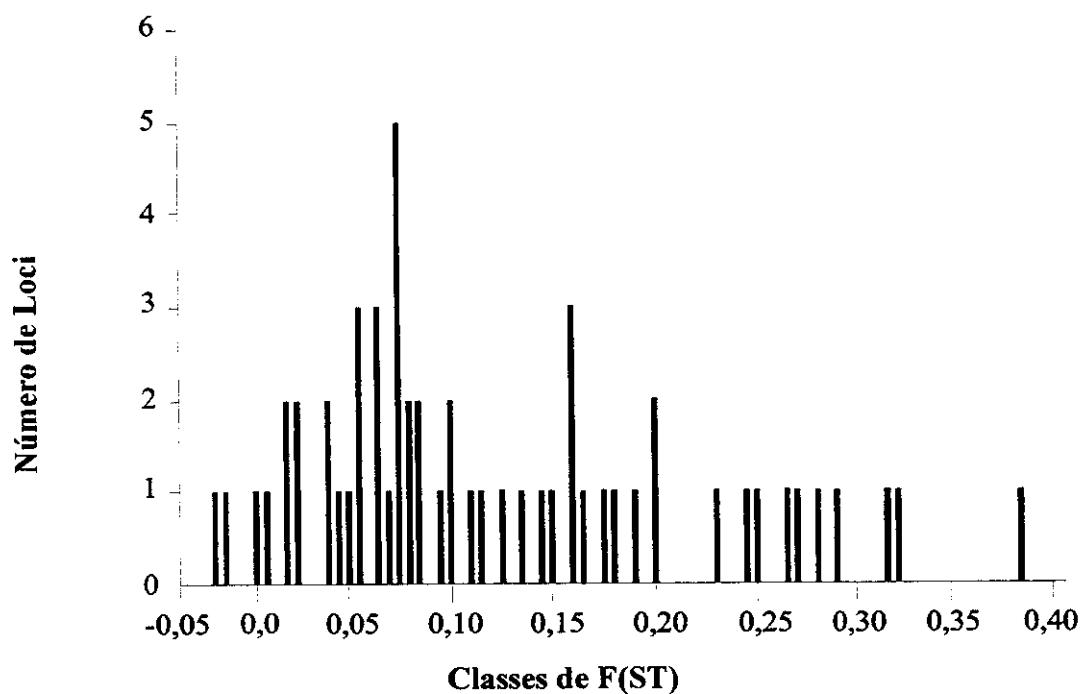


Gráfico 2 Distribuição da frequência dos 53 loci de RADP das 12 populações de *D. hominis* nas classe de F_{ST} de Lynch & Milligan (1994)

IV.2 Resultados de RFLP do mtDNA.

O DNA mitocondrial mostrou-se altamente polimórfico. Através da análise por RFLP, com oito enzimas de restrição, foram encontrados 38 sítios de restrição sendo 11 deles polimórficos. Foram detectados 2 novos padrões para *Hind* III, D e E, (Figura 6 e Tabela 13) e 2 novos padrões para *Msp* I , O e P, (Figura 7 e Tabela 13). Geurgas (1998) encontrou 48 haplótipos nas populações de *D. hominis* provenientes do sudeste do Brasil. Destes 48 haplótipos 10 foram novamente detectados neste estudo (Tabela 15). Além destes foram detectados 24 novos haplótipos (Tabela 14). Até o momento, foram encontrados 72 haplótipos para a espécie em populações brasileiras.

A distribuição dos haplótipos nas populações é variável, sendo que dois deles são os mais freqüentes, haplótipos 1 e 3. Os demais podem ser considerados raros já que alguns deles aparecem somente uma única vez e são exclusivos para uma determinada população (Tabela 16)

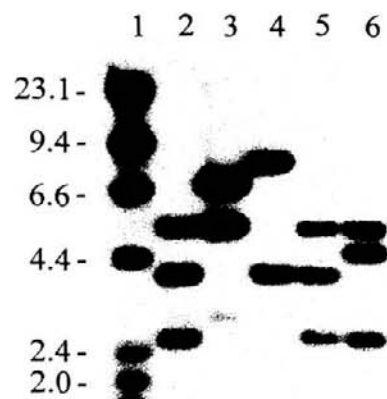


Figura 6. Autoradiograma dos 5 padrões encontrados para a enzima *Hind* III. Coluna 1 marcador de peso molecular λ *Hind* III / ϕ x 174 *Hae* III. Coluna 2 padrão A; coluna 3 padrão B; coluna 4 padrão C; coluna 5 padrão novo D; coluna 6 padrão novo E.

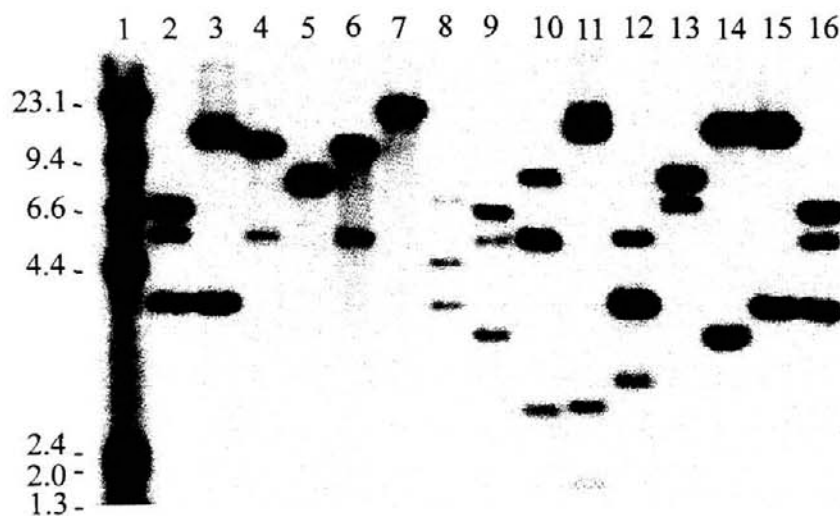


Figura 7. Autoradiograma dos 15 padrões encontrados para a enzima *Msp* I. Coluna 1 marcador de peso molecular λ *Hind* III / ϕ x 174 *Hae* III. Coluna 2 padrão A; coluna 3 padrão B; coluna 4 padrão C; coluna 5 padrão D; coluna 6 padrão E; coluna 7 padrão F; coluna 8 padrão G; coluna 9 padrão H; coluna 10 padrão I; coluna 11 padrão J; coluna 12 padrão L; coluna 13 padrão M; coluna 14 padrão N; coluna 15 padrão novo O e coluna 16 padrão novo P.

Tabela 13: Padrões de restrição de endonucleases de restrição *Msp* I e *Hind* III da espécie *D. hominis*, indicando os novos padrões encontrados para estas enzimas (em verde).

Enzima e Padrão	Sítio de Clivagem	Tamanho dos Fragmentos
Hind III	A/AGCT	
A		5,5; 4,2; 3,4; 3,1
B		7,3; 5,5; 3,4
C		8,5; 4,2; 3,4
D		6,1; 3,1; 2,8; 1,9
E		6,4; 4,7; 2,9; 1,5
Msp I	C/CGG	
A		6,8; 5,8; 4,1
B		15,3; 4,1
C		9,4; 6,8
D		8,6; 8,1
E		12,4; 5,8
F		20,0
G		7,3; 5,4; 4,1
H		6,8; 5,8; 3,7
I		8,6; 5,8; 2,6
J		15,3; 2,6; 1,7
L		5,8; 4,1; 3,0
M		8,6; 6,8; 1,3
N		15,3; 3,6
Q		6,4; 3,9; 2,6; 2,4
P		10,5; 2,6; 2,4

Tabela 14: Relação dos 24 novos haplótipos encontrados nas 12 populações de *D. hominis*

Número do Haplótipo	Haplótipo
49	AAAAAAPD
50	AAAAEAPD
51	BAAAAAAA
52	AAAADABA
53	BCADDABA
54	AAAADAGA
55	AAAAAAPE
56	AAAAAAPC
57	AAAAAAOB
58	AAAAGAPE
59	BBABDAPC
60	AACAAAPD
61	AAAEAAPD
62	BCABAAGC
63	BCABAAMA
64	BBABDAMA
65	AAAAHAAA
66	AACABADB
67	AAAAADEA
68	AAAAADAA
69	ACAAADAA
70	AACAAABB
71	AAAAAEFA
72	AAAALADB

Tabela 15: Relação dos 10 haplótipos encontrados por Geurgas (1998) que se repetem nas 12 populações de *D. hominis* analisadas neste trabalho.

