

BC/32797

IB/81047



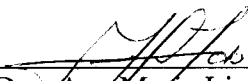
UNICAMP

T/UNICAMP

L566_a

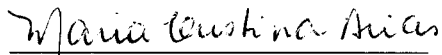
Defesa de Tese Realizada em 06/ 01 / 1998

BANCA EXAMINADORA



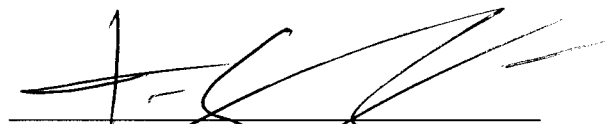
Profa. Dra. Ana Maria Lima de Azeredo Espin

DEPTO. GENÉTICA E EVOLUÇÃO/ INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP



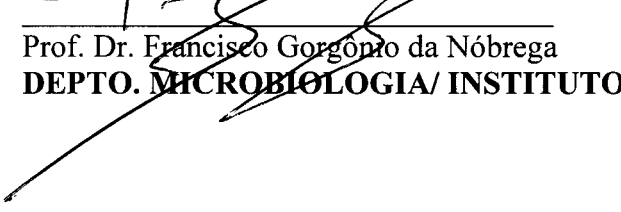
Profa. Dra. Maria Cristina Arias

DEPTO. BIOLOGIA/ INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS – USP



Prof. Dr. Francisco Gorgônio da Nóbrega

DEPTO. MICROBIOLOGIA/ INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS – USP



Dr. Marcelo Menossi Teixeira

CENTRO DE BIOL. MOL. E ENG. GENÉTICA – CBMEG - UNICAMP

SECRETARIA
DE
PÓS-GRADUAÇÃO
I. B.

ANA CLÁUDIA LESSINGER

ANÁLISE DO GENOMA MITOCONDRIAL DE DÍPTEROS CAUSADORES DE MIÍASES: ESTRUTURA, FUNÇÃO E PERSPECTIVAS FILOGENÉTICAS UTILIZANDO A REGIÃO CONTROLE

Este exemplar constitui a redação final
da tese de doutorado () candidato a)
Ana Cláudia Lessinger
e aprovada pela Comissão Julgadora
06/05/98

Tese apresentada para a obtenção
do título de MESTRE junto ao
Departamento de Genética e
Evolução do Instituto de Biologia
da Universidade Estadual de
Campinas.

ORIENTADORA: Profa.Dra. Ana Maria Lima de Azeredo-Espin

Campinas - S.P. 1998

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE	J.B
N.º CHAMADA:	UNICAMP
	L566a
V.	Ex.
TOMBO BC/	32191
PROC.	395/93
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	24/01/93
N.º CPDR	400105136-1

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

Lessinger, Ana Cláudia

L634a

Análise do genoma mitocondrial de dípteros causadores de miíases: estrutura, função e perspectivas filogenéticas utilizando a Região Controle / Ana Cláudia Lessinger . -- Campinas, SP: [s.n.], 1998.
110f.: ilus.

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

1. Filogenia. 2. Inseto. 3. Díptero-Aspectos geneticos. 4. DNA.
I. Azeredo-Espin, Ana Maria Lima de. II. Universidade Estadual de
Campinas.Instituto de Biologia. III. Título.

*A Família Lessinger,
Presença constante e fonte inesgotável de amor.
Pelo apoio incondicional, superando todas as
distâncias.*

*A minha mãe, Laura, por tão completamente
saber ser MÃE. Pelo colo seguro que acolhe e
conforta sempre as filhas. Por me ensinar a
descobrir o mundo com alegria desde o primeiro
instante.*

*A Júlia, por compartilhar angústias e alegrias,
por saber o que significa ser uma super-pessoa e
por nunca desistir de me entender.*

*A Alessandra, pelo seu entusiasmo em ouvir
minhas histórias. Por acreditar e incentivar sua
irmã mais velha em todos os momentos.*

*Ao meu pai, Egídio, por me ensinar a escolher
meus caminhos e a enfrentar com coragem e
bom humor os meus próprios Dragões, por se
emocionar com as minhas conquistas e por ser
sempre meu grande AMIGO.*

DEDICO.

*Ao Paulão,
que compreende minhas escolhas, sabendo ser
eternamente responsável por aquela que cativa.
Por me acompanhar nesta grande aventura.*

TENTAÇÃO

15/10/1997

TENTO HORAS SEMPRE E TANTO
MAS SÃO TANTAS HORAS E TANTOS TENTOS
QUE ME DESCONTENTO E TANTO FAZ,
SE FEZ, SE DIZ, SE QUIS
SER SEMPRE TÃO FELIZ...
MAS TANTO QUANTO POSSA,
VOLTO A VER-TE RICA ENFIM, ME ENCANTO:
GIRA, PISCA, GRITA E BRIGA!
VEM DE NOVO E TOME TENTO
E TENDE O TEMPO TODO E SEMPRE
E TERMINE O QUANTO ANTES POSSA
A ANGÚSTIA DO APRENDIZ SEDENTO
QUE DECIFRA A BIO-HISTÓRIA ESCRITA
COM SEMPRE AS MESMAS QUATRO TENTATIVAS QUE
SÓ A VIDA, FAISCANTE CHAMA, PRODUZ.

AGRADECIMENTOS

A Prof. Dra. Ana Maria Lima de Azeredo Espin, pela oportunidade de desenvolver meu mestrado em seu laboratório, por sua especial contribuição na minha formação acadêmica e pessoal, incentivando sempre a integração, a criatividade e a intuição do aprendiz.

A Prof. Dra. Maria Cristina Arias, por sua amizade e entusiasmo espontâneos, por sua contribuição neste trabalho e pela sinceridade e paciência tão oportunos durante o fervilhar de dúvidas e idéias aceleradas.

Ao Prof. Dr. Francisco Gorgônio da Nóbrega, pelos oportunos comentários e sugestões durante a leitura da tese.

Ao Dr. Marcelo Menossi, por sua disposição singular e participação crítica e entusiasmada na leitura da tese. Por também estar sempre acessível para explicar para o computador que ele tem que funcionar às vezes...

A Juliana Silveira do Valle, por tudo o que representa uma amizade, por evoluirmos juntas no mundo acadêmico e pessoal desde os idos anos da graduação. Por exercitar uma sintonia única, que caracteriza tão bem a associação “Julianacláudia”.

A Maria Elena Infante-Malachias, por contribuir efetivamente na minha formação, sendo uma amiga constante e presente desde as minhas investidas de iniciação científica até meus projetos mais viajantes.

Aos Amigos do Laboratório de Genética Animal, Karla, Sílvia, Ana Carolina, Patrick e Taíla, por proporcionarem um ambiente de ricas discussões acadêmicas, científicas e culturais, além da integração pessoal e da amizade que propiciaram apoio às dificuldades enfrentadas.

Aos colegas do Laboratório de Milho, nossos vizinhos, Raquel, Míriam, Marcos, Rafael, Veridiana, e Prof. Dra. Laudénir Prioli, pelos momentos de descontração e pelos inúmeros auxílios prestados durante a elaboração deste trabalho.

Aos Amigos do CBMEG, do Laboratório de Microorganismos, de Plantas, da Genética Humana e de Vírus, *especialmente* Edmilson, Sandrinha e Germano por sua espontaneidade em me auxiliar no contato com o mundo mágico dos microorganismos e suas peculiaridades, durante minhas aventuras no campo da clonagem.

Aos Amigos da Turma 90 de Ciências Biológicas, Maria Alessandra, Maria Amélia, Lizandra, Valéria, Yuko, Luciano, Nonaka, Marques, Luizão, Luciana, Dani Porca, Crisona, Hélio, Cibele, Marília, *especialmente* Pan, Dante, Alexandre, Marissol, Heloísa, Jolney, Cláudio, Andrea, João, Renataço, Patrícia, Giovanna, Sibov, Lucília, Lee, Eneida, Rogério, Índia, pela amizade que renova as forças, pelo companheirismo em todos os momentos.

Aos Amigos de Brasília, da Galera do Break e do Coral Tanoshii Tori, Rosana, Low, Celso, Selene, Flávia, Celina, Vitor, Luís, Yuri, Cíntia, Julio, Eduardo-IB, Bat, Suzana, Juliana, Natacha, Paulo, Rodrigo, Plínio, Paola, Akira, Hanna, Ângela, Emi, Ilke, Pona, Milke, Darci, Laura, Takatsu, Vera e Cláudia, *especialmente* Fábio, Marcos, Edgard, Marie, Beth, Ligu, Cátia e Bantel, por me fazerem sentir tantas saudades e me aguardarem em todos os meus retornos, por estarem presentes em tantas aventuras.

Aos Amigos da República da D. Lúcia, Inácio, Hayiram, Elisângela, Cínthia, D. Lúcia. Pedro, Ricardo, Akira, Eduardo, Pira, Denise e Mauro, pelos momentos felizes que compartilhamos.

A minha querida Dinda, Orlandina da Costa, por seu carinho infinito e sua dedicação especial. Por cuidar da sua afilhada com tanto esmero. E torcer pelo meu sucesso sempre.

Ao José Eduardo Pandossio, por estar sempre presente, por se importar e por manter acesa esta amizade. Pelas felizes tardes no Caicó.

Ao Antônio Marcelo Azevedo Alexandre (Black), por apoiar a natureza ideológica do (bom) cientista e por me lembrar que fazer ciência é, mais do que nunca, uma aventura.

A Família Checchia, José Roberto, Julieta, Teresa Cristina e Vó Elvira, pelos tantos anos de convivência, amizade e carinho. Por sua compreensão e estímulo durante os momentos difíceis e por compartilhar as alegrias com entusiasmo.

A Família Sadi, Cecília, Abdelkader, Faris e Júlica, por tantos momentos alegres e pelo apoio familiar incondicional. Por me acolherem de braços abertos nesta cidade.

As Prof. Dra.s Yoko Bomura Rosato, Anete Pereira de Souza e Vera Solferini Nisaka, pela disposição e contribuição contínua durante minha formação acadêmica e, especialmente, pela participação efetiva no meu processo de qualificação do mestrado.

A Prof. Dra. Maria Edwiges Hoffmann, pela oportunidade da minha iniciação científica junto ao Laboratório de Cultura de Células no Departamento de Bioquímica da UNICAMP, e aos amigos Cláudia, Nádia e Daniel por colaborarem com meu aprendizado.

A Rosângela Aparecida Rodrigues, por me compreender nos momentos críticos, por sua dedicação ímpar e por sua solícita contribuição artística durante todo desenvolvimento deste trabalho. Por sua amizade e por manter sempre repleta a gaveta de suprimentos.

A Maria Salete do Couto Campos, por sua amizade e incentivo durante as crises. Por sua solidariedade e disposição para me ajudar sempre que necessário fosse.

Ao Mário Constantino Filho, pelo valioso auxílio durante as coletas de material no campo.

A Sandrinha, Tânia, Cláudia, Fabiana, Sílvia, Tereza e Célia, pela atenciosa prestatividade com que atenderam as minhas árduas solicitações do mestrado.

A todos os amigos e colegas que contribuíram para a realização deste trabalho e que não são mencionados aqui por questão de espaço, meu muito obrigada.

A Universidade Estadual de Campinas, local onde foi realizado este trabalho.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), pelo suporte financeiro para a realização deste trabalho.