Número do Haplótipo	Haplótipo
1	AAAAAAAAA
2	AADAAAAA
3	AAAAAABA
4	AAAAAAFA
7	AABABADB
13	AAAAAABB
14	AAAAEAAA
18	AAAAAAEA
43	AABALBDB
46	AAAAAABC

Tabela 16: Frequências dos 34 haplótipos encontrados nas 12 populações de *D. hominis* analisadas

Haplótipos	Socorro	Campinas	Patrocínio Paulista	S. R. de Minas	Cáceres	Pelotas	Anápolis	Brasópolis	Pirassununga	Presidente Prudente	São Carlos	Ponta Grossa
1	0,300	0,364			0,545	0,125	0,273	0,091	0,364	0,143	0,091	0,182
2									0,091			
3	0,300			0,364	0,455	0,625	0,273	0,091	0,545	0,429	0,091	0,182
4	0,100									0,286	0,091	0,091
7												0,091
13	0,100	0,091					0,273				0,091	
14	0,100			0,091							0,091	
18		0,182		0,182			0,091				0,273	0,091
43												0,091
46											0,273	
49			0,182	0,091								
50			0,091	0,091								
51				0,091								
52				0,091								
53						0,125						
54						0,125						
55		0,091	0,364									
56		0,182										
57		0,091										
58			0,091									
59			0,091									
60			0,091									
61			0,091									
62												0,091
63												0,091
64												0,091
65										0,143		
66						0,091						
67								0,273				
68								0,273				
69								0,091				
70								0,091				
71								0,091				
72	0,100											

Foi encontrada uma alta diversidade haplotípica intrapopulacional. A população de Cáceres, que possui apenas 2 haplótipos, apresentou o menor valor de diversidade haplotípica $d = 0,5455$; em contrapartida, a população de Ponta Grossa, onde cada indivíduo amostrado possui um haplótipo diferente, apresentou a maior diversidade haplotípica com d igual a 0,9818 (Tabela 17).

Os valores das médias de diversidade nucleotídica (π) intrapopulacional e interpopulacional foram baixos. A população de Cáceres apresentou o menor valor de π intrapopulacional igual a 0,0017 e a população de Ponta Grossa apresentou o maior valor de π intrapopulacional igual a 0,0169 (tabela 17).

Tabela 17: Diversidade haplotípica intrapopulacional e seus respectivos desvios-padrão e diversidade nucleotídica intrapopulacional, nas 12 populações de *D. hominis*.

Populações	Diversidade Haplotípica	Diversidade nucleotídica
Socorro	0,8667 $\pm$ 0,08501	0,006191
Campinas	0,8545 $\pm$ 0,08523	0,007606
Patrocínio paulista	0,8727 $\pm$ 0,08912	0,012362
São Roque de Minas	0,9273 $\pm$ 0,06647	0,008841
Pelotas	0,6429 $\pm$ 0,18412	0,009790
Cáceres	0,5455 $\pm$ 0,07222	0,001799
Anápolis	0,8364 $\pm$ 0,07016	0,008135
Brasópolis	0,8909 $\pm$ 0,07404	0,012090
Pirassununga	0,6182 $\pm$ 0,10382	0,002348
Presidente Prudente	0,8095 $\pm$ 0,12984	0,004128
São Carlos	0,8909 $\pm$ 0,07404	0,005405
Ponta Grossa	0,9818 $\pm$ 0,04632	0,016992
Média	0,8114 $\pm$ 0,00152	0,007974 $\pm$ 0,0000016

Os valores das médias de diversidade nucleotídica interpopulacionais variaram de 0,0019, entre as populações de Cáceres e Pirassununga, a 0,0240, entre as populações Patrocínio Paulista e Brasópolis (média = 0,010 e desvio padrão = 0,000). Os valores das médias de divergência nucleotídica variaram de -0,0004, entre as populações Anápolis e Socorro, a 0,0128, entre as populações Brasópolis e Patrocínio Paulista (média = 0,0022 e desvio padrão = 0,000) (Tabela 18).

Tabela 18 Diversidade Nucleotídica interpoblacional (acima da diagonal) e Divergência nucleotídica interpoblacional (abaixo da diagonal) para as 12 populações de *D. hominis*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1.Socorro		0,007455	0,0165	0,0072	0,0086	0,0039	0,0068	0,0127	0,0041	0,0049	0,0057	0,0114
2.Campinas	0,0006		0,0134	0,0087	0,0124	0,0058	0,0086	0,0141	0,0062	0,0067	0,0068	0,0132
3.Patrocínio Paulista	0,0070	0,0030		0,0164	0,0212	0,0161	0,0171	0,0240	0,0163	0,0161	0,0157	0,0210
4.São Roque de Minas	-0,0003	0,0005	0,0058		0,0101	0,0054	0,0087	0,0141	0,0056	0,0063	0,0071	0,0131
5.Pelotas	0,0006	0,0036	0,0101	0,0008		0,0067	0,0101	0,0169	0,0068	0,0079	0,0092	0,0141
6.Cáceres	-0,0001	0,0011	0,0090	0,0001	0,0009		0,0053	0,0106	0,0019	0,0029	0,0039	0,0102
7.Anápolis	-0,0004	0,0008	0,0069	0,0002	0,0011	0,0003		0,0142	0,0055	0,0063	0,0070	0,0129
8.Brasópolis	0,0035	0,0043	0,0128	0,0037	0,0060	0,0036	0,0041		0,0110	0,0116	0,0126	0,0188
9.Pirassununga	-0,0001	0,0012	0,0089	0,00001	0,0007	-0,0001	0,0003	0,0038		0,0031	0,0041	0,0105
10.Presidente Prudente	-0,0002	0,0008	0,0078	-0,0002	0,0009	-0,0001	0,0002	0,0035	-0,0001		0,0047	0,0109
11.São Carlos	-0,0001	0,0003	0,0068	-0,0001	0,0016	0,00029	0,0003	0,0038	0,00025	-0,0001		0,0118
12.Ponta Grossa	-0,0002	0,0009	0,0064	0,00019	0,0007	0,00079	0,0003	0,0042	0,00080	0,00034	0,0006	

A similaridade (Nei & Li, 1979), encontrada nas populações de *D. hominis*, através do RFLP do mtDNA foi alta. Os valores das médias de similaridade intrapopulacional variaram de 0,575, em Ponta Grossa, a 0,926 em Cáceres; e os valores das médias de similaridade interpopulacional variaram de 0,545, entre Ponta Grossa e Patrocínio Paulista, a 0,926, entre Pirassununga e Anápolis (Tabela 19).

Tabela 19: Medida de Similaridade (S) de RFLP do mtDNA (Nei & Li, 1979) intrapopulacional na diagonal e interpopulacional abaixo desta, nas 12 populações analisadas de *D. hominis*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1.Socorro	0,925											
2.Campinas	0,903	0,895										
3.Patrocínio Psta	0,801	0,83	0,835									
4.S. R. de Minas	0,913	0,893	0,805	0,898								
5.Pelotas	0,901	0,864	0,766	0,888	0,886							
6.Cáceres	0,95	0,92	0,803	0,932	0,922	0,984						
7.Anápolis	0,914	0,886	0,793	0,893	0,883	0,93	0,895					
9.Brasópolis	0,822	0,803	0,691	0,809	0,789	0,846	0,806	0,834				
9.Pirassununga	0,946	0,914	0,799	0,928	0,92	0,972	0,927	0,84	0,965			
10.Pres. Prudente	0,939	0,91	0,803	0,923	0,913	0,96	0,918	0,832	0,956	0,947		
11.São Carlos	0,923	0,906	0,81	0,909	0,895	0,943	0,906	0,819	0,94	0,935	0,923	
12.Ponta Grossa	0,859	0,836	0,752	0,844	0,84	0,873	0,842	0,758	0,869	0,867	0,854	0,797

O dendrograma, obtido pela distância de Nei & Li (1979), representa uma possível forma de agrupamento das doze populações analisadas com RFLP do mtDNA (figura 8). A análise da correlação entre distância geográfica e a distância de Nei 1972, mostrou que não existe correlação entre a distância genética e a distância geográfica (dado não representado).

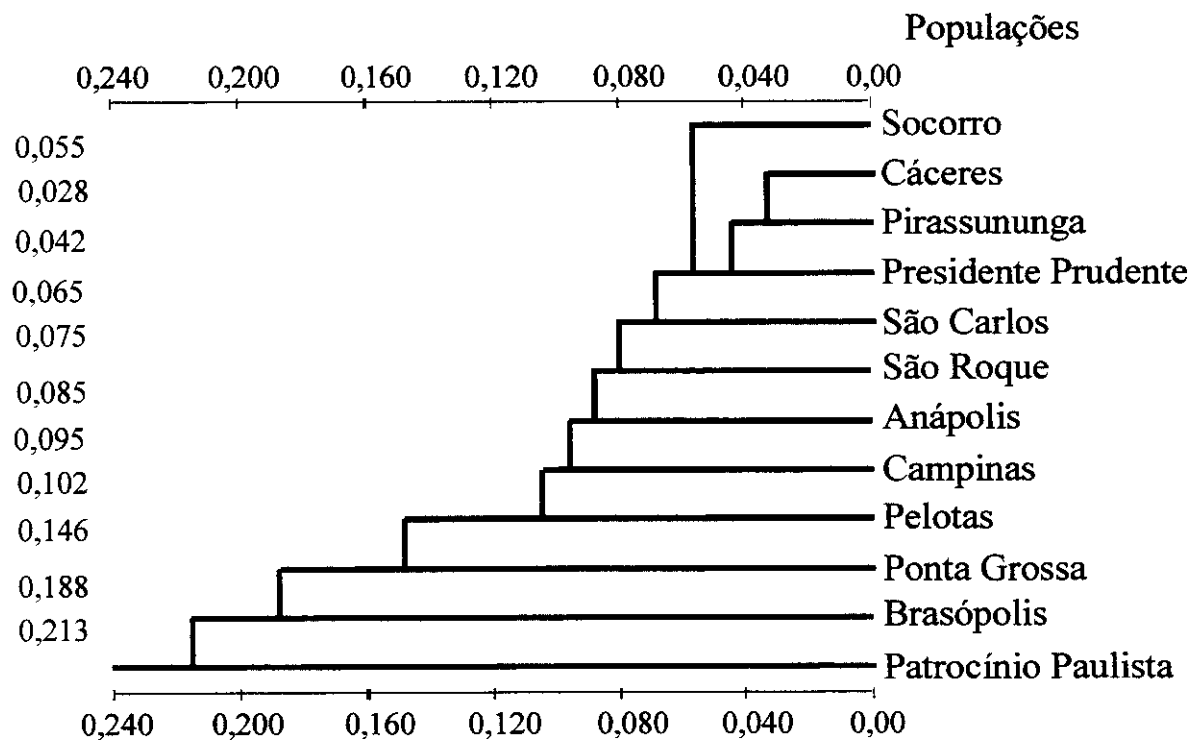


Figura 8: Dendrograma das doze populações analisadas, obtido a partir da distância de Nei & Li (1979), com os dados de RFLP do mtDNA, através do algoritmo UPGMA.