RESUMO**ABSTRACT****INTRODUÇÃO**

A. SOBRE AS ESPÉCIES CAUSADORAS DE MIÍASES.....	01
B. ABORDAGEM GENÉTICA.....	04
1. O Genoma Mitocondrial Animal.....	04
2. Aplicações do DNA Mitocondrial como Marcador Molecular.....	04
3. Caracterização e Evolução do Genoma Mitocondrial Animal.....	07
4. Investigando a Região Controle de Replicação.....	14
5. OBJETIVOS.....	20
5.1. Objetivos Gerais.....	20
5.2. Objetivos Específicos.....	20

MATERIAIS E MÉTODOS

A. MATERIAIS.....	21
B. MÉTODOS.....	22
1. Manutenção dos indivíduos em laboratório.....	22
2. Análise Molecular do Genoma Mitocondrial.....	22
2.1. Extração de DNA.....	22
2.1.1. Extração Total de Ácidos Nucléicos (TNE).....	22
2.1.2. Extração de DNA Genômico através de Tiocianato de Guanidina (DNAzol™).....	23
2.2. Padronização da Amplificação de Sequências Específicas do DNA Mitocondrial.....	23
2.2.1. Regiões Amplificadas.....	23
2.2.2. Condições de Amplificação.....	24
2.3. Clonagem em Vetor Específico pMOSBlue.....	27
2.3.1. Vetor de Clonagem pMOSBlue (T-Vector).....	27
2.3.2. Reação de Ligação.....	28
2.3.3. Transformação em <i>Escherichia coli</i>	29
2.3.4. Seleção de Colônias Recombinantes.....	30
2.3.4.1. Minipreparação Plasmidial.....	30
2.3.4.2. Detecção do Inseto com Enzimas do Sítio de Policlonagem.....	31
2.3.4.3. Amplificação da Colônia com Primers Mitocondriais.....	31
2.4. Sequenciamento da Região Controle.....	32
2.4.1. Minipreparação Plasmidial para Sequenciamento.....	32
2.4.2. Reação de Sequenciamento Manual.....	34
2.4.3. Preparação do Gel de Poli(acrilamida) para Sequenciamento.....	34
2.5. Análise das Sequências Nucleotídicas.....	35

RESULTADOS

1. Padronização da Técnica de PCR.....	37
1.1. A Região Rica em A+T.....	37
1.2. Regiões Gênicas Codificadoras.....	40
2. Análise das Sequências Nucleotídicas.....	42
2.1. Análise da Composição Nucleotídica.....	46
2.2. Caracterizando a Variabilidade Genética da Região Controle.....	47
2.2.1 Investigando o Domínio A da Região Controle.....	52
3. Análises Filogenéticas a Partir da Região Controle.....	55
4. Análise da Formação de Estruturas Secundárias na Região Controle.....	59
4.1. Elementos de Sequência.....	59
4.2. Associação Entre Sequências Conservadas e Estruturas Secundárias.....	67

DISCUSSÃO

1. Acesso à Região Controle do Genoma Mitocondrial.....	70
2. Evolução de Sequências Genômicas Ricas em A+T.....	71
3. Evolução da Organização Estrutural da Região Controle.....	74
3.1. Domínios Estruturais.....	74
3.2. Sub-domínios Conservados em Sequência (CSB).....	75
3.3. Estruturas Secundárias do DNA Mitocondrial.....	77
4. Utilidade Filogenética da Região Controle do Genoma Mitocondrial.....	79

CONCLUSÕES.....	83
------------------------	-----------

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85
--	-----------

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

FIGURAS	página	TABELAS	página
Figura 1.....	09	Tabela 1.....	11
Figura 2.....	15	Tabela 2.....	17
Figura 3.....	25	Tabela 3.....	21
Figura 4.....	27	Tabela 4.....	26
Figura 5.....	39	Tabela 5.....	47
Figura 6.....	41	Tabela 6.....	51
Figura 7.....	43	Tabela 7.....	56
Figura 8.....	48	Tabela 8.....	56
Figura 9.....	54		
Figura 10.....	57		
Figura 11.....	58		
Figura 12.....	60		
Figura 13.....	61		
Figura 14.....	63		
Figura 15.....	64		
Figura 16.....	65		
Figura 17.....	66		
Figura 18.....	68		

INTRODUÇÃO

A. SOBRE AS ESPÉCIES CAUSADORAS DE MIÍASES

Segundo Zumpt (1965), miíase é a infestação de vertebrados vivos causada por larvas de dípteros que, pelo menos durante certo período, alimentam-se de tecidos vivos ou mortos do hospedeiro, de suas substâncias corporais líquidas ou do alimento por ele ingerido. Assim, as miíases primárias são provocadas por larvas que parasitam feridas recentes e, as secundárias por aquelas que atacam os tecidos já necrosados das feridas.

A família Calliphoridae inclui, geralmente, larvas de vida livre, que se alimentam de substâncias orgânicas em decomposição. Os adultos podem ser encontrados em locais diversos como depósitos de lixo, carcaças, esgotos, além de alimentos expostos em feiras livres e mercados, tornando-as importantes vetores do ponto de vista epidemiológico (Greenberg, 1973). Existem ainda, na família Calliphoridae, espécies cujas larvas são parasitas obrigatórios de tecidos vivos de mamíferos, provocando as chamadas miíases primárias (bicheiras) e grandes prejuízos econômicos, por ter como principais hospedeiros os animais domésticos, além de animais silvestres e a espécie humana.

Nas áreas tropicais e subtropicais das Américas existem seis gêneros de Calliphoridae. Dois deles, *Cochliomyia* e *Chrysomya*, apresentam espécies com ampla distribuição geográfica e comportamento sinantrópico, sendo consideradas de importância médica e sanitária por promoverem a disseminação mecânica de patógenos (Linhares, 1981). O gênero *Cochliomyia* é endêmico do continente americano e o gênero *Chrysomya* foi introduzido, sendo nativo das regiões tropicais e subtropicais do Velho Mundo.

A espécie *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel), mosca da bicheira, possui uma distribuição geográfica que abrange a América do Sul até as regiões norte da Argentina e do Chile (Guimaraes *et al.*, 1983); e a América Central, atingindo o Caribe e o México. É um ectoparasita de grande importância econômica, pois as fêmeas adultas depositam seus ovos diretamente em lesões recentes da pele do animal e as larvas se alimentam de tecidos vivos do hospedeiro e de suas substâncias corporais líquidas. Esta espécie é considerada uma das principais pragas da pecuária brasileira causando graves prejuízos econômicos por infestar principalmente animais domésticos, além de infestar animais silvestres e a espécie humana. Em 1966, esta espécie foi erradicada do sul do Estados Unidos através da técnica de macho estéril, SIT - “sterile insect technique” (Knipling, 1955). Ocorrências esporádicas e tentativas de recolonização vêm sendo continuamente monitoradas e controladas utilizando-se esta técnica

(Krafsur *et al.*, 1987). Em 1988, foi registrada a ocorrência de infestação por *C. hominivorax* na Líbia (Beesley, 1990; Gillman *et al.*, 1992).

Cochliomyia macellaria (Fabricius) ocorre desde a Argentina até o sul do Canadá sendo abundante nas regiões tropicais. As larvas da espécie são invasoras secundárias de ferimentos, contribuindo no desenvolvimento de miíases além de também poderem infestar carcaças em açougues e abatedouros. Após a introdução de quatro espécies exóticas do gênero *Chrysomya* no Brasil, esta espécie está sendo deslocada, se tornando rara nas áreas urbanas devido à competição interespecífica (Guimarães *et al.*, 1979; Ferreira, 1982; Baumgartner & Greenberg, 1984).

Chrysomya megacephala (Fabricius), *Chrysomya putoria* (Wiedemann) e *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) são espécies provenientes do Velho Mundo e consideradas espécies invasoras do Continente Americano. Foram registradas pela primeira vez no Brasil na década de 1970, no Paraná (Imbiriba *et al.*, 1977) e em São Paulo (Guimarães *et al.*, 1979). Estas espécies se estabeleceram na América do Sul, de onde se dispersaram rapidamente em todas as direções (Prado e Guimarães, 1982). Segundo Guimarães *et al.* (1978) e Guimarães (1984), estas espécies foram provavelmente introduzidas através de imigrantes angolanos que aportaram na costa sudoeste do país entre 1975 e 1976. Estas moscas se alimentam e se criam em fezes humanas e de animais, em carcaças e restos de alimentos (Greenberg, 1973). São consideradas importantes vetores de patógenos, como o poliovírus e *Salmonella* para a população humana que vive especialmente, em precárias condições sanitárias e nutricionais. Com relação a *C. megacephala*, foi verificado que as larvas podem causar, ainda que facultativamente, miíases traumáticas (Baumgartner & Greenberg, 1984). Registros de que esta espécie se estabeleceu no sul da Califórnia, e a coleta de um espécime no Texas, sugerem que *C. megacephala* pode estar expandindo sua distribuição rapidamente na América do Norte. Esta espécie é considerada uma das mais perigosas vetoras de bactérias entéricas, protozoários e helmintos (Greenberg, 1973).

O padrão de distribuição geográfica de *C. albiceps*, *C. putoria* e *C. megacephala* mostra que estas espécies se dispersaram ou foram transportadas por atividades humanas por todos os países da América do Sul (Mariluis, 1983; Peris, 1986; Baumgartner, 1988).

O gênero *Phaenicia* é amplamente distribuído, apesar de sua origem e distribuição ser predominantemente Paleártica e Etiópica (Aubertin, 1933; Zumpt, 1973). *Phaenicia eximia* (Robineau-Desvoidy) é uma espécie Neártica e Neotropical frequentemente encontrada em ambientes rurais, urbanos e de florestas no Brasil, Peru e Argentina (Ferreira 1978; Linhares 1981; Madeira *et al.* 1982; Baumgartner & Greenberg 1985; Mariluis *et al.* 1990) e em material orgânico em decomposição nos

Estados Unidos (Goddard & Lago 1985). Os adultos de *P. eximia* são atraídos por uma ampla gama de substratos para alimentação e reprodução, como lixo, carcaças e fezes humanas (Mendes & Linhares, 1993). No Brasil foram registrados apenas dois casos de miíase primária causada por *P. eximia*, o primeiro em gato *Felis domesticus* (Madeira *et al.*, 1989) e outro em *Canis familiaris* (Azeredo-Espin & Madeira, 1996). Prado & Guimarães (1982), sugerem que *P. eximia*, como outras espécies nativas de califorídeos está sendo deslocada por espécies invasoras de *Chrysomya spp.* em algumas áreas do Brasil Ferreira (1982) registrou um declínio de *P. eximia* de 17 para 8% do total de califorídeos coletados durante 3 anos em Goiânia, seguido do estabelecimento de *C. putoria*.

Dermatobia hominis (Linnaeus Jr.), Família Oestridae e Subfamília Cuterebrinae, conhecida no Brasil como a “mosca do berne” é um ectoparasita obrigatório causador de miíase primária do tipo furuncular. Esta espécie ocorre desde o norte do México até a Argentina (Sancho, 1988). Primariamente é habitante das florestas, abundante de matas primárias ou secundárias e plantações de Eucalyptus (Andrade, 1929). A mosca do berne é frequentemente confundida com outras espécies de dípteros devido ao seu mecanismo peculiar de oviposição, no qual os ovos são depositados sobre diferentes espécies de moscas vetores de hábitos zoófilos (Guimarães *et al.*, 1983). No homem as larvas causam miíases dérmicas, palpebrais, oftalmomiíases, rinomiíases, miíases cerebrais, tumores ilíacos, ocorrendo até casos fatais (Lane *et al.*, 1987).

D. hominis, assim como a mosca da bicheira, *C. hominivorax*, são consideradas pragas da pecuária na região Neotropical por infestar preferencialmente animais domésticos principalmente bovinos, causando grandes prejuízos econômicos na produção animal (Guimarães *et al.*, 1983). O couro torna-se desqualificado devido à presença de cicatrizes decorrentes das infestações, havendo também uma significativa redução na produção de leite e carne. Estas características citadas fazem com que estas espécies tenham uma grande importância econômica, médica e veterinária.

Devido às singularidades encontradas na biologia destas espécies, ao “status” adquirido como pragas da pecuária e/ou como vetores disseminadores de agentes patogênicos e especialmente, aos aspectos evolutivos das relações interespecíficas, estas espécies de moscas se tornaram um importante material de investigação científica tanto do ponto de vista acadêmico, como do ponto de vista aplicado da saúde pública e da pecuária.

B- ABORDAGEM GENÉTICA

1 - O Genoma Mitocondrial Animal

Os recentes avanços na genética, com a utilização de técnicas moleculares, ampliaram as perspectivas do estudo da biologia evolutiva e dos estudos sobre a organização e regulação de vários genomas. Vários são os métodos que podem ser utilizados para se detectar variabilidade genética em nível molecular envolvendo ácidos nucleicos (DNA e RNA) e proteínas. Uma das análises utilizadas se refere ao genoma mitocondrial (DNAm_t). No estudo do DNAm_t animal, duas abordagens principais podem ser destacadas: (1) o estudo da variabilidade genética deste genoma, com a identificação dos processos evolutivos intra e interespecíficos determinados através da análise de marcadores moleculares, permitindo o estabelecimento de relações filogenéticas entre as espécies e, (2) a identificação dos padrões de organização estrutural e funcional de genes e regiões gênicas específicas do DNAm_t, contribuindo para ampliar o quadro sobre a organização e regulação do genoma mitocondrial como um todo.

2 - Aplicações do DNAm_t como Marcador Molecular

Devido a sua organização simples e uniforme, ausência de recombinação, herança materna e taxa de substituição nucleotídica relativamente alta, a análise do DNAm_t passou a ser uma poderosa ferramenta para estudos de evolução molecular e relações filogenéticas entre as espécies (revisão em Simon *et al.*, 1994). Em *Drosophila*, alguns estudos têm demonstrado que as taxas de substituição nucleotídica para o genoma nuclear e mitocondrial parecem ser similares (Powell, 1986; Nigro, 1991; Moriyama, 1992). Apesar disso, devido ao reduzido número de mecanismos de variação disponíveis do genoma mitocondrial, sua evolução parece ocorrer de modo mais simples e direto do que no genoma nuclear; sendo portanto um modelo muito útil para se analisar a evolução molecular de uma espécie e/ou complexo de espécies relacionadas. Em invertebrados, principalmente insetos, vários autores (Clary & Wolstenholme, 1983; Fauron & Wolstenholme, 1980 α ; Moritz *et al.*, 1987; Crozier *et al.*, 1989; Harrison, 1989; Yoon & Aquadro, 1994; 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 as espécies da família Calliphoridae, a análise de marcadores moleculares no genoma mitocondrial tem contribuído para esclarecer os mecanismos evolutivos envolvidos na manutenção da variabilidade genética e tem se mostrado extremamente útil para avaliar a estrutura de populações destas espécies (Roehrdanz & Johnson, 1988; Roehrdanz, 1989; Azeredo-Espin, 1993; Azeredo-Espin & Madeira, 1996; Infante & Azeredo-Espin, 1995; Valle & Azeredo-Espin, 1995). Permite também, estabelecer padrões de identidade molecular específicos e inferências filogenéticas intra e interespecíficas através da análise de regiões informativas do DNAm de estas espécies (Goldenthal *et al.*, 1991; Sperling *et al.*, 1994; Stevens & Wall, 1997; Smith *et al.*, 1996; Taylor *et al.*, 1996; Lessinger & Azeredo-Espin, 1996 e 1997).

Para estudos sistemáticos, a evolução do DNA mitocondrial como um todo, apesar de interessante do ponto de vista teórico, não é tão informativa quanto a taxa de evolução de genes individuais ou posições nucleotídicas. Sítios que são úteis para relacionar espécies que divergiram recentemente, isto é, regiões intergênicas, regiões não codificadoras ou sítios de baixa restrição funcional, quase sempre experimentaram múltiplas substituições em comparação com espécies distantemente relacionadas e, estas regiões, devem ser utilizadas apenas na comparação entre espécies próximas (Simon *et al.*, 1994).

O estabelecimento de relações filogenéticas entre espécies se baseia no compartilhamento de sítios conservados em uma determinada sequência homóloga. Os sítios divergentes entre as sequências medem a distância filogenética entre os grupos. Caso a sequência apresente grande variabilidade, o alinhamento pode resultar em uma baixa divergência de sequência decorrente de eventos múltiplos de substituição nucleotídica experimentados por um mesmo sítio. Isto gera convergências que se confundem com homologies e são úteis apenas na construção filogenética para espécies de divergência recente (sub-espécies, espécies crípticas e gêneros). Entre os genes codificadores de proteínas, como as subunidades dos complexos NADH e das citocromo oxidase, existem diferentes níveis de conservação, sendo estes genes apropriados para estimar relações entre diversas categorias taxonômicas. Sequências altamente conservadas, como os genes ribossomais, apresentam poucos sítios divergentes e não favorecem a análise de grupos próximos, sendo úteis para relacionar taxons filogeneticamente mais distantes, em nível de classe ou filo (Kocher *et al.*, 1989; Kocher & White, 1989). De acordo com suas utilidades como marcadores genéticos, as regiões do DNAm que têm sido mais utilizadas em estudos evolutivos, correspondem aos genes para os rRNAs 12S e 16S, às subunidades I/II da citocromo oxidase c e o citocromo b, assim como à região controle. Além destes genes, outras regiões também

vêm despertando interesse, como as subunidades do complexo NADH e regiões intergênicas (Palumbi, 1996).

A técnica de amplificação do DNA pela enzima polimerase, do inglês “Polymerase Chain Reaction (PCR)” (descrita por Mullis, *et al.* 1986, 1987), é um método “in vitro” para a síntese de ácidos nucleicos, pelo qual um segmento particular de uma molécula de DNA pode ser replicado especificamente. O processo requer dois primers de oligonucleotídeos que flanqueiam o fragmento de DNA a ser amplificado, seguindo-se ciclos repetidos de desnaturação da molécula através de temperatura, anelamento dos primers às sequências complementares das fitas moldes, e extensão dos primers anelados pela ação da DNA polimerase. Estes primers hibridizam em fitas opostas da sequência-alvo e são orientados de modo que a síntese de DNA pela polimerase ocorra através da região entre os primers. Uma vez que os produtos da extensão são também complementares aos primers e capazes de ligá-los, sucessivos ciclos de amplificação essencialmente duplicam a quantidade de DNA sintetizada do ciclo anterior. O resultado é um acúmulo exponencial da sequência específica, aproximadamente 2^n onde n é o número de ciclos de amplificação processados.

A tecnologia de clonagem e sequenciamento desenvolveu-se rapidamente nas últimas duas décadas. Em sistemática, apesar da aplicação de dados de sequenciamento de ácidos nucleicos ser relativamente recente, seu poder de resolução fez com que esta metodologia fosse estabelecida como uma das abordagens moleculares mais empregadas para a inferência de relações filogenéticas.

A técnica de PCR associada ao sequenciamento, permite a obtenção rápida de sequências comparativas de DNA, podendo-se assim medir diferenças de sequências homólogas entre espécies de um modo mais direto do que através de análise eletroforética de isozimas, hibridização de ácidos nucleicos ou mapeamento de restrição de genomas nucleares e de organelas.

Uma das principais vantagens do PCR consiste em utilizar este método para a obtenção de sequências provenientes de amostras contendo quantidades mínimas de DNA, como tecidos preservados em álcool (Kocher *et al.*, 1989), espécies fósseis (DeSalle *et al.*, 1992 e 1994; Cano *et al.*, 1996) e espécimes preservados em museus e coleções entomológicas. O DNA extraído destas amostras, normalmente, é fragmentado (100 - 400 nucleotídeos), pouco abundante e apresentando amplos danos oxidativos (Pääbo *et al.*, 1988; 1989). Devido a grande parte do DNA destas amostras estar degradado, o PCR consiste no único método que pode ser aplicado para posterior sequenciamento sob estas condições. Assim, este método permite a recuperação direta de sequências de DNA antigo e degradado (aDNA), úteis para o estabelecimento de relações filogenéticas (Higuchi *et*

al., 1989; DeSalle *et al.*, 1992) e, promove o acesso aos níveis de variabilidade genética previamente experimentados por uma espécie, esclarecendo sua história evolutiva (Thomas *et al.*, 1990).

Recentemente, estudos utilizando vários taxons animais têm demonstrado que a análise do DNAm_t, via a amplificação de regiões específicas através do método de PCR e o sequenciamento de fragmentos informativos é um método sensível para detectar variabilidade genética entre grupos de espécies. Vários estudos têm utilizado sequências parciais ou completas de genes mitocondriais codificadores de proteínas para avaliar as taxas e padrões de evolução específicos (Crozier *et al.*, 1989; Szymura *et al.*, 1996; Lunt *et al.*, 1996). Em geral, estudos de sequência para estas subunidades gênicas têm contribuído para o estabelecimento de relações intra e interespecíficas em diversos grupos de insetos (Beckenbach *et al.*, 1993; Stern, 1994; Funk *et al.*, 1995; Arias & Sheppard, 1996; Ho *et al.*, 1995; Su *et al.*, 1996).

A análise de regiões específicas do DNAm_t em insetos vem acumulando dados sobre o potencial informativo das diferentes regiões gênicas. Estes estudos fornecem critérios relativos à utilidade filogenética de genes mitocondriais específicos de acordo com o grau de divergência requerido para resolver as relações de parentesco dentro do nível taxonômico analisado (revisão em Simon *et al.*, 1994).

Para um melhor entendimento dos processos evolutivos que determinam a dinâmica da molécula de DNAm_t, baseado na análise dos padrões de variação específicos para cada região gênica, torna-se importante uma compreensão dos padrões gerais de organização do genoma mitocondrial e sua diversidade.

3. Caracterização e Evolução do Genoma Mitocondrial Animal

O genoma mitocondrial em geral se apresenta com uma ampla diversidade em conteúdo e organização da informação genética quando são analisados os diferentes grupos de organismos que possuem genomas organelares (Gillham, 1994). A análise de sequenciamento completo para genomas mitocondriais indicaram uma enorme variação em tamanho, mas uma tendência à conservação em relação ao conteúdo gênico. Analisando os principais grupos de seres vivos, constatou-se que o genoma mitocondrial animal caracteriza-se por apresentar maior grau de conservação em conteúdo gênico. O genoma mitocondrial de fungos apresenta ampla variação em tamanho com longas regiões intergênicas e introns além de uma elevada composição em A+T quando comparado do DNAm_t animal. A análise do genoma mitocondrial vegetal tem

demonstrado que plantas superiores apresentam um dos maiores e mais complexos genomas organelares conhecidos (variando em tamanho de 208 a 2400kb), com a frequente ocorrência de recombinações genéticas entre inúmeras moléculas de DNAm heterogêneas em conteúdo. Embora as pesquisas tenham priorizado os genomas organelares de grupos filogeneticamente mais avançados, o estudo dos genomas mitocondriais de protistas e algas vêm despertando interesse acadêmico cada vez maior, uma vez que amplia os conceitos de diversidade quanto ao conteúdo gênico, introduzindo novas propostas para a organização da informação genética, fornecendo inclusive modelos intermediários envolvidos no processo de evolução do genoma organelar e da integração endossimbionte. Recentemente, com a caracterização do genoma mitocondrial do protozoário *Reclinomonas americana*, a conservação em conteúdo gênico do DNAm parece ainda representar um campo de investigação promissor (Lang, et al., 1997 e Palmer, 1997).

A caracterização do genoma mitocondrial animal tem contribuído para esclarecer os diferentes padrões de organização dentro deste grupo. O genoma mitocondrial animal ocorre normalmente na forma de uma molécula de DNA dupla-fita circular fechada, exceto para alguns cnidários e em *Tetrahymena*, onde foi observado na forma de uma ou duas moléculas lineares (Flavell & Jones, 1970; Arnberg *et al.*, 1975 e Bridge *et al.*, 1992). A molécula de DNAm 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 ou de transferência (tRNA), existindo ainda uma região não codificadora que contém a origem de replicação para a cadeia pesada do DNAm de vertebrados (Brown, 1985) e para ambas as cadeias em *Drosophila* (Clary & Wolstenholme, 1987), Figura 1.

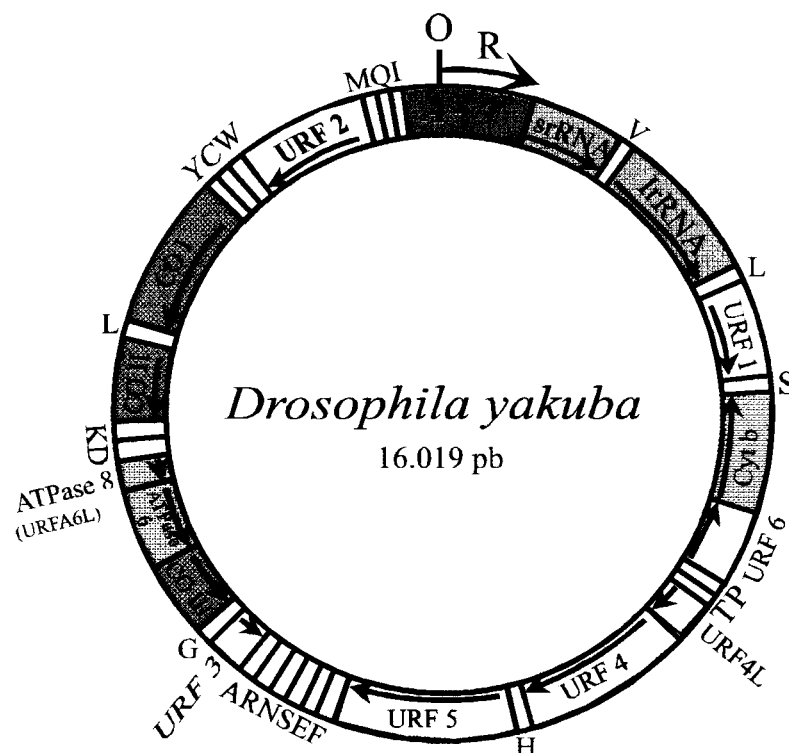


FIGURA 1 - Esquema da Organização e Conteúdo Gênico do DNAm de *D. yakuba* (Clary & Wolstenholme, 1985).

No DNAm humano inicialmente foram identificados 13 quadros de leitura aberta (ORFs: “Open Reading Frames”), sendo seis deles responsáveis por enzimas envolvidas no processo de fosforilação oxidativa: a citocromo b, as subunidades I a III da citocromo oxidase c, e as subunidades 6 e 8 do complexo ATPase. Os 7 quadros de leitura remanecentes, denominados URFs (URFs- “Unidentified” ou “Unassigned Reading Frames”), onde foram identificados sinais específicos para início e terminação de leitura para cadeias polipeptídicas, cujos produtos ainda não haviam sido identificados, foram designados URF1 a 6 e URF4L. Mais tarde, estes genes foram identificados como codificadores das subunidades do complexo da NADH desidrogenase da cadeia respiratória e desde então têm sido referidas como ND1-6 e ND4L (Chomyn *et al.*, 1985 e 1986).