A estimativa do índice de diversidade ϕ_{ST} (Excoffier et al., 1992) para as amostras de *D. hominis*, analisadas através do RFLP do mtDNA, foi de 0,083 (Tabela 20). Geurgas (1998) encontrou um ϕ_{ST} de 0,07 (Tabela 21). A estimativa do ϕ_{ST} para todas as amostras da mosca do berne, até o momento analisadas, foi de 0,06 (Tabela 22).

Tabela 20: Análise molecular da variância (AMOVA) de Excoffier et al. (1992) nas 12 populações de *D. hominis* analisadas por RFLP do mtDNA:

Tipo de Variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Componentes da Variância	Porcentagem da Variação
Entre populações	11	8,605	0,03661 (va)	8,3 %
Dentro de populações	112	45,306	0,40452 (vb)	91,70 %
Total	123	53,911		

Índice de diversidade $\phi_{(ST)} = 0,083$

Tabela 21: Análise molecular da variância (AMOVA) de Excoffier et al. (1992) nas populações de *D. hominis* analisadas através do RFLP do mtDNA por Geurgas (1998):

Tipo de Variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Componentes da Variância	Porcentagem da Variação
Entre populações	13	11,907	0,03159 Va	7,10 %
Dentro de populações	213	88,018	0,41323 Vb	92,90 %
Total	226	99,925	0,44482	

Índice de diversidade $\phi_{(ST)} = 0,071$

Tabela 22: Análise molecular da variância (AMOVA) de Excoffier et al. (1992) nas 21 populações de *D. hominis* até o momento analisadas .

Tipo de Variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Componentes da Variância	Porcentagem da Variação
Entre populações	19	16,814	0,02933 Va	6,58 %
Dentro de populações	304	126,612	0,41649 Vb	93,42%
Total	323	143,426	0,44582	

Índice de diversidade $\phi_{(ST)} = 0,066$

V Discussão

RAPD

A espécie *D. hominis* apresentou-se bastante polimórfica para o RAPD. Foram amplificados 129 fragmentos, todos polimórficos com os seis “primers” selecionados. Toda esta variabilidade é dificilmente visualizada e subdividida (componentes intra e interpopulacionais), sendo necessária uma abordagem estatística para melhor interpretar os dados (Ballinger-Crabtree et al ,1992).

Vários são os métodos empregados na medida de variabilidade produzida pelo RAPD. Visando estimar mais adequadamente a variabilidade encontrada em *D. hominis*, utilizamos os índices mais citados na literatura e outros, que em teoria, são promissores, apesar de pouco utilizados.

As similaridades intrapopulacionais calculadas com os índices de Dice, Jaccard e Coincidências simples foram maiores que as interpopulacionais. Esta diferença pode ser atribuída a uma maior identidade entre indivíduos da mesma população, devido ao tamanho das amostras e ao comportamento reprodutivo da espécie.

Quando foram comparadas as similaridades, Dice, Jaccard e Coincidências simples produzidas por matrizes de dados diferentes (completa e reduzida), observou-se diferenças entre os valores de cada índice calculados com cada uma destas matrizes.

Os valores de Dice calculados a partir da matriz reduzida foram menores que os calculados com a matriz completa. Isto deve-se, simplesmente ao, fato de que o índice de Dice considera apenas as presenças de fragmentos em comum. Na redução da matriz são

retirados os fragmentos mais freqüentes, o que pode estar causando a diminuição da estimativa da similaridade entre os indivíduos.

Já os valores de similaridade calculados a partir de Coincidências simples (M) tiveram seus valores aumentados quando do uso da matriz reduzida. Este resultado deve-se ao fato de que M, além de considerar fragmentos em comum no cálculo da similaridade, também considera as ausências, que com a redução da matriz, são aumentados em proporção, causando o aumento da similaridade neste índice.

A medida de similaridade de Jaccard apresentou alta correlação com Dice, tanto quando do uso da matriz completa quando do uso da matriz reduzida, como era esperado já que as duas medidas baseiam-se nos fragmentos em comum, encontrados para cada par de indivíduos. Portanto, pelo menos para esta espécie, estas medidas são compatíveis e levam aos mesmos resultados.

O uso da matriz reduzida nos cálculos de Dice, Jaccard e M foi efetuado para verificar se seria possível minimizar os erros de análise que podem estar contidos na matriz completa de dados. No entanto, quando estas medidas foram correlacionadas entre si, encontrou-se uma alta correlação quando do uso da matriz completa, o que não foi encontrado com o uso da matriz reduzida. Além disso a distância (1-M), baseada nas Coincidências simples (M), a partir da matriz reduzida, não se correlacionou significativamente com nenhuma das distâncias utilizadas neste trabalho. Associados a estas verificações, os resultados calculados a partir da matriz reduzida não podem ser comparados com os obtidos em outros organismos, já que outros autores não utilizam esta redução. Provavelmente, estes resultados estejam indicando que a redução da matriz pode estar causando perda de informação. Ao contrário do que se esperava, a matriz completa foi mais eficiente no cálculo de Dice e M que a matriz reduzida. Esta observação pode ser

explicada pelo fato de que a matriz completa contém uma quantidade muito maior de fragmentos que a reduzida, o que para estes índices, Dice e M, pode ser uma grande vantagem, uma vez que, um grande número de marcadores pode minimizar os efeitos de desvios de interpretação dos dados .

Os valores de similaridade utilizados neste trabalho variam linearmente de 0 (ausência de similaridade) a 1 (similaridade total). Portanto, as médias de similaridade (Dice e M) encontradas em *D. hominis* foram baixas quando comparadas aos valores obtidos por outros autores (anexo 1), já que as médias intrapopulacionais foram de 0,619 para Dice e 0,752 para M, e as médias interpopulacionais foram de 0,461 para Dice e 0,644 para M .

Infante-Malaquias et al. (1999), estudando populações do sudeste do Brasil e Norte da Argentina, da espécie causadora de miíase *Cochliomyia hominivorax*, encontraram valores de Dice variando entre 0,714 e 0,785 intrapopulacionalmente, e de 0,582 a 0,653 interpopulacionalmente. Os valores de M variam de 0,789 a 0,849 dentro da populações e de 0,704 a 0,789 entre as populações. Estes autores concluíram que os indivíduos dentro das populações estão fortemente relacionados e que as populações são muito parecidas entre si. Os valores encontrados para *C. hominivorax* foram muito maiores que os encontrados nas seis populações analisadas neste trabalho sugerindo uma alta variabilidade da mosca do berne tanto dentro quanto entre as populações detectadas por RAPD. Yotoko (1998) estudando seis populações de *D. hominis*, no sudeste brasileiro, encontrou valores de Dice variando entre 0,735 a 0,761 intrapopulacionalmente e de 0,647 a 0,678 interpopulacionalmente. Os valores de M variam de 0,784 a 0,805 dentro das populações e de 0,711 a 0,734 entre as populações. O autor concluiu que existe uma alta similaridade

intrapopulacional e interpopulacional mostrando que as populações são bastante semelhantes entre si.

As estimativas de distância genética, calculadas a partir dos coeficientes F'_{ST} e ϕ_{ST} (Tabela 9), apresentaram correlação significativa com Dice, Jaccard e Coincidências simples obtidos a partir da matriz reduzida de dados, que podem estar subestimando (no caso de Dice e Jaccard) ou superestimando (Coincidências simples) as distâncias entre as populações, como foi sugerido acima. Além disso, as correlações cofenéticas entre estas estimativas e seus respectivos dendrogramas não foram significativas. Isto pode estar indicando que o F'_{ST} e o ϕ_{ST} calculados para cada par de amostras não foram apropriados no estudo da variabilidade genética de *D. hominis*.

O cálculo da distância genética de Nei (1972) (Tabela 8) é uma das mais utilizadas em estudos de populações. Para dados obtidos com RAPD, o uso desta distância não é muito difundido, já que exige uma série de correções e deve partir de alguns pressupostos (propostos por Lynch & Milligan, 1994), como por exemplo o equilíbrio de Hardy-Weinberg. Esta medida apresentou correlação significativa com as medidas de Dice, Jaccard e M calculadas a partir da matriz completa, o que sugere que este pode ser um conjunto robusto de resultados, pelo menos para a mosca do berne. Além disso, a utilização desta medida pode ser útil na comparação entre estudos efetuados com RAPD e com marcadores codominantes.