Normalmente, as sequências dos genes mitocondriais e as regiões regulatórias são identificadas com base em alinhamentos com sequências mitocondriais descritas na literatura. As análises de ORFs potenciais e padrões estruturais também são parâmetros relevantes para a

determinação do conteúdo gênico. As sequências codificadoras estão localizadas estritamente adjacentes umas às outras ou até sobrepostas, não apresentando introns e, excluindo-se a região controle, apenas poucos nucleotídeos intergênicos foram encontrados dispersos pelo genoma mitocondrial. Tem sido sugerido que as estruturas secundárias dos tRNAs, entre pares de genes para proteínas adjacentes, sejam necessárias para sinalizar a clivagem precisa do transcrito primário policistrônico (Ojala *et al.*, 1981). Acredita-se que o DNAm animal tenha sido selecionado para se tornar cada vez mais compacto durante a história evolutiva dos animais. Tem sido descrito como um exemplo de extrema eficiência em estrutura genômica e função (Boyce *et al.*, 1989; Wolstenholme, 1992).

A molécula de DNAm de metazoários varia em tamanho entre 13 a 42 Kb para as espécies já estudadas (LaRoche *et al.*, 1990; Okimoto *et al.*, 1992). O DNAm humano foi o primeiro genoma mitocondrial a ser completamente sequenciado, analisado e interpretado quanto ao conteúdo genético (Anderson *et al.*, 1981 e 1982). Entre os invertebrados, *Drosophila yakuba* foi a primeira espécie a ter o genoma mitocondrial completamente sequenciado (Clary & Wolstenholme, 1985). Sequências disponíveis para invertebrados têm contribuído para a análise dos padrões gerais de evolução deste genoma neste importante grupo de organismos (Tabela 1).

Tabela 1. Descrição dos tamanhos dos genomas mitocondriais para espécies de artrópodes e outros invertebrados com as sequências completas disponíveis.

Espécies	Genoma mitocondrial*	Referência
Invertebrados: Artrópodes		
<i>Drosophila yakuba</i> ¹	16.019	Clary & Wolstenholme, 1985
<i>Anopheles quadrimaculatus</i> ¹	15.455	Mitchell <i>et al.</i> , 1993
<i>Anopheles gambiae</i> ¹	15.363	Beard <i>et al.</i> , 1993
<i>Apis mellifera</i> ²	16.343	Crozier & Crozier, 1993
<i>Artemia franciscana</i> ³	15.822	Valverde <i>et al.</i> , 1994
<i>Drosophila melanogaster</i> ¹	19.517	Lewis <i>et al.</i> , 1995
<i>Locusta migratoria</i> ⁴	15.722	Flook <i>et al.</i> , 1995
Invertebrados: Geral		
<i>Strongylocentrotus purpuratus</i> ⁵	15.650	Jacobs <i>et al.</i> , 1988
<i>Paracentrotus lividus</i> ⁵	15.697	Cantatore <i>et al.</i> , 1989
<i>Asterina pectinifera</i> ⁶	16.260	Asakawa <i>et al.</i> , 1991
<i>Caenorhabditis elegans</i> ⁷	13.794	Okimoto <i>et al.</i> , 1992
<i>Ascaris summi</i> ⁷	14.284	Okimoto <i>et al.</i> , 1992
<i>Katarina tunicata</i> ⁸	15.532	Boore & Brown, 1994
<i>Albinaria coerulea</i> ⁸	14.130	Hatzoglou <i>et al.</i> , 1995
<i>Lumbricus terrestris</i> ⁹	14.998	Boore & Brown, 1995
<i>Arbacia lixula</i> ⁵	15.719	De Giorgi <i>et al.</i> , 1996

* tamanho em pares de bases 1= Diptera, 2= Hymenoptera, 3= Crustacea, 4= Orthoptera, 5= ouriço-do-mar, 6= estrela-do-mar, 7= nematóides, 8= moluscos, e 9= anelídeo.

Estas observações sugerem que um tamanho de aproximadamente 14.000 nucleotídeos estaria próximo ao tamanho mínimo requerido para um genoma mitocondrial funcional em animais multicelulares. Não existe uma correlação estabelecida entre tamanho do genoma mitocondrial e grupos taxonômicos específicos. Apenas em *Drosophila*, dentro do grupo *melanogaster*, a análise de mapas de denaturação de moléculas de DNAm^t mostrou que a extensão no tamanho do genoma mitocondrial de diferentes espécies abrange um intervalo representado por um dos menores (15.700) e um dos maiores (19.500) genomas mitocondriais descritos (Wolstenholme *et al.*, 1983) em Diptera. Apesar disto, o tamanho do genoma mitocondrial geralmente é tido como um parâmetro relativamente conservado dentro de espécies e, às vezes, mesmo entre grupos taxonomicamente mais amplos.

Com o acúmulo progressivo de dados de sequenciamento para genomas mitocondriais de novas espécies de invertebrados, características incomuns vêm sendo descritas. Dentre estas, é interessante citar: a ausência de uma região não codificadora extensa em *A.coerulea* (Hatzoglou *et al.*, 1995); a ausência do gene ATPase 8 em nematóides e em *Mytilus edulis* (Hoffmann *et al.*,

1992, Okimoto *et al.*, 1992) e, constatada recentemente, a presença de introns no DNAm de anêmona *Metridium senile* (Beagley *et al.*, 1996).

Aparentemente, entre os insetos, um esquema organizacional comum é compartilhado no que concerne aos domínios protéicos, genes de RNAs ribossomais e região controle. Em Diptera, apesar da manutenção do conteúdo gênico, variações significativas têm sido observadas nas posições e orientações de certos tRNAs (Hsu Chen & Dubin, 1984; Xiong & Kocher, 1991; Pruess *et al.*, 1992 e Beard *et al.*, 1993).

Em se tratando da evolução da composição nucleotídica, uma correlação significativa entre a composição de bases no DNAm e sua evolução, parece ser que o conteúdo G+C mitocondrial entre invertebrados (21 - 43%) se apresenta mais baixo do que para vertebrados (37 - 50%). Existe no genoma mitocondrial de insetos um marcante desvio na composição nucleotídica caracterizado por uma elevada quantidade de bases A e T. O baixo conteúdo G+C do DNAm de *Drosophila* (25%, excluindo-se a região rica em A+T) parece representar uma solução alternativa, dos insetos, devido a um metabolismo tipicamente acelerado, exigindo uma elevada demanda energética. Uma alta demanda de energia gera mecanismos mais eficientes para o processo de replicação, que por sua vez, gera um desvio na composição nucleotídica a favor de uma molécula rica em A+T (Wolstenholme & Clary, 1985).

No genoma mitocondrial de *D. yakuba* e *D. melanogaster* o conteúdo A+T é de 78.6% e 82.2%, respectivamente (Clary & Wolstenholme, 1985; Lewis *et al.*, 1995). Em *A. gambiae* esta proporção é de 77.6%, *A. quadrimaculatus* apresenta composição similar de 77.4% e *L. migratoria* apresenta 75.3% de A+T, sendo considerado o menor valor de A+T descrito entre as sequências de DNAm já determinadas para insetos (Beard *et al.*, 1993; Mitchell *et al.*, 1993; Flook *et al.*, 1995). O genoma mitocondrial de *A. mellifera* apresenta o maior valor de composição nucleotídica a favor do desvio A+T, 84.9% (Crozier & Crozier, 1993). Estas evidências sugerem que esta característica esteja associada a um efeito de pressão de mutação direcional que ocorre no genoma mitocondrial de insetos (Jermiin, 1994 *a* e *b*). Esta situação é mais do que evidente na região não codificadora da molécula de DNAm composta em média por 86-96% de A+T para as espécies já estudadas (Zhang *et al.*, 1997).

Para outros grupos de invertebrados, diferentes padrões foram encontrados, mas sempre com uma tendência no sentido do acúmulo de bases AT. O DNAm de *L. terrestris* apresenta

61.6% de A+T, sendo um dos menores conteúdos AT descritos para invertebrados (Boore & Brown, 1995).

Eventos de substituição nucleotídica podem ser distinguidos em duas classes: transições e transversões. As transições ocorrem quando uma pirimidina é substituída por outra pirimidina ou uma purina por outra purina ($A \leftrightarrow G$ ou $C \leftrightarrow T$). As transversões resultam de um processo bioquímico mais elaborado, envolvendo a substituição de uma purina por uma pirimidina e vice-versa ($A \leftrightarrow C$, $A \leftrightarrow T$, $G \leftrightarrow T$ e $G \leftrightarrow C$). Transições ocorrem muito mais frequentemente durante a evolução de genomas mitocondriais do que transversões. Comparações entre haplótipos mitocondriais para várias espécies de *Drosophila* estudadas por DeSalle *et al.* (1987), indicam uma razão de transição/transversão de 16:1. Entretanto, em genomas muito ricos em A+T, uma tendência para substituições do tipo transições não é esperada, uma vez que o padrão de substituição mais comum varia entre alterações $A \rightarrow T$ e $T \rightarrow A$, o que caracteriza transversões. Estas sequências ricas em A+T, normalmente apresentam um estado de saturação de substituições nucleotídicas para a maioria dos sítios, devido às múltiplas substituições experimentadas por cada sítio. Neste caso as frequências de transição/transversão são similares ou favorecem o acúmulo de transversões.

Para *D. yakuba* foi observado que todas as diferentes regiões funcionais da molécula são ricas em A+T. Os 22 genes para tRNAs variam entre 66% (tRNA^{Ile}) a 91% (tRNA^{Asp} e tRNA^{Glu}) de A+T na sua constituição nucleotídica. Os genes para rRNAs 12S e 16S são 79 e 83% constituídos de bases A+T, respectivamente e a região controle apresenta 93% de nucleotídeos A+T (Clary & Wolstenholme, 1987). Esta constatação indica que uma composição rica em A+T pode estar sendo selecionada de acordo com a função.

Devido ao DNAm_t conter genes para RNAs ribossomais (rRNA), RNAs de transferência (tRNA), proteínas e funções regulatórias, ele proporciona um bom sistema no qual a evolução destas diferentes categorias gênicas pode ser investigada.

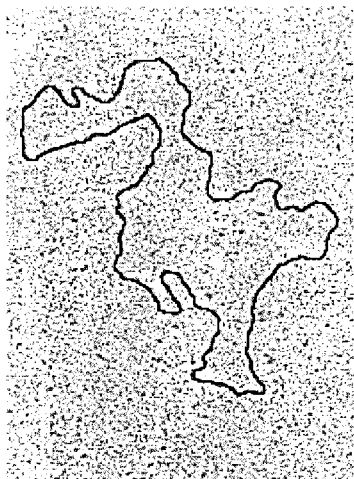
4. Investigando a Região Controle de Replicação

Nos vertebrados, a região controle de replicação do genoma mitocondrial normalmente contém uma estrutura proeminente, denominada D-loop, que é formada pela síntese de uma pequena sequência de DNA (DNA D-loop) que é complementar à cadeia leve (L) e desloca a cadeia pesada (H) nesta região (Clayton, 1982). O DNA D-loop parece servir como um primer para a síntese da cadeia nascente H e/ou pode servir como uma maneira de expor, por deslocamento, a sequência da cadeia H de modo que esta possa então ser reconhecida por uma molécula sequência-específica (uma RNA polimerase). Neste caso, o DNA D-loop age como uma sequência iniciadora de transcrição (Clayton, 1984 e 1991).

Em invertebrados, os primeiros estudos sobre origem de replicação do DNAm_t foram conduzidos em *Drosophila*. Inicialmente, foi demonstrado que aproximadamente 25% do DNA isolado de mitocôndrias de *D. melanogaster* apresentava uma baixa estabilidade térmica, desnaturando a temperaturas características de um elevado conteúdo de adeninas e timinas (A+T) (Bultman & Laird, 1973; Polan *et al.*, 1973; Peacock *et al.*, 1974). Posteriormente, foi observado através de microscopia eletrônica de moléculas parcialmente desnaturadas, que a maior parte deste DNA rico em A+T, ocorria em uma única região da molécula de DNAm_t (Figura 2). A este segmento com baixa estabilidade térmica foi dada a denominação de região rica em A+T (Fauron & Wolstenholme, 1976).

Goddard e Wolstenholme (1978) verificaram que o DNAm_t de *D. melanogaster* replica unidirecionalmente a partir de uma origem dentro da região A+T, que a direção da replicação seria através dos genes de rRNA (imediatamente adjacente à extremidade A+T) e que o sentido da replicação do DNA e da transcrição do rRNA eram idênticas. Estas conclusões foram estendidas para outras espécies de *Drosophila* (Goddard & Wolstenholme, 1980). Devido à origem de replicação localizar-se nesta região, entre os genes tRNA^{lle} e srRNA, ela é indicada como sendo o equivalente funcional da região controle do DNAm_t de vertebrados.

a.



b.

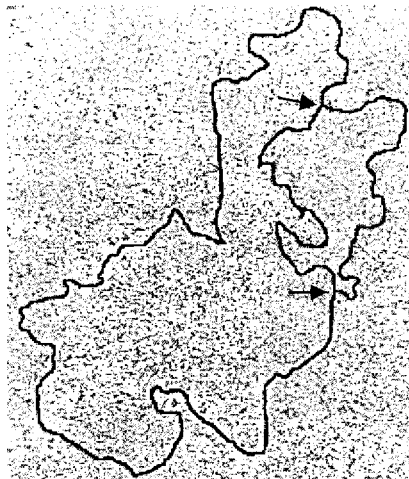


Figura 2- O genoma mitocondrial de *Drosophila melanogaster*. **a)** Molécula de DNAm_t dupla-fita nativa; **b)** Molécula de DNAm_t dupla-fita denaturada, evidenciando a região rica em A+T (entre setas). Wolstenholme *et al.*, 1983.

Outra conclusão baseada nos estudos conduzidos em *Drosophila*, diz respeito ao modo de replicação do DNAm^t que, neste gênero, parece diferir fundamentalmente do processo proposto para as espécies de vertebrados examinadas. Além da origem em uma única região A+T, a replicação do DNAm^t de *Drosophila* não procede via um mecanismo D-loop. Após extensas análises em microscopia eletrônica, pouca a nenhuma estrutura característica de D-loop pode ser identificada no DNAm^t (Rubenstein, 1977 e Wolstenholme *et al.*, 1979). Apesar disto, vários autores (Clary & Wolstenholme, 1987; Monforte *et al.*, 1993 e Lewis, 1994) têm comparado as sequências da região rica em A+T entre diversas espécies de *Drosophila*, constatando a existência de sequências conservadas que abrigam a origem de replicação do genoma mitocondrial proposta por Goddard & Wolstenholme (1980).

A variação em tamanho da região A+T foi verificada inicialmente através de experimentos que analisavam a formação de híbridos com pareamento estável entre moléculas de DNAm^t heterólogas, provenientes de diferentes espécies de *Drosophila*. Apesar dos experimentos de heteroduplex no DNAm^t formarem duplas fitas bem pareadas fora da região rica em A+T, entre todas as espécies de *Drosophila* analisadas, nenhuma formação pode ser observada dentro desta região, exceto entre as espécies mais próximas. Nestas, apenas 35% da região produziu pareamento suficientemente estável para a formação de duplex (Fauron & Wolstenholme, 1980a). Foi observada uma variação em tamanho de 1 - 5 kb nesta região entre as espécies de *Drosophila* estudadas (Fauron & Wolstenholme, 1976 e 1980 *a* e *b*).

Estes resultados indicam que eventos de inserção e deleção na região controle, rica em A+T, do DNAm^t de *Drosophila*, são amplos e frequentes, ocorrendo também uma rápida alteração na sequência nucleotídica primária nesta região. Em outros DNAm^ts de invertebrados, ocorrem regiões não codificadoras que variam de 121 nucleotídeos a 20 kb (Boyce *et al.*, 1989) e que foram designadas como potenciais regiões controle. Existem muitas vezes sequências repetidas diretas responsáveis pela variação em tamanho destas regiões controle. Quando estas sequências são repetidas e invertidas, interações intramoleculares podem dar origem a uma grande variedade de estruturas secundárias (Okimoto *et al.*, 1992). Eventos de expansão e contração de elementos de sequência repetidos também foram descritos no DNAm^t de *Drosophila* e parecem estar envolvidos nesta heterogeneidade em tamanho (Lewis, 1994).

Dados de sequenciamento para região rica em A+T têm se tornado disponíveis em várias espécies de *Drosophila* (Clary & Wolstenholme, 1985, 1987; Monnerot, 1990, Lewis *et al.*, 1995;

Inohira *et al.*, 1997) e em outros grupos de insetos, incluindo representantes das ordens Hymenoptera (Crozier & Crozier, 1993), Diptera (Beard *et al.*, 1993; Mitchell *et al.*, 1993; Caccone *et al.*, 1996 a), Orthoptera (Rand *et al.*, 1989; Flook *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1995) e Lepidoptera (Taylor *et al.*, 1993). Estes estudos tornaram possível a compilação de dados comparativos entre sequências da região controle de insetos.

É interessante notar que o genoma nuclear codifica todas as proteínas indispensáveis para a replicação e transcrição do genoma mitocondrial. A região controle fornece os principais sítios de interação entre os genomas nuclear e mitocondrial. Apesar de desempenhar uma função essencial para a molécula de DNAm e para a própria mitocôndria, a região controle é responsável pela maior parte da variação do genoma mitocondrial animal tanto em tamanho (Tabela 2) quanto em sequência.

Tabela 2. Variação em tamanho da região A+T entre diferentes espécies de insetos cujas sequências já foram determinadas.

Espécies	Região A+T*	Genoma mitocondrial*	Referências
<i>D. yakuba</i>	1.077	16.019	Clary & Wolstenholme, 1987
<i>D. melanogaster</i>	4.601	19.517	Lewis <i>et al.</i> , 1994
<i>A. mellifera</i>	835	16.343	Crozier & Crozier, 1993
<i>A. quadrimaculatus</i>	625	15.455	Mitchell <i>et al.</i> , 1993
<i>A. gambiae</i>	826	15.363	Beard <i>et al.</i> , 1993
<i>L. migratoria</i>	875	15.722	Flook <i>et al.</i> , 1995
<i>S. gregaria</i> ¹	752	-	Zhang <i>et al.</i> , 1995
<i>C. parallelus</i> ²	1.512	-	Zhang <i>et al.</i> , 1995

*tamanho em pares de base. 1= *Schistocerca gregaria* e 2= *Chorthippus parallelus* (Orthoptera).

Em vertebrados, as regiões que contêm a origem de replicação do genoma mitocondrial têm sido bem estudadas (revisão em Clayton, 1982, 1984, 1991; Shadel & Clayton, 1993). Comparações entre estas sequências para diferentes espécies revelaram vários blocos de sequência conservada (CSB - “Conserved Sequence Blocks”) e estruturas secundárias fortemente associadas à origem de replicação (Brown *et al.*, 1986; Walberg & Clayton, 1981; Saccone *et al.*, 1991).

Entretanto, para invertebrados existe pouca informação disponível sobre as possíveis sequências regulatórias da região controle do genoma mitocondrial, sendo os registros mais abundantes inicialmente obtidos para *Drosophila*. Mais recentemente, a organização estrutural da região controle, também foi caracterizada para 2 gêneros em Orthoptera (Zhang *et al.*, 1995). Foram ainda obtidas as sequências para região controle de espécies do complexo *A. gambiae* (Caccone *et al.*, 1996 b). Neste caso, a região controle foi determinada com o objetivo de auxiliar na resolução filogenética dentro deste intrincado grupo, mais do que para entender os padrões de organização desta região.

Com a crescente disponibilidade de dados de sequenciamento para a região A+T de insetos, principalmente envolvendo espécies de dípteros, pode-se estabelecer um quadro mais completo sobre a estrutura, função e evolução desta região.

Zhang *et al.* (1995), analisando o padrão estrutural da região A+T em duas espécies de Orthoptera, propôs que as regiões controle em insetos poderiam ser classificadas em duas categorias. Um tipo que pode ser representado pelo padrão descrito para as espécies de *Drosophila*, onde foram observados dois domínios distintos dentro da região A+T (Monnerot *et al.*, 1990). Neste grupo existe um domínio adjacente ao gene tRNA^{lle} que se mostra altamente conservado entre as espécies e contém uma possível origem de replicação. O domínio variável inclui o restante da região que apresenta variação tanto em sequência nucleotídica quanto em tamanho. Repetições em tandem foram observadas em ambos os domínios (Solignac *et al.*, 1986; Lewis *et al.*, 1994). O segundo tipo inclui as sequências descritas em 3 espécies de Orthoptera, 8 espécies de Lepidoptera e para 2 espécies do gênero *Anopheles*. Diferentemente do primeiro grupo, a região controle, neste caso, não apresenta domínios específicos que possam ser identificados unicamente como variáveis ou conservados (Mitchell *et al.*, 1993; Taylor *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 1995; Flook *et al.*, 1995; Caccone *et al.*, 1996). Aqui também foi registrada a ocorrência de repetições em tandem.

Acredita-se que o domínio conservado da região A+T de *Drosophila* seria constituído de elementos estruturais conservados com distribuição limitada ao próprio domínio, lembrando o padrão de organização geral encontrada para as regiões controle do segundo tipo. Esta análise, indica a relação de homologia entre ambas as categorias descritas para insetos (Zhang *et al.*, 1997).

A conservação destas estruturas na região controle, mais do que a sequência nucleotídica primária, parece refletir na sua importância funcional entre ordens de insetos filogeneticamente distintos. Dentre os elementos estruturais descritos para a região A+T, foram observadas sequências com séries de homopolímeros, poli-A, poli-T e poli-G; séries de sequências ricas em G+C; repetições TA consecutivas; estruturas em grampo; sequências palindrômicas; alças com sequências ricas em timina e sequências formadoras de estruturas secundárias (Lewis *et al.*, 1994; Beard *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1995; Flook *et al.*, 1995).

Entretanto, ainda há necessidade de mais informações, tanto em nível de sequência primária quanto em relação ao potencial estrutural destas sequências, para outros grupos animais antes que sejam esclarecidos os mecanismos envolvidos na evolução da região controle de replicação do DNAmt de insetos.

É importante ressaltar ainda que, inicialmente, a região controle foi indicada como detentora da variabilidade do genoma mitocondrial animal e, potencialmente capaz de promover resolução filogenética entre grupos onde a caracterização genética se mostrava inacessível. A região controle de vertebrados tem sido empregada com este objetivo e confirmado sua utilidade para este tipo de análise. Nos invertebrados, principalmente insetos, a hipervariabilidade da região A+T tem resultado em baixa resolução filogenética devido ao excesso de homoplasias, restringindo o acesso aos sítios informativos. Entretanto, a partir da caracterização da região controle em insetos, novas abordagens sobre a dinâmica evolutiva, associada a estrutura e função das sequências regulatórias do genoma mitocondrial podem ser investigadas.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivos Gerais

Este trabalho pretende ampliar o conhecimento sobre o genoma mitocondrial de espécies de Calliphoridae e Oestridae, através do emprego de técnicas de biologia molecular para a análise de regiões específicas. O principal objetivo consiste na caracterização da região controle, ou região rica em A+T, para determinar o seu potencial informativo no estabelecimento de relações filogenéticas interespecíficas, assim como a sua possível contribuição como modelo de organização estrutural dos elementos regulatórios que compõe o sistema de replicação deste genoma. Esta abordagem se mostra extremamente importante devido a pouca informação disponível sobre os mecanismos de replicação da molécula de DNAm para outras espécies de dípteros, além dos estudos desenvolvidos em *Drosophila*.

Através da caracterização preliminar de outras regiões específicas do genoma mitocondrial, rRNA 12S e 16S, CO I/II, citocromo b e o gene de ND2, pretende-se, ainda, inferir sobre a conservação do conteúdo gênico em organização e tamanho, a utilização de primers universais e a possibilidade de acesso à informação genética do aDNA (neste trabalho, este termo indica espécimes preservados por mais de 10 anos) para as espécies de moscas causadoras de miíases; *Cochliomyia hominivorax*, *Cochliomyia macellaria*, *Chrysomya megacephala*, *Phaenicia eximia* e *Dermatobia hominis*.

5.2. Objetivos Específicos

1. Padronização das condições de PCR para a análise de regiões específicas do DNAm
2. Análise comparativa intra e interespecífica dos produtos de PCR obtidos para estas espécies.
3. Recuperação da informação genética de espécimes preservados em coleções entomológicas.
4. Obtenção de marcadores genéticos através de PCR.
5. Clonagem de regiões informativas do genoma mitocondrial.
6. Sequenciamento da região controle de replicação.
7. Caracterização estrutural da região controle destas espécies.
8. Análise da composição nucleotídica da região controle destas espécies.
9. Inferências filogenéticas através da análise de sequências completas e parciais da região controle.

MATERIAIS E MÉTODOS

A. MATERIAIS

Neste trabalho foram utilizados os estágios de pupas ou adultos de amostras conservadas em freezer a -70°C de populações de cinco espécies de moscas causadoras de miíases, provenientes de diferentes localidades e regiões geográficas do Brasil, descritas na Tabela 3.

Tabela 3. Identificação dos indivíduos utilizados nas análises experimentais. * Os números 1, 2, 3 e 4 indicam indivíduos provenientes de coletas realizadas em diferentes estações do ano em uma mesma localidade, caracterizando populações sazonais.

Espécies	Localidades
<i>Cochliomyia hominivorax</i>	Alfenas - M. G. Botucatu - S. P. Caraguatatuba* (1, 2, 3 e 4) - S. P. Manaus - A. M. Morro do Chapéu - B. A.
<i>Cochliomyia macellaria</i>	Porto Urucu - A. M.
<i>Chrysomya megacephala</i>	Adamantina - S. P.
<i>Phaenicia eximia</i>	Botucatu - S. P. Campinas - S. P.
<i>Dermatobia hominis</i>	Alfenas - M. G.

Para as análises de sequenciamento, apenas um indivíduo de cada espécie foi utilizado como amostra.

Espécimes de *C. hominivorax* e *P. eximia* provenientes de coleções entomológicas (etanol 70% e adulto “seco”, respectivamente) também foram utilizados nas análises de PCR.