O dendrograma obtido a partir da medida de Nei (1972) (Figura 4) mostrou que há pouca distância entre as amostras, sendo a maior delas de 3,5%. Este resultado é semelhante ao encontrado na *Cochliomyia hominivorax* por Infante et. al, (1999) (maior distância interpopulacional igual a 10%) onde os autores concluíram que as amostras

encontravam-se fortemente relacionadas. Portanto, os resultados obtidos neste trabalho sugerem que as amostras analisadas são muito parecidas quanto aos loci amplificados via RAPD. Esta observação foi reforçada pela análise da correlação entre distância genética e distância geográfica (Figura 5), a qual mostrou que existe certa correlação entre estas duas variáveis. Este resultado pode indicar a existência de fluxo gênico entre as populações amostradas, o que pode causar a diminuição das distâncias genéticas.

Outros dendrogramas (dados não apresentados), apesar de apresentarem altas correlações cofenéticas com suas respectivas medidas de distância, mostraram diferentes agrupamentos entre as amostras. Este resultado pode estar indicando, mais uma vez, uma similaridade muito grande entre os indivíduos coletados em diferentes regiões do Brasil. Além disso, assim como o dendrograma produzido pelo cálculo de Nei (1972), todos os dendrogramas indicam diferenças relativamente pequenas entre as amostras. Neste caso, as diferenças entre os agrupamentos podem ser explicadas apenas por diferenças nos algoritmos utilizados para os cálculos de distância e não por diferenças com real significado biológico.

O índice de estruturação estimado para *D. hominis* foi de 0,125 quando calculado com o F'_{ST} de Lynch & Milligan e 0,172 para o ϕ_{ST} (Excoffier et al., 1992). Estes valores sugerem que as amostras estudadas neste trabalho sejam de moderada a altamente estruturadas, segundo a interpretação proposta por Wright (1978).

No entanto, esta interpretação do índice de estruturação parece não corresponder ao esperado para esta espécie, já que a mosca do berne é uma praga da pecuária, e que portanto está sujeita à influência antrópica sobre seus hospedeiros. Considerando que o hospedeiro principal do berne é o gado bovino, o transporte deste de uma região para outra

pode acarretar num transporte passivo das larvas. Deste modo, pode ser estabelecido o fluxo de *D. hominis* entre as regiões. Os resultados obtidos anteriormente a este trabalho, Yotoko (1998) e Geurgas (1998), sugerem que esta espécie não apresenta estruturação para as amostras analisadas, fortalecendo a hipótese de que exista fluxo gênico entre elas.

Slatkin (1989) sugeriu que só existe diferenciação significativa entre subpopulações quando o N_m for < 1 , o que não é o caso da mosca do berne que sempre apresentou $N_m > 1$, em todas as análises realizadas, reforçando a hipótese de que a espécie não se encontra estruturada.

As interpretações propostas por Wright (1978) devem ser aplicadas com cautela aos marcadores do tipo dominante, já que o índice de estruturação proposto por este autor foi criado para quantificar a estruturação entre populações, quando estudada com marcadores codominantes, com poucos loci. O F'_{ST} (Lynch & Milligan, 1994) é uma adaptação do F_{ST} de Wright (1978) para o RAPD. Isto pode influenciar na interpretação dos resultados, visto que o RAPD é um marcador dominante, e que, neste tipo de marcador, a heterozigosidade, na qual se baseia o cálculo do F_{ST} , não pode ser medida nas amostras, e sim, estimada a partir de uma série de pressupostos. Além disso, o RAPD produz uma quantidade muito grande de fragmentos. Estes dois fatores associados podem causar uma interpretação inadequada da estrutura das amostras utilizando o F'_{ST} com os parâmetros estabelecidos por Wright.

Outro fator que deve ser considerado, é o fato de na análise do F'_{ST} (Lynch & Milligan, 1994), deve-se considerar uma série de pressupostos, tais como equilíbrio de Hardy-Weinberg, que podem não corresponder ao que está ocorrendo nas populações de *D.*

hominis, com isto, a análise da estrutura de populações através do F'_{ST} (Lynch & Milligan, 1994) estaria fragilizada.

Os altos valores dos índices de estruturação encontrados para as amostras de *D. hominis* analisadas por RAPD e, os exemplos encontrados na literatura, sugerem que seria necessária uma padronização da escala de valores, para a interpretação dos índices de estruturação utilizados em marcadores dominantes. Esta padronização deve ser balizada em características já conhecidas das espécies estudadas e na comparação dos resultados obtidos em organismos diferentes associados aos resultados obtidos com outros marcadores, como por exemplo isozimas.

O ϕ_{ST} (Excoffier et al., 1992) foi criado para quantificar a diversidade nas populações estudadas com o RFLP do DNA mitocondrial, com as mesmas interpretações de Wright. Segundo Excoffier et al, 1992, este é um método alternativo de utilização dos dados disponíveis obtidos com uma série de marcadores moleculares, que tem a vantagem de ser flexível o suficiente para acomodar uma série de pressupostos relativos à evolução de diferentes sistemas genéticos. Huff et al. (1993) sugeriram a utilização do ϕ_{ST} para dados obtidos com RAPD, que permite a partição da variação em componentes intrapopulacionais e interpopulacionais. A utilização deste índice visa minimizar a quantidade de pressupostos que são necessários na determinação da estrutura das populações quando estimada com o RAPD, pois não depende da quantificação dos heterozigotos, entre outros pressupostos. A interpretação do ϕ_{ST} depende apenas dos pressupostos das medidas de distância utilizadas.

A variabilidade das populações da mosca do berne por RAPD quando analisada pelo método AMOVA, é maior dentro da populações 80,8% quando 6 amostras são analisadas e 80,3% quando 12 amostras são analisadas. No entanto, é encontrado cerca de

20% de variação entre as populações, o que estaria indicando que existe uma pequena diferenciação entre as populações, porém esta diferenciação não é suficiente para indicar uma estruturação desta populações.

Sinclair et al. (1996) analisando a variabilidade e a estrutura das populações de 6 populações de *Pteropus scapulatus*, através de RAPD e isozimas, encontrou que 95% da variação encontra-se dentro da populações pelo método AMOVA e um F_{ST} baixo de 0,028 com dados de isozimas e que portanto as espécies se comportam como uma grande unidade intercruzante.

No entanto os resultados do ϕ_{ST} , analisados como medida de estruturação, obtidos para a mosca do berne, se interpretados como foi proposto por Wright (1978), sugerem uma estruturação ainda maior que a obtida com o F'_{ST} (Lynch & Milligan, 1994). Este resultado estaria em confronto com os dados obtidos até o momento com a análise dos dados de RAPD e com as informações disponíveis sobre a biologia da espécie. Isto também foi encontrado por Todd et al. (1997) estudando a estrutura de populações de um parasita de salmão, *Leplophtheirus salmonis* em 16 populações da Escócia, através de RAPD e isozimas. Esta espécie possui uma grande capacidade de dispersão pois a larva é planctônica e o adulto pode ser transportado passivamente pelo hospedeiro que é uma espécie migratória. Quando foi realizada análise da estrutura de populações através de isozimas não foi encontrada diferenciação entre as populações, indicando a não estruturação desta espécie. No entanto, a análise através do RAPD utilizando o ϕ_{ST} como medida de estruturação indicou que a espécie encontra-se estruturada com $\phi_{ST} = 0,362$.

A análise das seis populações através do marcador RAPD sugere que a espécie comporta-se como uma metapopulação, composta de populações altamente variáveis, como

verificado na análise pelos vários índices de similaridade e distância genética utilizados. A maior parte da diversidade encontra-se dentro das populações porém existe uma certa diversidade entre as populações como foi verificada pelo AMOVA. No entanto esta diversidade interpopulacional não é suficiente para indicar a estruturação das populações. A análise do Nm e da correlação entre distância genética e distância geográfica sugeriram a existência de fluxo gênico entre estas populações que estaria dificultando o processo de estruturação das populações. Este fluxo gênico deve ocorrer provavelmente devido ao transporte passivo das larvas através do tráfego de hospedeiros de uma região para outra, visto que os adultos apresentam uma baixa capacidade de dispersão e não se sabe nada sobre a dispersão dos vetores. Estes resultados corroboram com os anteriormente encontrados por Yotoko (1998).

RFLP do mtDNA

D. hominis apresentou-se altamente polimórfica para o RFLP do mtDNA. Foram detectados 24 novos haplótipos além dos 48 já descritos por Geurgas (1998) e Geurgas et al. (2000), o que perfaz um total de 72 haplótipos até agora encontrados para a mosca do berne. Este grande número de haplótipos de certa forma corrobora a hipótese de que a espécie é altamente variável, sugerida através dos resultados obtidos com RAPD.

Em outros organismos, o número de haplótipos encontrados é bem menor do que o detectado na mosca do berne. Infante & Azeredo-Espin (1995) encontraram 15 haplótipos mitocondriais na análise de 4 populações do sudeste brasileiro da espécie causadora de miíase *Cochliomyia hominivorax* e concluíram que esta espécie é altamente variável. Latorre et al.

(1992) encontraram 13 haplótipos mitocondriais em 38 populações de *Drosophila subobscura* amostradas em diferentes países da Europa e ilhas do Continente Africano.

As frequências dos haplótipos nas populações *D. hominis* mostram que existem alguns haplótipos amplamente distribuídos entre as amostras e que apresentam frequências relativamente altas na maioria delas. Por outro lado há a ocorrência de haplótipos raros, que em alguns casos foram de ocorrência única na amostra total e em outros foram compartilhados por algumas populações (Tabela 16).

A diversidade haplotípica amostra variou de 0,545 em Cáceres onde foram detectados apenas 2 haplótipos em 11 indivíduos a 0,982 em Ponta Grossa onde foram detectados 10 haplótipos, com o mesmo tamanho amostral (Tabela 17).

Grande quantidade de haplótipos foi detectada nesta espécie, e os valores de diversidade nucleotídica dentro e entre as populações foi pequena, comparadas aos resultados de outros autores (Anexo 2). Estes resultados são explicados pela presença de haplótipos comuns entre as amostras e à grande semelhança entre os haplótipos, inclusive os raros, que diferem em poucos sítios de restrição com os mais comuns.

A divergência nucleotídica (d) componente exclusivamente interpopulacional da diversidade nucleotídica, foi baixa, apresentando valores negativos para alguns pares de populações. Nei (1987) sugere que valores negativos de divergência nucleotídica, como a encontrada nas amostras analisadas de *D. hominis*, indicam alta similaridade entre populações. Esta mesma conclusão foi obtida com os resultados de RAPD.

Os valores de similaridade (Nei & Li, 1979) foram altos variando de 0,797 a 0,984 dentro das populações; e de 0,691 a 0,972 entre as populações. Assim como na diversidade nucleotídica, a alta similaridade do índice de Nei & Li (1979) deve-se há uma alta frequência de haplótipos comuns compartilhados e haplótipos raros encontram-se relacionados a estes.

O dendrograma da distância de Nei & Li (1979) (1- Similaridade) sugere que as populações são muito semelhantes, provavelmente a ocorrência de fluxo gênico pode estar homogeneizando a variabilidade entre as populações. Apesar de não ter sido obtida uma correlação entre esta distância e a distância geográfica, a ocorrência de haplótipos raros compartilhados são uma forte evidência da existência de fluxo.

O índice de diversidade ϕ_{ST} proposto por Excoffier et al. (1992), indica uma baixa estruturação ($\phi_{ST} = 0,08$) entre as amostras de *D. hominis* estudadas com o RFLP do mtDNA, seguindo a escala proposta por Wright (1978). Este resultado foi parecido com o anteriormente encontrado por Geurgas ($\phi_{ST} = 0,07$) (1998) e com o valor estimado para todas as populações até então estudadas com este marcador ($\phi_{ST} = 0,06$), o que reforça a hipótese de que a espécie não esteja estruturada, já que o aumento no número de indivíduos e populações estudados não alterou os resultados obtidos e a interpretação dos dados.

A análise do mtDNA através do RFLP nas doze populações amostradas, revelou que as populações são bastante variáveis pela número, distribuição e frequências dos haplótipos. Além disso a presença de haplótipos raros compartilhados indicou a existência de fluxo gênico que estaria homogeneizando esta variabilidade entre as populações.

A alta variabilidade detectada no mtDNA de *D. hominis* merece uma atenção especial pois foi encontrado um do grande número de haplótipos nesta espécie. Além disso, Lessinger & Azeredo-Espin (2000) estudando a região controle (rica em A+T) de *D. hominis* e mais 4 outras espécie causadoras de miíases, encontraram uma variação no tamanho desta região, sendo que a mosca do berne apresentou um tamanho maior (1570 pb) quando comparada às outras espécies (1178 - 986 pb). Esta variação pode ser devido a deleções e/ou inserções, além da presença de curtas seqüências repetitivas.

Um outro fator que pode estar envolvido na variabilidade encontrada no MtDNA na mosca do berne seriam as mutações causadas por espécies reativas de oxigênio (ROS) ou radicais livres. Estes são produzidos normalmente no metabolismo aeróbico (Richeter et al., 1988). As células possuem mecanismos de defesa para controlar os ROS, quando a produção de radicais livres excede a capacidade dos sistemas de controle que recebe o nome de estresse oxidativo (revisão em Halliwell & Aruoma, 1991). O estresse oxidativo pode causar danos no DNA tais como quebra na cadeia simples ou dupla; aberrações cromossômica (revisão em Halliwell & Aruoma, 1991) e oxidação de resíduos de bases e açúcares (Richeter et al., 1988). Richeter et al.(1988) encontraram uma maior oxidação do mtDNA do que no nuclear e postularam que isto pode ser explicado pelo fato de que a mitocôndria consome 90% do oxigênio celular e a cadeia respiratória é uma fonte continua de oxigênio; o mtDNA não possui a proteção de proteínas, tais como, as histonas, e por isso seriam mais vulneráveis aos ataques pelos ROS que o DNA nuclear e finalmente que o mtDNA pode ser menos eficiente no reparo de substituição de bases no DNA e erros de replicação do que o DNA nuclear.

A liberação de radicais livres na metabolização dos inseticidas utilizados no controle desta praga podem estar causando as mutações encontradas no DNA mitocondrial da mosca do berne. Embora não exista nenhum estudo prévio sobre o metabolismo destes inseticidas e a liberação de radicais livres, sabe-se que alguns herbicidas liberam radicais livres quando são metabolizados, e estes são a base de ação destes agentes químicos, como por exemplo o Paraquat (Winterbourn, 1981; Winterbourn & Sutton, 1984). No entanto para confirmar esta hipótese deve ser realizado estudos sobre a metabolização dos inseticidas utilizados no controle do berne e os danos causado no DNA mitocondrial pelos resíduos liberados neste processo.

RAPD e RFLP do mtDNA

Os dois marcadores detectaram alta similaridade entre as populações estudadas. Esta similaridade pode ser explicada pelo fato de que as larvas de berne estão associadas ao gado bovino, que é transportado extensivamente em todo o território nacional, provocando uma migração passiva da larva através dos hospedeiros infestados entre as regiões amostradas que podem estar proporcionando o contato e um fluxo gênico interpopulacional e homogeneização das mesmas.

Esta homogeneização é corroborada pela estimativa do índice de fixação calculado com o RFLP do mtDNA. Este resultado, associado ao fluxo presente nesta espécie, confirma a necessidade de novos parâmetros para a interpretação da estrutura das populações estimadas a partir dos coeficientes de F'_{ST} (Lynch & Milligan, 1994) e ϕ_{ST} (Excoffier et al., 1992), calculados com fragmentos produzidos por RAPD.

Apesar da alta similaridade encontrada entre as populações, uma alta variabilidade foi detectada entre os indivíduos por ambos os marcadores utilizados neste trabalho, o que mostra que a maior parte da variabilidade da espécie está contida dentro das populações e não entre elas. Como já foi explicada para os índices de estruturação, estes resultados devem-se ao alto fluxo gênico entre as populações.

A origem desta variabilidade pode ter acontecido no período anterior à colonização européia no continente americano. Antes deste período, supõem-se que as populações do berne fossem pequenas e isoladas, permitindo que se diferenciasssem por ação de deriva genética, e com o passar do tempo surgiu toda a variabilidade hoje existente. Com a introdução e domesticação do gado houve um aumento de recursos (hospedeiros) e isto fez

com que a espécie aumentasse a densidade populacional, tornando-se assim uma praga, sem ter sua variabilidade diminuída. Além disso, com o transporte do gado, esta variabilidade vem sendo distribuída pelas diferentes regiões de forma cada vez mais rápida em todo o território brasileiro.

D. hominis é uma espécie de grande interesse econômico, por ser uma das principais pragas da pecuária brasileira. Além disso, apresenta um grande interesse biológico devido à sua estratégia de dispersão através de insetos vetores e peculiaridades do seu ciclo de vida, que impedem a manutenção desta espécie em condições de laboratório. A abordagem genética baseada em dois tipos diferentes de marcadores moleculares utilizada neste trabalho, demonstrou a grande variabilidade desta espécie. A utilização desta abordagem ao longo do anos, permitirá o monitoramento destas populações e o estabelecimento de métodos mais eficientes para o controle desta importante praga da pecuária brasileira.

VI Considerações gerais

- A análise das várias abordagens utilizadas para quantificar a variabilidade da espécie, demonstrou que a utilização da matriz completa dos dados em qualquer um dos índices foi mais eficiente que a utilização da matriz reduzida. Além disso, a distância de Nei (1972) apesar de pouco utilizada, no caso da mosca do berne, apresentou resultados concordantes com o encontrado nas outras medidas, a utilização desta medida nos permite comparar os resultados com os obtidos com marcadores codominantes.
- A espécie *D. hominis* mostrou-se bastante variável para os dois marcadores moleculares como foi verificados nas medidas de similaridade e número e frequência de haplótipos. Esta variabilidade encontra-se distribuída homogeneamente nas amostras analisadas. A homogeneização das populações pode ser consequência de fluxo gênico entre as populações, que foi verificado pela existência de haplótipos raros compartilhados entre as populações.
- A mosca do berne comporta-se como uma metapopulação, onde as populações que a compõem possuem fluxo gênico entre si. Este fluxo é causado, principalmente, pelo transporte passivo das larvas através dos hospedeiros.
- A escolha de uma estratégia de controle desta praga deve considerar a alta variabilidade da espécie, a não estruturação das populações e o fluxo gênico.