A linhagem DH5 α de *Escherichia coli* foi utilizada para os experimentos de transformação bacteriana.

B. MÉTODOS

1. Manutenção dos indivíduos em laboratório:

As populações das espécies *C. hominivorax* e *C. macellaria* foram mantidas em laboratório conforme metodologia descrita por Azeredo Espin (1987). Para a extração de DNA total, os indivíduos na fase de pupa e/ou adulto foram congelados em freezer -70°C ou em nitrogênio líquido devidamente guardados em frascos de vidro e identificados por localidade, data da coleta e hospedeiro, com exceção de um espécime de *C. hominivorax* fixado em etanol 70% e de um indivíduo de *P. eximia* proveniente de coleção entomológica.

2 Análise Molecular do Genoma Mitocondrial:

Para análise do DNA mitocondrial foram empregadas diferentes técnicas descritas a seguir:

2.1. Extração de DNA

2.1.1 Extração total de ácidos nucleicos (TNE)

Os indivíduos na fase de larva, pupa e/ou adulto foram separados em 8 tubos corex siliconizados de 15 ml contendo 1 ml de tampão de homogenização (10 mM Tris, 60 mM NaCl, 300 mM Sacarose e 10 mM EDTA) pH 7.5. Cada indivíduo foi homogenizado com ajuda de um macerador, em 1 ml de tampão de lise (300 mM Tris, 40 mM SDS, 20 mM EDTA e 0.7% do volume de DEPC), seguido de incubação no gelo por 15 minutos. Em seguida foram adicionados a cada tubo 2 ml de fenol equilibrado em tampão Tris pH 8.0 (Sambrook, 1989), e em seguida centrifugados a 4°C por 10 minutos a 3000 g sendo o sobrenadante transferido para um novo tubo corex 15 ml. Foram adicionados volume iguais de fenol e clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). Cada tubo foi centrifugado novamente por 10 minutos a 3000 g e o sobrenadante transferido para um novo tubo, onde foram adicionados 2 ml de clorofórmio: álcool isoamílico e novamente centrifugados como descrito. Ao sobrenadante final foi adicionado 1.5 ml de TE (1.0 mM Tris-HCl 7.4 e 0.1 mM EDTA pH 8.0), 150 µl de NaOAc 3M e 9 ml de Etanol absoluto a -20°C, seguindo-se a incubação por 45 minutos a -70°C. Após a incubação, os tubos foram centrifugados a 11.000 g por 45 minutos a 4°C, e o “pellet” ressuspensionado em 1 ml de TE, 50 ml de NaOAc e 2.75 ml de etanol absoluto -20°C e precipitado novamente por 45 minutos em -70°C. Após a centrifugação, novamente a 11.000 g, o “pellet” de DNA foi ressuspensionado em 200 µl de TE e mantido em tubos eppendorf a -20°C para análise posterior via

PCR. A medida por quantificação em gel da quantidade de DNA extraído define uma TNE padrão com aproximadamente 700 ng/μl de DNA total.

2.1.2 Extração de DNA Genômico através de Tiocianato de Guanidina (DNAzol™)

Os indivíduos adultos foram separados em tubos eppendorf de 1.5 ml contendo 1 ml do reagente DNAzol (GIBCO-BRL). Cada indivíduo foi homogenizado com ajuda de um macerador para tubo Eppendorf e, em seguida, centrifugado em microcentrífuga por 10 minutos a 10.000 rpm à temperatura ambiente sendo o sobrenadante transferido para um novo tubo eppendorf. Foram então adicionados 0.5 ml de Etanol 100% gelado e cada amostra foi misturada por inversão e incubada por 3 minutos à temperatura ambiente. Cada tubo foi centrifugado novamente por 2 minutos a 12.000 rpm em microcentrífuga à temperatura ambiente. Após a centrifugação o “pellet” de DNA foi lavado com 1.0 ml de Etanol 70%, seguindo-se uma última centrifugação por 1 minuto a 10.000 rpm. O “pellet” foi então ressuspendido em 150 μl de TE e mantido a -20°C para análise posterior via PCR.

2.2. Padronização da amplificação de sequências específicas do DNA mitocondrial

2.2.1 Regiões amplificadas

As regiões amplificadas para todas as espécies analisadas incluem a região rica em A+T, os genes da Citocromo Oxidase subunidades I e II (COI/II), o gene da Citocromo Oxidase b (Cit.b), o gene da NADH2 (ND2) e os genes de RNA ribossomais 12S e 16S.

A análise dos produtos do PCR foi realizada através de corrida eletroforética em gel de agarose 1% em tampão 1X TAE (40mM Tris-acetato e 1mM EDTA pH 8.0) à voltagem de 80 volts por aproximadamente 1 hora, corado com Brometo de Etídio (EtBr), analisado em luz U.V. (Midrange/300nm) e fotografado em sistema de câmara instantâneo Polaroid MP4⁺ e filme Polaroid 667. Os tamanhos dos fragmentos amplificados foram estimados por comparação com os marcadores (φX174/HaeIII e 1kb DNA Ladder) através da utilização do programa ELETRO (Plikaytis *et al.*, 1986).

2.2.2. Condições de amplificação

Para definir os parâmetros mais relevantes influenciando a especificidade das reações, um amplo espectro de reações, incluindo diferentes concentrações dos reagentes de PCR, foi testado durante a padronização das condições da reação de PCR para as espécies analisadas (Erlich, 1989 e Innis *et al.*, 1990). Como controle das condições da reação de PCR e para garantir a análise precisa dos resultados, foram sempre incluídas reações de PCR sem DNA em todas as amplificações realizadas. Foram testadas concentrações de Cloreto de magnésio ($MgCl_2$) que variaram de 0.25 mM até 2.5 mM. A concentração de cada primer variou de 0.15 mM até 1.0 mM por reação e a concentração de dinucleotídeo trifosfato (dNTPs) foi mantida em 0.2 mM na reação de amplificação. A quantidade de amostra de DNA utilizada na reação de amplificação variou de 2.0 µl até 0.01 µl de uma TNE padrão. Para padronizar a reação de reamplificação de um produto de PCR, a quantidade de DNA apropriada para esta reação, foi testada desde 0.5 µl até 0.25 µl de uma diluição 1:50 do produto amplificado anteriormente. Foi utilizada a concentração de 1X de tampão de reação da GIBCO/BRL (tampão 10X com 200 mM de Tris-HCl pH 8.4 e 500 mM KCl) na reação de PCR. As reações foram preparadas para um volume final que variou entre 25 µl e 100 µl durante a padronização.

Os primers utilizados neste trabalho foram selecionados a partir de um conjunto de primers mitocondriais previamente caracterizados em Simon *et al.* (1994), denominado UBC Insect Mitochondrial DNA Oligonucleotide Set, elaborado na Universidade de British Columbia, Canadá (Figura 3). O primer denominado 14.776 foi determinado em nosso laboratório, baseado nas sequências descritas para esta região em *Drosophila yakuba* e *Apis mellifera* (Clary & Wolstenholme, 1987; Crozier & Crozier, 1993).

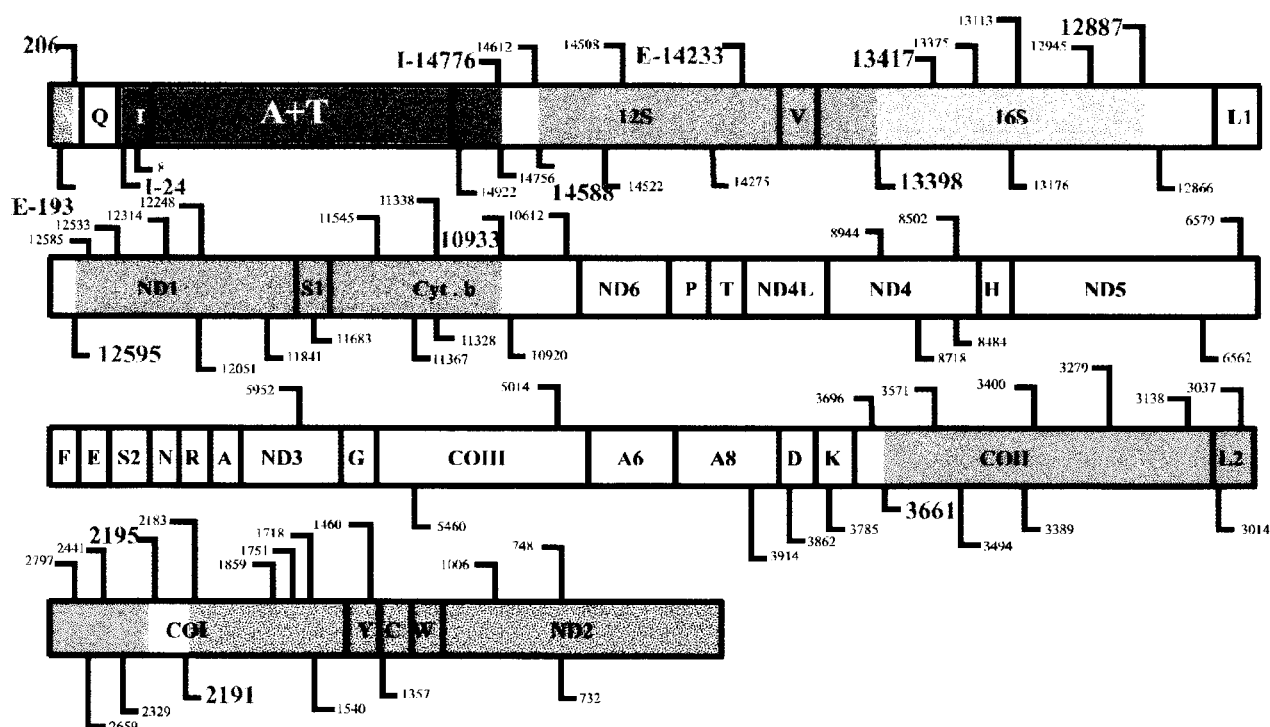


Figura 3 - Compilação dos primers descritos em Simon *et al.* (1994). Localização dos primers utilizados para a amplificação de regiões específicas do genoma mitocondrial evidenciando as regiões gênicas estudadas (E= externo, I= interno). A localização exata dos primers foi orientada de acordo com a sequência nucleotídica descrita para *D. yakuba* (Clary & Wolstenholme, 1987).

Para a amplificação específica da região controle do DNAm_t, foram utilizados dois conjuntos de primers com sequências dos tRNAs e srRNA adjacentes. Os dois primers externos, E-14233 e E-193 (figura 3, em vermelho), estão situados no gene rRNA 12S e na fita complementar do tRNA para metionina (tRNA^{Met}), respectivamente. Os primers internos, I-14776 e I-24 (figura 3, em vermelho) estão localizados no gene rRNA 12S e na fita complementar do gene de transferência de isoleucina (tRNA^{Ile}). Para as demais amplificações foram utilizados 2 primers para cada região, assinalados em azul na Figura 3 e descritos na Tabela 4.

Tabela 4. Descrição dos oligonucleotídeos utilizados na amplificação de regiões específicas do DNAm para as cinco espécies estudadas.

Regiões Amplificadas	Primer A	Primer B
Região A+T	5'-TGGGGTATGAACCCAGTAGC-3' (E-193) 5'-ATTTACCCTATCAAGGTAA-3' (I-24)	5'-AAGAGCGACGGGCGATGTGT-3' (E-14233) 5'-GCTGGCACGAATTTTGTG-3' (I-14776)
Citocromo Oxidase I/II	5'-CCACAAATTTCTGAACATTGAGC-3' (3661)	5'-TTGATTTTTTGGTCATCCAGAAGT-3' (2195)
rRNA 12S	5'-AAACTAGGATTAGATACCCTATTAT-3' (14588)	5'-ATGTTTTTGTAAACAGGCG-3' (13417)
rRNA 16S	5'-CGCCTGTTTAACAAAAACAT-3' (13398)	5'-CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3' (12887)
Citocromo b	5'-GTAGCATTTTTAACTTTATTAGAACG-3' (12595)	5'-TATGTACTACCATGAGGACAAATATC-3' (10933)
NADH2	5'-GCTAAATAAGCTAACAGGTTTCAT-3' (2191)	5'-CCCGGTAAAATTAAATATAAACTTC-3' (206)

Da mesma forma foram padronizadas as temperaturas e os intervalos de reação programados no termociclador para promover a otimização da reação de amplificação. Para a região A+T foram testados programas de PCR incluindo 5 ciclos iniciais onde a etapa de desnaturação foi de 30 segundos a 94°C, o anelamento dos primers foi a 37°C por 1 minuto e a elongação a 60°C durante 2 minutos. A seguir foram programados mais 35 ciclos na mesma condição de desnaturação, o anelamento dos primers durou 1 minuto e as temperaturas testadas nesta etapa variaram de 42°C a 58°C. A temperatura de elongação variou de 60°C a 72°C, finalizando a reação num último ciclo com elongação de 7 a 10 minutos. As reações de reamplificação desenvolvidas para a região A+T também foram padronizadas dentro das condições descritas acima.