VII Referências bibliográficas

- Andrade, E.N., 1929. Pesquisas sobre o berne Arq. Inst. Biol. São Paulo 2:53-60.
- Afonso, J.M; Volz, A; Hernandez, M; Ruttkay, H; Gonzalez, M; Larruga, J.M; Cabrera, V.M;
Sperlich, D., 1990. Mitochondrial DNA variation and genetic structure in old world
populations of *Drosophila subobscura*. Mol. Biol. Evol.. 7(2): 123-142.
- Arnberg, A.C; van Bruggen, E.F.J; Brost, P; Clegg, R.A; Schutgens, R.B.H; Waijers, P.J;
Goldbach, R.W., 1975. Mitochondrial DNA of *Tetrahymena pyriformis* strain ST
contains a long terminal duplication - inversion. Biochem. Biophys. Acta 383: 359-
369.
- Avise, J.C; Arnold, J; Ball, R.M; Bermingham, E; Lamb, T; Neigel, J.E; Reeb, C.A;
Saunders, N. C., 1987. Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA
bridge between populations genetics and systematics. Annu. Rev. Ecol. Syst. 18:
489-522.
- Avise, J.C; Lansman, R.A., 1983. Polymorphism of mitochondrial DNA in populations of
higher animals. In Evolution of Genes and Proteins. Edited by M. Nei and R.
Koehn. Sinauer, Sunderland, MA, pp 147-164.

- Awise, J.C; Smith, M.M; Selander R.K., 1979. Biochemical polymorphism and systematics in the genus *Peromyscus*. VII geographic differentiation in members of the *truei* and *maniculatus* species groups. **J. Mammal.** **60:** 177-192.
- Ballinger-Crabtree, M.E; Black IV, W.C; Miller, B.R., 1992. Use of genetic polymorphism detected by the Random Amplified Polymorphic DNA Polymerase Chain Reaction (RAPD-PCR) for differentiation and identification of *Aedes aegypti* subspecies and populations. **Am. J. Trop. Med. Hygi.** **47:** 893-901.
- Baruffi, L; Damiano, G; Guglielmino, C.R; Bandi, C; Malacrida, A.R; Gasperi, G., 1995. Polymorphism within and between populations of *Ceratitis capitata*: Comparison between RAPD and multilocus enzyme electrophoresis data. **Heredity** **74:** 425-437.
- Binelli, G; Bucci, G., 1994. A genetic linkage map of *Picea abies* Karst, based on RAPD markers, as a tool in population genetics. **Theor. Appl. Genet.** **88:** 283-288.
- Black IV, W.C., 1993. PCR with arbitrary primers: approach with care. **Insect Mol. Biol.** **2** : 1-6.
- Black IV, W.C., 1997. RAPDFST 4.0.1, a FORTRAN Program to estimate F(ST) and effective migration rates among subpopulations using RAPD-PCR files.
- Black IV, W.C., 1997. RAPDPLOT 3.0, a FORTRAN program written to display genetic relationships among individuals derived using RAPD-PCR markers.

Black IV & Antolin, M., 1997. RAPDDIST 1.0, a FORTRAN program written to compute genetic distances among populations from a standard RPD dataset.

Black IV, W.C., DuTeau, N.M., Puterka, G.J., Nechols, J.R., Pettorini, J.M., 1992. Use of the Random Amplified Polymorphic DNA Polymerase Chain Reaction (RAPD-PCR) to detect DNA polymorphisms in aphids (Homoptera: Aphididae). **Bull. Entomol. Res.** 82:151-159.

Bowditch B. M., Albright D. G., Braun M. J., 1993. the use of RAPD markers in comparative genome studies, **Meth. Enzymol.** 224: 294-308.

Bridge, D; Cunningham, C.W; Schierwater, B; DeSalle, R; Boss, L. W., 1992. Class-level relationships in the phylum cnidaria: Evidence from mitochondrial genome structure. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 89: 8750-8753.

Brown, W.M., 1983. Evolution of animal mitochondrial DNA. *In* Evolution of Genes and Proteins. Edited by M. Nei and R.K. Koehn, Sinauer Associates Inc, Sunderland, MA. pp 62-88.

Brown, W.M., George M., Wilson A., 1979. Rapid Evolution of Animal Mitochondrial DNA. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 76 (4): 1967-1971.

Cann, J; Cockburn, A.F; Mitchell, S.E., 1993. Population differentiation of the malaria vector *Anopheles aquasalis* using mitochondrial DNA. **J. Hered.** 10: 248-253.

- Catts, E.P., 1982. Biology of New world bot flies: Cuterebridae. **Annu. Rev. Entomol.** **27:313-338.**
- Cenis, J. L. & Fereres, A., 1993, Identification of aphid (Homoptera-Aphididae) species and clones by Random amplified Polymorphic DNA. **Entomol. Soc. of Am.** **86(5): 545-550.**
- Chapco, W; Ashton, N.W; Martel, R.K.B; Antonishyn, N., 1992. A feasibility study of the use of random amplified polymorphic DNA in the population genetics and the systematics of grasshoppers. **Genome.** **35: 569-574.**
- Chen, A.C; Bull, D.L., 1994. Random Amplified Polymorphic DNA as a tool for differentiating house fly strains. **Southwest. Entomol.** **19(4): 361-369.**
- Clary, D.O; Wolstenholme,D.R., 1983. Nucleotide sequence of a segment of *Drosophila* mitochondrial DNA that contains the genes for cytochrome c oxidase subunits II and III and ATPase subunit 6. **Nucleic Acids Res.** **11: 4211-4227.**
- Clary, D.O; Wolstenholme,D.R., 1987. *Drosophila* mitochondrial DNA: Conserved sequences in the A+T rich region and supporting evidence for a secondary structure model of the small ribosomal RNA. **J. Mol. Evol.** **25: 116-125.**

- Cognato, A.I; Rodgers, S.O; Teale, S.A., 1995. Species diagnosis and phylogeny of *Ips grandicollis* group (Coleoptera: Scolytidae) using random amplified polymorphic DNA. **Ann. Entomol. Soc. Am.** **88(4): 397-405.**
- Crozier, R.H; Crozier, Y.C; Mackinlay, A.G., 1989. The COI and COII region of Honeybee mitochondrial DNA: Evidence for variation in insect mitochondrial evolutionary rates. **Mol. Biol. Evol.** **6(4): 399-411.**
- DeSalle, R; Templeton, A; Mori, I; Pletscher, S; Johnston, J.S., 1987a. Temporal and spatial heterogeneity of mitochondrial DNA polymorphism in natural populations of *Drosophila mercatorum*. **Genetics** **116 (2): 215-224.**
- DeSalle, R; Templeton, A., 1992. The mtDNA genealogy of closely related *Drosophila silvestris*. **J. Hered.** **83: 211-216.**
- De Salle, R; Val giddings, L; Kaneshiro, K.Y., 1986. Mitochondrial DNA variability in natural populations of Hawaiian *Drosophila* II. Genetic and phylogenetic relationships of natural populations of *D. silvestris* and *D. heteroneura*. **Heredity** **56: 87-96.**
- Dice, L.R., 1945. Measures of the amount of ecological association between species. **Ecology** **26:297-302.**

- Dowdy, A.K; McGaughey, W.H., 1996. Using Random Amplified polymorphic DNA to differentiate strains of indian meal moth (Lepidoptera: Pyralidae). **Environ. Entomol.** **25 (2): 396-400.**
- Edwards, O.R; Hoy M.A., 1995. Random Amplified Polymorphic DNA markers to monitor laboratory-selected, pesticide resistance *Trioxys pallidus* (Himenoptera: Aphidiidae). After release into three California walnut orchards. **Environ. Entomol.** **24 (3): 487-496.**
- Ellsworth,D.L., Rittenhouse, K.D. & Honeycutt, R.L., 1993. Artifactual variation in Random amplified Polymorphic DNA banding patternes. **Biotechniques** **14:214-217.**
- Excoffier,L., Smouse, R.E. , Quattro, J. M., 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distance among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics** **131: 479-491.**
- Excoffier,L.,1993.AMOVA 1.55 Distributed by aoutor. University of Geneva. Department of anthropology, Genetics and Biometry Lab., Switzerland
- Flavell, R.A; Jones, I.G., 1970. Mitochondrial deoxyribonucleic acid from *Tetrahymena pyriformis* and its kinetic complexity. **Biochem. J.** **116: 811-817.**

- Gawel, N.J; Bartlet, A.C., 1993. Characterization of differences between whiteflies using RAPD-PCR. **Insect Mol. Biol.** 2(1): 33-38.
- Geurgas, S.R., 1998. Análise do polimorfismo de populações brasileiras de *D. hominis* (Diptera: Cuetrebridae) através de RFLP do DNA mitocondrial. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, SP. 90 pgs.
- Geurgas, S. R. & Azeredo-Espin, A.M.L.. 2000. Extreme Mitochondrial DNA Variability and Lack of Genetic Struture in Populations of *Dermatobia hominis* (Diptera : Cuterebridae) from Brazil. **Ann. Entomol. Soc. Am.** (in press).
- Goldring, E.S; Peacock, W.J., 1977. Intramolecular heterogeneity of mitochondrial DNA of *Drosophila melanogaster*. **J. Cell Biol.** 73: 279-286.
- Gray, M.W., (1989). Origin and Evolution of mitochondrial DNA. **Annu. Rev. Cell. Biol.** 5: 25-50.
- Guimarães, J.H., Papavero, N7 Prado,A. P., 1983. As miíases na Região Neotropical (identificação, biologia, biogeografia). **Rev. Bras. Zool.** 1(40: 239-416.
- Guimarães, J.H. & Papavero, N. 1966. A tentative annotated bibliography of *Dermatobia hominis* (Linnaeus Jr., 1781). **Arq. Zool. Estado São Paulo.** XIV.

Hadrys,H.; Black, M & Schiewater,B.. 1992. Application of Random Amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. **Mol. Ecol.** **1:55-63.**

Haymer, D.S., 1995. Genetic analysis of laboratory and wild strains of the melon fly (Diptera:Tephritidae) using Random Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction. **Ann. Entomol. Soc. Am.** **88(5): 705-710.**

Haymer, D.S; Mc Innis, D.O., 1993. Resolution of populations of the Mediterranean fruit fly at the DNA level using random primers for the polymerase chain reaction. **Genome.** **37: 244-248.**

Haymer, D.S., 1994b. Random Amplified Polymorphic DNAs and Microsatellites; What are they, and can they tell us anything we don't already know? **Annals of the Entomological Society of America** **87: 717-721.**

Hale, L.R; Beckenbach, A.T., 1985. Mitochondrial DNA variation in *Drosophila pseudoobscura* and related species in Pacific Northwest populations. **Canadian Journal of Genetics and Cytology** **27 (3): 357-364.**

Hale, L.R; Singh, R.S., 1991. A comprehensive study of genic variation of natural populations of *Drosophila melanogaster*. IV Mitochondrial DNA variation and the role of history v/s selection in the genetic structure of geographic populations. **Genetics** **129: 103-117.**

Hall., M; Wall, R., 1995. Myiasis of human and domestic animals. *Advances in Parasitology* **35**: 257-334.

Halliburton, R; Barker, J.S.F., 1993. Lack of mitochondrial variation in Australian *Drosophila buzzatti*. *Molecular Biology and Evolution* **10** (2): 484-487.

Halliwell, B. & Aruoma, O. I..1991. DNA damage by oxygen-derived species. *FEBS* **281** (1,2): 9-19.

Harrison, R.G., 1989. Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. *Trends Ecol. Evol.* **4**: 6-11.

Hilu, K.W., 1995. Evolution of finger millet: evidence from random amplified polymorphic DNA. *Genome* **38**: 232-238.

Hope, F.W., 1840. On insects and their larvae occasionally found in the human body. *Trans. Ent. Soc. Lond.* **2**: 256-271, pl.22, figs. 1-5.

Huff,D.R., Peakall, R., Smouse, P. E..1993. RAPD variation within and among population of outcrossing buffalo grass. *Theoret. Appl. Genet.* **86**: 927-934.

Infante, M.E. and Azeredo Espin , A.M.L. 1995. Genetic variability in mitochondrial DNA of screwworm, *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae), from Brazil. *Biochemical Genetics* **33**: 737-756.

Infante-Malachias, M.E.; Yotoko, K.S.C.; Azeredo-Espin, A.M.L., 1999. Random Amplified Polymorphic DNA of screwworm fly (Diptera: Calliphoridae) populations from Southeastern Brazil and Northern Argentina. **Genome. 42:772-779.**

Infante-Malachias, M.E; Solferini, V.N; Andrade, S.C.S; Azeredo-Espin, A.M.L., 1998. Population Heterogeneity of *C. hominivorax* (Diptera: Calliphoridae) from Southeastern Brazil. (**Medical and Veterinary Entomology, submitted**).

Jaccard, P. 1908. Étude comparative de la distribution florale dans une portion des alpes et du jura. **Bull. Soc. Vaudoise Sci. Nat. 37: 547-579.**

Kambhampati, S; Black IV, W.C; Karamjit, S.R., 1992. Random Amplified Polymorphic DNA of mosquito species and populations (Diptera: Culicidae): techniques, statistical analysis, and applications. **Journal of Medical Entomology 29: 939-945.**

Kambhampati, S; Karamjit, S.R., 1991. Variation in mitochondrial DNA of *Aedes* species (Diptera:Culicidae). **Evolution. 45(1): 120-129.**

Kambhampati, S; Rai, K. S; Verleye, D.M., 1992a. Frequencies of mitochondrial DNA haplotypes in laboratory cage populations of the mosquito *Aedes albopictus*. **Genetics 132: 205-209.**

- Lamb, T; Avise, J.C., 1992. Molecular and population genetic aspects of mitochondrial DNA variability in the Diamond back terrapin, *Malaclemys terrapin*. **Journal of Heredity**. **83**: 262-269.
- Landry, P.A. & Lapointe, F.J., 1996. RAPD problems in phylogenetics. **Zoologica Scripta**. **25** (4) 283-290.
- Lanham, P.G; Brennan, R.M; Mackett, C; McNicols, R.J., 1995. RAPD fingerprinting of blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) cultivars. **Theor Appl. Genet**. **90**: 166-172.
- Latorre, A; Moya, A; Ayala, F.J., 1986. Evolution of mitochondrial DNA in *Drosophila subobscura*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. **83**: 8649-8653.
- Lessinger, A.C. & Azeredo-Espin, A.M.L.. 2000. Evolution and structural organization of mitochondrial DNA control region of myiasis-causing flies. **Medical and Veterinary Entomology** **14**: 71-80.
- Lynch, M; Milligan, B.G., 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. **Molecular Ecology** **3**: 91-99.
- Maia, A.A.M. & Guimarães.M.P., 1986. Uso da Ivermectina no controle de larvas de *D.hominis* em bovinos de corte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** :57-64.

Mantel, N..1967. The detector of disease clustering and a generalized regression approach.

Cancer Res. 27: 209-220.

Mendel, Z; Nestel, D; Gafny, R., 1994. Examination of the origin of the Israely population of *Matsucoccus josephi* (Homóptera: Matsucoccidae). Using Random Amplified polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction **Method. Ann. Entomol. Soc. Am.**

87 (2): 165-169.

Meunier, J.R & Grimont. 1993. Factors affesting reproducibility of Randon amplified Polymorfic DNA fingerprinting. **Re. Microbiol. 144: 373-379.**

McElroy, B., Moran, P., Bermingham,E., Kornfield, I. ,1992. REAP: an inytegrates enviromment for the manipulation and phylogenetic analysis of restriction data. **Journal of Heretity 83:157-158.**

Mitchell, S.E., Narang, S.K., Cockburn, A.F., Seawright, J.A., Goldenthal,A.,1992. Mitochondial and ribosomal DNA variation among members of the Anopheles gradrimaculatus (DIPTERA:CULICIDAE) spcies complex. **Genome 35: 939-950.**

Moritz, C; Dowling, T.E; Brown, W.M., 1987. Evolution of Animal Mitochondrial DNA: Relevance for Population Biology and Systematics. **Ann. Rev. Ecol. Syst. 18: 269-292.**

Nei, M., 1987. Molecular Evolutionary Genetics. Columbia University Press. New York.

Nei, M., 1972. Genetic distance between populations. **Am. Nat.** 106: 283-292.

Nei, M., and W.H. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. **Proceedings of National Academy of Science USA** 76: 5296-5273.

Oliveira, G.P., 1985. Variação dos índices de perfurações em couros de bovinos, provocados pela *D. hominis* observada em curtumes. **Ciência e Cultura** 37:80-83.

Park, Y.-h. Kohel, R.J., 1994. Effect of concentration of MgCl₂ on Random-Amplified DNA Polymorphism. **Biotechniques** 16(4): 652-655.

Pissios, P; Scouras, Z.G., 1993. Mitochondrial DNA evolution in the montium-species subgroup of *Drosophila*. **Mol. Biol. Evol.** 10(2): 375-382.

Pillay, M. & Kenny, S. T., 1994. anomalies in direct pairwise comparisons of RAPD fragments for genetic analysis. **Biotechniques** 19: 694-698.

Plomion, C; Bahman, N; Durel, C-E; O'Malley, D.M., 1995. Genomic mapping in *Pinus pinaster* (maritime pine) using RAPD and protein markers. **Heredity** 74: 661-668.

- Powell, J.R. 1994. Molecular Techniques in Population genetics. *In* Molecular Ecology and Evolution: Approaches and Applications. Edited by B. Shierwater; B, Streit; G, Wagner and R, DeSalle. Birkhause, Verlag, Basel. pp 131-156.
- Puterka, G.J; Black IV, W.C; Steiner, W.M; Burton, R.L., 1993. Genetic variation an phylogenetic relationships among worldwide collections of the Russian wheat aphid, *Diuraphis noxia* (Mordvilko), inferred from allozyme and RAPD-PCR markers. **Heredity 70: 604-618.**
- Reyes, A; Ochando, M.D., 1998. Use of molecular markers for detecting the geographical origin of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) populations. **Ann. Entomol. Soc. Am. 91 (2): 222-227.**
- Richter,C., Pack,J.W., Ames, R.N., 1988. Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85: 6465-6467.**
- Ribeiro,P.B., Vianna,E.E.S.,Costa,P.R.P. & Scholl,P.J.,1993. Período de vida e capacidade de postura da *Dermatobia hominis*, em laboratório. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária 2 :29-31.**
- Riedy, M. F. HamiltonIII W. J. Aquadro C. F..1992. Excess of nono-parental band in offspring from known primate pedigrees assayed using RAPD PCR. **Nucleic. Acids Res. 20: 918.**

Rieseberg, L. H. 1996. Homology among RAPD fragments in interspecific comparisons.