Para as regiões conservadas, 12S, 16S, COI/II, Cit.b e ND2, foram usados programas desenvolvendo um ciclo inicial de desnaturação por 3 minutos a 94°C, seguido de 34 ciclos completos com 1 minuto de desnaturação a 94°C. O anelamento variou dentro do intervalo de 42°C até 55°C por 1 minuto e 15 segundos durante a padronização destas temperaturas, seguindo-se, por último, um período de elongação pela *Taq* DNA polimerase que variou entre 60°C e 72°C por 2 minutos de acordo com as propriedades termo-estáveis específicas de cada região. Para finalizar, seguiu-se um ciclo mantendo as mesmas condições, exceto pela adição de período de elongação de 7 a 10 minutos.

2.3. Clonagem em vetor específico pMosBlue

2.3.1. Vetor de clonagem pMosBlue (T-vector)

O sistema pMosBlue da Amersham foi utilizado para a clonagem direta de produtos de PCR (Figura 4). Esta metodologia de clonagem é baseada na atividade de polimerases termo-estáveis que adicionam preferencialmente uma adenosina extra nas extremidades 3' da dupla fita do DNA amplificado, independente da informação na fita-molde. Isto favorece a inserção de produtos de PCR gerados pela enzima em vetores de clonagem linearizados e com extremidades 3' exibindo timidina (Holton, 1990 e Marchuk, 1990).

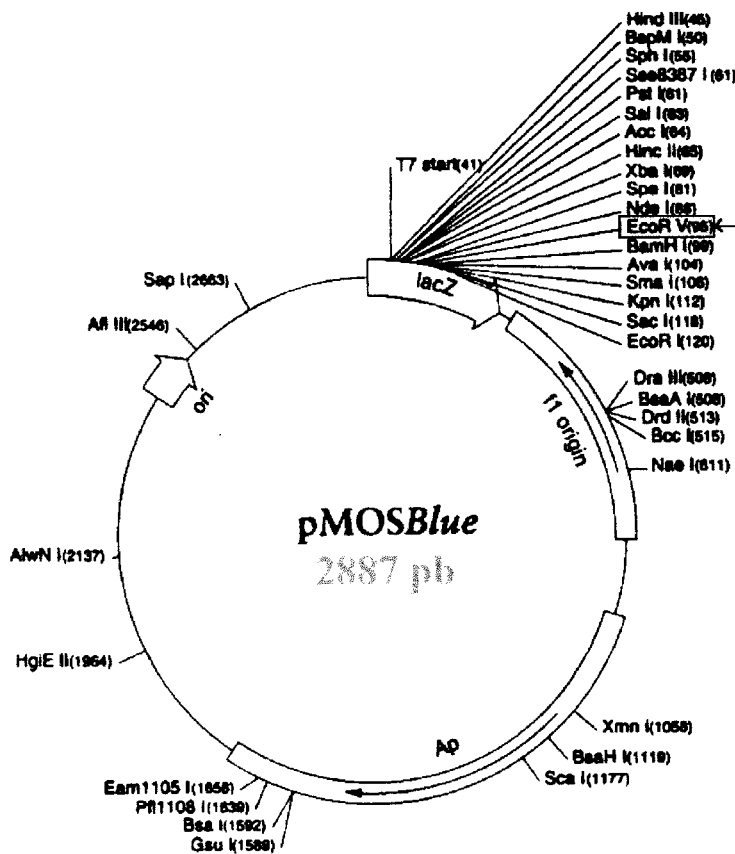


Figura 4 - Mapa do vetor de clonagem pMOSBlue. O sítio de clonagem do plasmídeo linearizado com extremidades contendo o nucleotídeo timina (T) protuberante interno à sequência reconhecida pela enzima de restrição *EcoRI*, indicada com uma seta.

2.3.2. Reação de ligação

Durante a preparação do inserto foram testados diferentes protocolos de purificação com o objetivo de aumentar a eficiência de clonagem do produto amplificado, especialmente a reação de ligação do inserto ao vetor específico. Estes métodos foram empregados para remover especificamente a DNA polimerase residual e os produtos inespecíficos gerados durante a reação de amplificação, além de possíveis concentrações inibitórias de outros elementos presentes no tampão de PCR que potencialmente afetam a atividade enzimática da ligase. Foram testados diferentes sistemas de purificação baseados no isolamento do produto de PCR em gel de agarose para posterior purificação através da ligação do DNA a uma matriz de sílica. A purificação de bandas específicas de PCR foi feita através do método GENECLAN (BIO 101 *Inc.*) seguindo as especificações do fabricante. Outro método testado para purificação do produto de PCR através do isolamento de bandas diretamente do gel de agarose foi o sistema Prep-A-Gene (BIO-RAD) seguindo-se as especificações do fabricante. Amostras do produto amplificado foram também retiradas diretamente da reação de PCR e dialisadas através da aplicação de 10 µl da reação em filtro Millipore VM 0.05 µM em contato com tampão de eluição TE 1X pH 7.4 (10mM Tris-Cl pH 7.4 e 1mM EDTA, pH 8.0), durante 20 minutos e usadas posteriormente na reação de ligação ao vetor pMos*Blue*.

A concentração do inserto foi estimada através da comparação com o marcador de peso molecular λ (5 ng/µl), mediante visualização do gel de agarose 0.8%, corado com Brometo de Etídio e analisado através de transiluminador de ultra-violeta. A partir da quantificação das amostras amplificadas, foi calculada a quantidade de DNA em ng requerida para obter a razão molar inserto:vetor de (7.5:1), visando garantir a eficiência da clonagem segundo a seguinte fórmula:

$$\frac{\text{Tamanho do inserto (pb)} \times \text{Quantidade de vetor (ng)}}{\text{Tamanho do vetor}} \times \frac{\text{inserto}}{\text{vetor}} \text{ (razão molar)}$$

Neste cálculo, foi estabelecida uma concentração constante para a ligação de 50 ng do vetor pMos*Blue*. Este cálculo pode ser simplificado assumindo-se concentrações e tamanhos constantes para o vetor e mantendo-se a razão molar.

Para cada produto de PCR a ser clonado, foi realizada uma reação de ligação contendo a quantidade de inserto calculada anteriormente, tampão de ligação 10X, 5mM de DTT, 0.5 mM de ATP, 50 ng de vetor e 2-3 unidades de T4 DNA ligase. Esta reação foi então incubada em banho

refrigerado a 16°C durante aproximadamente 12 horas e em seguida mantida em geladeira até sua utilização no processo de transformação.

2.3.3. Transformação em *Escherichia coli*

A eficiência do processo de clonagem está diretamente associada à linhagem bacteriana escolhida para transformação. Neste trabalho foram utilizadas células competentes da linhagem *DH5α* de *E. coli*.

Foi preparado meio de cultura LB (Luria Bertani) para crescimento celular contendo triptona 10 g/l, extrato de levedura (DIFCO) 5g/l e NaCl 10 g/l acrescido de 15 g/l de ágar-ágar quando da preparação de meio sólido para crescimento de colônias. Ao meio de cultura foi adicionado o antibiótico Ampicilina a uma concentração final de 50 µg/ml. Foi também preparado X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indol-β-galactosídeo) para uma concentração final de 40 mg/ml em solução de dimetilformamida e IPTG (isopropil β-D-tiogalactopiranosídeo) 100mM. Também foi utilizado meio de cultura TB (Terrific Broth) líquido constituído de triptona 12 g/l, extrato de levedura (DIFCO) 24 g/l e glicerol 5 g/l, acrescentando-se ainda 100 ml de uma solução de 0.17 M KH₂PO₄ e 0.72 M K₂HPO₄.

Foram usados de 20 a 100µl de células competentes para a reação de transformação. Para testar a eficiência das células e do processo de transformação, foram usados controles onde as células foram transformadas com 0.2 ng de plasmídeo-teste. As células de *DH5α* foram cuidadosamente descongeladas sendo então adicionados de 1 a 5 µl da mistura de ligação diretamente sobre as células em suspensão. Foi feita uma incubação no gelo por 30 minutos e em seguida o choque térmico por exatamente 40 segundos em banho a 42°C. Após resfriamento no gelo por 2 minutos foram adicionados em cada transformação 150 µl de meio SOC (20 g/l de triptona, 5 g/l de extrato de levedura, 0.5 g/l de NaCl, acrescido de 10 ml de KCl 250 mM e 5 ml de MgCl₂ 2 M e 20 mM de glicose), sendo as amostras então incubadas por 1 hora a 37°C. O plaqueamento de 80 µl da transformação foi feito em placas de Petri com meio LB contendo 35 µl de X-gal 40mg/ml e 20 µl de IPTG 100mM, que foram posteriormente incubadas invertidas em estufa a 37°C durante a noite para o crescimento de colônias.

2.3.4. Seleção de Colônias Recombinantes

A seleção de colônias recombinantes foi realizada em meio seletivo onde o plasmídeo expressa complementação intra-alélica (α) com a forma defectiva da β -galactosidase codificada pelo hospedeiro (*E. coli*). Bactérias submetidas a indução por IPTG sintetizam ambos os fragmentos da enzima e formam colônias azuis quando plaqueadas em meio com X-gal. A inserção do produto de PCR no sítio de policlonagem do vetor pMOSBlue inativa o fragmento amino-terminal da β -galactosidase abolindo a α -complementação. Bactérias transformadas com o plasmídeo recombinante, consequentemente, geraram colônias brancas que foram facilmente identificadas e isoladas para análise posterior.

Todas as colônias isoladas para análise foram mantidas através de replicação em placas contendo meio LB/ampicilina (50 μ g/ml) e armazenadas na geladeira até a seleção dos clones recombinantes. Em seguida, as colônias selecionadas foram replaqueadas em placas de segurança e mantidas através de repiques constantes, sendo periodicamente examinadas quanto à manutenção do plasmídeo recombinante.

2.3.4.1. Minipreparação plasmidial

Uma vez identificados os clones positivos, através da seleção das colônias recombinantes, o DNA plasmidial foi isolado para verificação da presença do inserto específico e eliminação de falsos positivos. A análise rotineira de clones positivos foi realizada através do método TENS (1% de Tris 1M pH 8.0, 5% de NaOH 2N, 5% de SDS 10% e 0.2% de EDTA 0,5 M pH 8.0) com posterior digestão do plasmídeo com 2 enzimas de restrição do sítio de policlonagem como descrito a seguir: uma única colônia de bactérias foi inoculada em 3 μ l de meio LB/ampicilina sendo posteriormente incubada a 37°C em agitação de 300 rpm durante a noite para o crescimento de células em suspensão. Foram transferidos 1.5 ml de cultura para um tubo eppendorf que foi centrifugado por 1 minuto a 12.000 rpm em microcentrífuga. Uma vez descartado o sobrenadante, o processo foi repetido com o restante da cultura que foi então homogeneizada em vórtex. Foram adicionados 300 μ l de TENS à solução que foi novamente misturada em vórtex, sendo então acrescida de 150 μ l de acetato de sódio 3M pH 5.2, procedendo-se mais uma centrifugação por 5 minutos após nova homogeneização em vórtex. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo onde o DNA foi precipitado em Etanol gelado, sendo novamente centrifugado a temperatura ambiente por 10 minutos a 12.000 rpm em microcentrífuga. Após descarte do sobrenadante, o

“pellet” foi lavado em Etanol 70% gelado e posteriormente ressuspendido em 50 µl de 1X TE contendo 20 µg/ml de RNase. Após a incubação a 37°C por 1 hora para digestão com a enzima, foram utilizados 2 µl de cada amostra para a digestão com as enzimas do sítio de clonagem do vetor pMOS*Blue*.

2.3.4.2. Detecção do Inseto com Enzimas do Sítio de Policlonagem

Foram utilizados 2 µl do DNA purificado através de miniprep para a digestão com as enzimas *Sma* I e *Xba* I (Pharmacia), com o objetivo de extrair o inserto do vetor. As condições de digestão, concentração, tampão, tempo e temperatura foram as recomendadas pelo fabricante. Cada reação de digestão recebeu 0.5 µl de *Sma* I, 1.5 µl de tampão de reação da enzima, 9.5 µl de água e 2 µl de DNA. As amostras foram incubadas durante 1 hora a 30°C, acrescidas de 1µl de *Xba* I e novamente incubadas por 2 horas a 37°C. As reações foram então inativadas com 1 µl de Bromofenol/Xilenocianol e submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% a 80 volts. O gel foi corado com Brometo de Etídio e a visualização das bandas do inserto foi feita em transiluminação U.V.

2.3.4.3. Amplificação da colônia com primers mitocondriais

Com o objetivo de selecionar clones positivos diretamente do plaqueamento, também foram realizadas amplificações através de PCR das colônias recombinantes, subtraindo a etapa de purificação plasmidial e digestão com enzimas de restrição. Neste caso, as colônias selecionadas foram isoladas e ressuspendidas em 50 µl de água MilliQ estéril seguindo-se a agitação em vórtex e a desnaturação a 95°C durante 5 minutos. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm em microcentrífuga por 1 minuto. Foram coletados 10 µl do sobrenadante para posterior análise via PCR, mantendo-se as condições específicas de amplificação citadas anteriormente para cada região, item 2.2.