Mol. Ecol. 5: 99-105.

Roderick, G.K., 1996. Geographic structure of Insect Populations: Gene flow,

Phylogeography, and their uses. **Annual Review Entomology 41: 325-352.**

Roehrdanz, R.L; Flanders, R.V., 1993. Detection of DNA polymorphism in predatory coccinellids using polymerase chain reaction and arbitrary primers (RAPD-PCR).

Entomophaga 38: 479-491.

Rohlf & Slice. 1992. NTSYS 1.7 - Numerical Taxonomy and multivariate Analysis system.

Roncalli, R.A., & Berriter-Usher, C..1988. Efficacy of ivermetin against *D. hominis* in cattle. **Veterinary Parasitology 28: 343-346.**

Ross, K.G; Krieger, M.J.B; Shoemaker, D.D; Vargo, E.L; Keller, L., 1997. Hierarchical Analysis of Genetics Structure in Native Fire Ant populations: Results From three Classes of Molecular Markers. **Genetics 147: 643-655.**

Saiki, R.K; Gelfand, D.H; Stoffel, S; Scharf, S.J; Higuchi, R; Horn, G.T; Mullis, K.B, Erlich, H.A., 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science 239: 487-491.**

- Sambroock, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.
- Schneider, S; Kueffer, J. M.; Roessli, D.; Excoffier, L..1997. Arlequin ver 1.1 : A software for population genetic data analysis. Genetics and Biometry Laboratory. University of Geneva. Switzerland.
- Scott, M. P.; Haymes K. M.; Williams S. M..1992. Parentage analysis using RAPD RCR. **Nucleic Acids Res. 20:5493.**
- Sheppard, W.S; Steck, G.J; McPheron, B.A., 1992. Geographic populations of the medfly may be differentiated by mitochondrial DNA variation. **Experientia 48: 1010-1013.**
- Simon, C; Frati, F; Beckenbach, A; Crespi, B; Liu, H; Flook, P., 1994. Evolution, Weighting and Phylogenetic Utility of Mitochondrial DNA Sequences and a Compilation of Conserved Polymerase Chain Reaction Primers. **Ann. Entomol. Soc. Am. 87(6):651-701.**
- Sinclair, E.A., Webb, N.J., Marchant, A.D. Tidemann, C.R., 1996. Genetic variation in the little red flying-fox *Pteropus scapulatus* (Chiroptera: Pteropodidae) implications for management. **Biological Conservation 76: 45-50.**
- Slatkin, M., 1994. Gene flow and population structure. Ecological genetics Edited by Leslie A Real. Princeton University Press.

Slatkin, M., 1995. Gene flow in natural population . **Ann. Rev. Ecol. Syst.** **16**: 393-430.

Sokal, R.R. & Michener, C.D., 1958. A statistical method for evaluating systematics relationships. **Univ. Kansas Sci. Bull.** **38**: 1405-1438.

Stevens, J; Wall, R., 1995. The use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis for studies of genetic variation in populations of the blowfly *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) in South England. **Bulletin of Entomological Research** **85**: 549-555.

Stevens, J; Wall, R., 1996a. Species, sub-species and hybrid populations of the blowflies *Lucilia cuprina* and *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). Proceedings of Royal Society of London, serie B: **Biological Science** **263**: 1335-1341.

Stevens, J; Wall, R., 1996b. Genetic variation in populations of the blowflies *Lucilia cuprina* and *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). Random amplified polymorphic DNA analysis and mitochondrial DNA sequences. **Biochemical Systematics and Ecology** **25** (2): 81-97.

Southern, E.M., 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by electrophoresis. **Journal of Molecular Biology** **98**: 503.

- Szalanski, A.L.; Taylor, D.B; Peterson II, R.D., 1996. Populations Genetic and Gene Variation of Stable fly Populations (Diptera:Muscidae) in Nebraska. **Journal of Medical Entomology** 33 (3): 413-420.
- Todd,C.D., Walter,A.M., Wolff, K., Northcott, S.J., Walker, A.F., Ritchie, M.G., Hoskins,R., Abbott,R.J., Hazo,N.,1997. Genetic differentiation of the copepod sea louse *Lepeophtheirus salmonis* around the coast of scotland: Evidence from RAPD markers. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. 210: 251-274.
- Uribe,L.F.; Mc.Mullin, P.F.; Cramer, L.G. & Amaral, N.K.,1989. Topicaly Applied Invermectin:Efficacy Against Torsalo. **Journal of Economic Entomology**. 82 : 847-849.
- Vanlerberghe-Masutti, F., 1994. Molecular identification and phylogeny of parasitic wasp species (Himenóptera: Trichogrammatidae) by mitochondrial DNA RFLP and RAPD markers.**Insect Molecular Biology**. 3(4): 229-237.
- Waugh R. & Powell W.. 1992. Using RAPD markers for crop improvement. **Tibtech** 10: 186-191.
- Welsh, J. & McCleand, M., 1990. Fingerprint genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research** 18:7213-7218.

- Welsh, J; Petersen, C; McClelland, M., 1991. Polymorphism generated by arbitrary primer PCR in the mouse: application to strain identification and genetic mapping. **Nucleic Acids. Res. 19: 303-306.**
- Wilkerson, R.C; Parsons, T.J; Albrigh, D.G; Klein, T.A; Brown, M.J., 1993. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers readily distinguish cryptic mosquito species (Diptera: Culicidae: *Anopheles*). **Insect Molecular Biology 1(4): 205-211.**
- Williams, J.G.K; Nanafe, M.K; Rafalsky, J.A; Tingey, S.V., 1993. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. **Meth. Enzymol. 218: 704-740.**
- Williams, J.G.K, Kubelik, A.R., Livak, K.J.K., Rafalsky, J.A. & Tingey, S.V., 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Res. 18:6531-6535.**
- Wilson, A.C, Cann, R; Carr, S.M; George, M; Gyllenstein, U.B; Helm-Bychowski, K.M; Higuchi, G; Palumbi, S.R; Prager, E.M; Sage, R.D; Stoneking, M., 1985. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. **Biological Journal of the Linnean Society 26: 375-400.**
- Winterbourn, C. & Sutton, H.C., 1984. Hydroxyl radical production from hydrogen peroxide and enzymatically generated paraquat radicals: catalytic requirements and oxygen dependence. **Archives of Biochemistry and Biophysics. 235 (1):116-126.**

Winterbourn, C..1981. Produstion of hydroxyl radical from paraquat radicals and H₂O₂.
FEBS. 128(2):339-342.

Wright, S. 1978. Evolution and the genetics of populations, vol 4. Variability within and among natural populations. University of Chicago Press, Chicago.

Wolstenholme,D.R., 1992. Animal mitochondrial DNA: Structure and Evolution.
International Review of Cytology, vol 4. 141: 173-216.

Yoon, C.K; Aquadro, C.F., 1994. Mitochondrial DNA variation among the *Drosophila athabasca* semispecies and *Drosophila affinis*. **J. Heredity 85: 421-426.**

Yotoko, K.S.C., 1998. Caracterização da Variabilidade Genética da Mosca do Berne *Dermatobia hominis* (Diptera:Oestridae) Através da Técnica de RAPD-PCR. Tese de Mestrado. Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, SP. 69 pp.

Zeledón, R. & Silva,S.. 1987. Attempts to culture the parasitic stage of *Dermatobia hominis* in vitro. **Journal of Parasit. 73 (5): 907-909.**

Zumpt, F. 1965., Myiasis in Man and Animals in the Old World. Butterworths, London.

Zumpt, 1973. Diptera parasitic on vertebrates in Africa South of the Sahara and in South America, and their medical significance. Tropical Forest Ecosystems in Africa and South America. Smithsonian Institution Press. City of Wasshington.

Apêndice I

Anexo I: Valores de similaridade obtidos a partir de RAPD copilado de outros autores que realizaram estas medidas em outros insetos.

Autores	Espécie	Similaridade	Similaridade
		intrapopulacional	interpopulacional
Douwdy & McGaughy (1996)	<i>Plodia interpunctella</i> (lepidoptera)	Dice: 0,834 - 0,939	Dice: 0,589 - 0,809
Ballinger-Crabtree et al. (1992)	<i>Aedes aegypti</i> (Diptera)		Dice: 0,43 - 0,87 M: 0,68 - 0,86
Willians et al. (1993)	<i>Listronotus bonariensis</i> (Coleoptera)	Dice: 0,388 - 0,647	Dice: 0,238 - 0,634.
Pornkulwat et al. (1998)	<i>Oestrina nubilabis</i> (Lepidoptera)	Dice: 0,926 - 0,956)	Dice: 0,870 - 0,894
Sandoval et al. (1999)	<i>Dicrocoelium dendriticum</i> . (Trematoda)	J: 0,156 - 0,500	J: 0,047 - 0,565

Anexo II: Valores de Diversidade nucleotídica obtidos a partir de RFLP do mtDNA copilado de outros autores que realizaram estas medidas em outros dipteros.

Autores	Espécie	Diversidade Nucleotídica	Diversidade Nucleotídica
		interpopulacional	intrapopulacional
De Salle et al. (1987)	<i>Drosophila mercatorium</i>	0,0019 a 0,0400	
Roehrdanz & Johnson (1998)	<i>C. hominivorax</i>	0,001 a 0,027	
Conn et al. (1993)	<i>Anopheles.</i>	0,000 a 0,007	0,005 a 0,032