2.4. Sequenciamento da Região Controle

2.4.1. Minipreparação Plasmidial para Sequenciamento

Dois procedimentos distintos de purificação plasmidial foram utilizados especificamente para a preparação de amostras para sequenciamento.

Método de extração alcalina. A preparação de amostras para sequenciamento foi feita a partir do inóculo de 3 ml de meio de cultura líquido LB contendo 5 µl de ampicilina com uma única colônia recombinante, seguindo-se uma incubação a 37°C com agitação constante de 250 rpm durante a noite. Após o crescimento de células em suspensão, foram transferidos 1.5 ml da cultura para tubos de microcentrífuga e centrifugados por 2 minutos a 12.000 rpm. Foi descartado o sobrenadante e o processo foi repetido para o restante da cultura. Foram adicionados ao “pellet” 200 µl de 1X TE (10 mM Tris 7.4 e 1 mM EDTA 8.0) que foi então ressuspensionado em vórtex e em seguida adicionados 400 µl de NaOH 2N e 1% de SDS (v/v), a solução foi homogeneizada por inversão e incubada no gelo. Em seguida foram adicionados 300 µl de acetato de potássio 3M, os tubos foram misturados por inversão e centrifugados por 10 minutos a 12.000 rpm em microcentrífuga. O sobrenadante de cada amostra foi então dividido e transferido para dois novos tubos aos quais foi acrescentado 10% de NaOAc 3M pH5.3. O DNA foi então precipitado com 900 µl de isopropanol a -20°C por 15 minutos após os quais as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 10 minutos em microcentrífuga refrigerada a 4°C. Inicialmente, um “pellet” de cada amostra foi dissolvido em 500 µl de 10X TE e, em seguida, este volume foi usado para ressuspender o segundo “pellet” obtido para a mesma amostra. Foi ainda adicionada RNase para uma concentração final de 20 µg/ml, seguindo-se incubação a 37°C por 15 minutos. A RNase foi extraída da solução com 500 µl fenol/clorofórmio 1/1 (v/v) com posterior centrifugação a 12.000 rpm por 5 minutos em microcentrífuga. Em seguida o sobrenadante foi coletado e acrescido de 50 µl de NaOAc 3M e 900 µl de Etanol gelado sendo posteriormente incubado a -20 por 30 minutos para ocorrer a precipitação do DNA. Procedeu-se então uma centrifugação por 10 minutos a 4°C em microcentrífuga refrigerada, onde o sobrenadante foi descartado e o “pellet” foi lavado em Etanol 70%. O “pellet” foi liofilizado e ressuspensionado em 100 µl de 1X TE. Foram coletados 2 µl de cada amostra para digestão e visualização em gel de quantificação.

O DNA dupla-fita, foi desnaturado através de tratamento alcalino prévio ao sequenciamento (Sambrook *et al.*, 1989). Neste procedimento foram adicionados 15 µl de EDTA 2 mM, 15 µl de NaOH 2M e 20 µl de água estéril para cada 100 µl de DNA. Em seguida as amostras foram incubadas

a 37°C por 30 minutos. Foram então adicionados 23 µl de NH₄OAc pH 4.8 e 520 µl de Etanol gelado e precipitado por 30 minutos a -70°C. Seguiu-se a centrifugação por 10 minutos a 9.000 rpm em microcentrífuga. Após descartar o sobrenadante, o “pellet” foi lavado em uma centrifugação de 5 minutos com Etanol 70%. O “pellet” foi então liofilizado e armazenado em freezer -20°C até sua utilização na reação de sequenciamento.

A preparação plasmidial para o sequenciamento automático realizado pelo **Nucleic Acid Service Laboratory** da University of British Columbia, está descrita a seguir. Foram inoculados 4 ml de meio de cultura TB (Terrific Broth) contendo 5 µl de ampicilina 40 mg/ml com uma única colônia e incubados a 37°C com agitação constante a 300 rpm durante a noite. Cada 1.5 ml da cultura foi centrifugado por 1 minuto, o sobrenadante foi então descartado e o “pellet” de bactérias foi ressuscitado em 200 µl de tampão GTE (glicose 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8.0 e EDTA 10 mM pH 8.0). Foram adicionados 300 µl de NaOH 0.2N/SDS 1%, misturando-se por inversão, seguindo-se incubação no gelo por 5 minutos. A solução foi neutralizada adicionando-se 300 µl de acetato de potássio 3M pH 4.8, os tubos foram novamente invertidos e incubados no gelo por 5 minutos. Seguiu-se a centrifugação por 10 minutos a 12.000 rpm à temperatura ambiente em microcentrífuga, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo, acrescido de 2 µl de RNase A (10 µg/ml) e incubado por 20 minutos a 37°C. Após o tratamento com RNase o sobrenadante foi extraído 2 vezes com Clorofórmio. O DNA total foi precipitado em 550 µl de isopropanol 100% e centrifugado em seguida, por 10 minutos em micricentrífuga à temperatura ambiente. O “pellet” foi então lavado com etanol 70% e liofilizado no vácuo, por 3 minutos, para então ser dissolvido em 32 µl de água MilliQ e precipitado com 8.0 µl de NaCl 4M, adicionando-se ainda 40 µl de PEG₈₀₀₀ 13%. As amostras foram incubadas no gelo por 20 minutos e a seguir centrifugadas em microcentrífuga por 15 minutos a 4°C em um rotor de ângulo fixo. Descartado o sobrenadante o “pellet” foi lavado em Etanol 70% e novamente liofilizado à vácuo por 3 minutos. O DNA foi então ressuscitado em 20 µl de água MilliQ e 1 µl de cada amostra foi analisado em gel de agarose para quantificação. O restante foi liofilizado e enviado para análise de sequenciamento.

2.4.2. Reação de Sequenciamento Manual

Foram determinadas as sequências em ambas as fitas de DNA, molde e complementar da região controle, para dois clones de cada espécie, com o objetivo de minimizar possíveis ambiguidades nucleotídicas.

Para as reações de sequenciamento foi utilizado o sistema da USB-Amersham, Sequenase Versão 2.0 DNA Sequencing kit. A mistura de anelamento consistiu da amostra de DNA desnaturado segundo o protocolo descrito anteriormente, 7.0 µl de água MilliQ, 2.0 µl do tampão sequenase 5X e 1.0 µl do primer apropriado (M13 reverso, M13 direto ou primers internos). As amostras foram então incubadas a 37°C por 30 minutos. Paralelamente preparou-se a solução de marcação, consistindo de 1.5 µl do tampão de diluição da enzima, 0.25 µl da DNA polimerase T7 e 0.25 µl de pirofosfatase, 1.0 µl de DTT (Ditiotreitol), 2.0 µl de Labeling Mix (dNTPs diluídos) 1:5 e, por último, 0.5 µl de dATP radioativo [³⁵S], totalizando 5.5 µl de solução de marcação, os quais foram incorporados a cada reação de anelamento. Após a elongação e incorporação radioativa por 5 minutos, a reação foi interrompida transferindo-se 3.5 µl da reação para 4 tubos de terminação contendo cada um 2.5 µl de apenas um dos quatro dideoxynucleosídeos trifosfato de terminação (ddG, ddA, ddT e ddC). Seguiu-se uma incubação a 37°C por 5 minutos e a reação foi então suspensa acrescentando-se 4 µl de bromofenol.

Imediatamente antes de aplicar as amostras no gel de sequenciamento, este foi previamente submetido à corrida eletroforética por 30 minutos para promover o aquecimento das placas suporte e do gel. As amostras foram então desnaturadas em banho a 75°C por 3 minutos e rapidamente resfriadas no gelo. Aproximadamente 3 µl por amostra foram aplicados sequencialmente na ordem G→A→T→C.

2.4.3. Preparação do Gel de Poliacrilamida para Sequenciamento

O tratamento das placas de suporte do gel de poliacrilamida foi feito através de uma etapa de desengorduração de uma das superfícies com Etanol, seguido da aplicação de Acetona. Para aderir o gel, a placa dentada foi tratada com uma solução com 5 ml de Etanol P.A., 175 µl de Ácido Acético e 17 µl de Bind-Silane (Pharmacia). Após a secagem da placa ainda foram adicionados 5 ml de Etanol P.A. na superfície tratada. No tratamento feito na outra placa para evitar a aderência do gel de sequenciamento foram espalhados 5 ml de Repel-Silane (Pharmacia).

As placas foram montadas de modo que as superfícies tratadas estivessem posicionadas uma frente a outra com separadores de 0.2 mm, estando unidas por presilhas laterais.

O gel de acrilamida 6% foi feito a partir de 10.5 ml de acrilamida 40% (38 g/100 ml de Acrilamida, 2 g/100 ml de N,N'-metilendiácridamida e 1 g da resina AG 501-X8D), 29.4 g/80 ml de Uréia e 14 ml de TBE 5X (60.55 g/l de Trizma Base 1M, 25.67 g/l de Ácido Bórico 0.83M e 1.86 g/l de EDTA 10mM). Esta solução foi dissolvida em banho à 60°C e filtrada em filtro 0.45 µm para evitar a formação de cristais no gel. Imediatamente antes de verter o gel entre as placas de corrida foram ainda adicionados 480 µl de Persulfato de Amônia e 30 µl de TEMED (N,N,N',N'- tetrametiletilenodiamina da Bio-Rad). O gel foi então adicionado entre as placas inclinadas, com o cuidado de evitar a formação de bolhas de ar, até atingir a extremidade oposta onde foi inserido o pente. A polimerização do gel foi feita durante a noite à temperatura ambiente com as extremidades das placas vedadas.

A corrida eletroforética foi feita a 2.000 volts em tampão 1X TBE por aproximadamente 5 horas. Após a corrida as placas foram desmontadas e a placa com o gel aderido foi incubada em uma solução de ácido acético 5% e Metanol 15% para remoção de uréia, ficando sob agitação constante por 30 minutos, sendo em seguida lavada exaustivamente em água corrente para retirada da uréia residual. Após a secagem em estufa a 80°C, o gel foi exposto em filme de Raio X (Hyperfilm MP) por aproximadamente uma semana até a revelação do autoradiograma em revelador e fixador reforçador (Kodak).

2.5. Análise das Sequências Nucleotídicas

As sequências de DNA obtidas para a região controle do DNAm_t destas espécies foram editadas através do programa ESEE versão 1.09 (Cabot & Beckenbach, 1989). O alinhamento das sequências completas ou parciais foi realizado através do programa de alinhamento múltiplo CLUSTALW (Thompson *et al*, 1994) e, eventualmente, ajustadas manualmente. Foram mantidos os parâmetros padronizados originalmente no programa para identificação e manutenção de “gaps”, durante as análises de sequências.

A sequências obtidas para a região A+T foram submetidas a consulta e busca por padrões de similaridade e/ou homologia com bancos de sequências registradas e disponíveis para consulta (Genebank e EMBL) através do aplicativo BLASTN permitindo a análise comparativa entre sequências e a identificação preliminar do conteúdo genético de novas sequências.

O programa Mega (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) versão 1.01 (Kumar *et al.*, 1993), oferece um conjunto de aplicativos próprios para a estimativa de distâncias evolutivas, reconstrução filogenética e cálculos estatísticos úteis para a interpretação da informação filogenética contida em sequências de DNA. Neste trabalho, dez sequências representando dois clones de um mesmo indivíduo de cada espécie foram alinhadas e analisadas através deste aplicativo, para a obtenção de uma matriz de distância baseada no modelo de 2-parâmetros de Kimura (Kimura, 1980).

A partir desta matriz, as sequências foram analisadas pelo método de Neighbor-joining (Saitou & Nei, 1992). Sítios informativos de parcimônia foram utilizados para a recuperação da topologia filogenética através de análise de Máxima Parcimônia (Fitch, 1971).

A caracterização de estruturas secundárias conservadas foi baseada no custo energético mínimo requerido para a formação de alças e grampos no DNA, realizada pelo programa de simulação PCFOLD (Zuker, 1989) associado a um aplicativo para visualização de estruturas secundárias MOLECULE (Lapalme *et al.*, 1982), permitindo a observação dos padrões conformacionais, energeticamente estáveis, assumidos por regiões específicas de DNA.

Utilizando-se o aplicativo CAP2 (Contig Assembly Program Version 2 - Huang, 1996) executado em estação SUN - Silicon Graphics, foi realizada a compilação dos dados de sequenciamento, otimizando a edição das sequências nucleotídicas parciais obtidas durante o sequenciamento.

RESULTADOS

1. Padronização da técnica de PCR

Após a padronização foram definidas as condições de amplificação e as concentrações ótimas de cada reagente usado no PCR, que resultaram em maior especificidade do produto para as seis regiões gênicas do DNAmT das espécies *C. hominivorax*, *C. macellaria*, *P. eximia*, *C. megacephala* e *D. hominis*. Para a otimização da reação de PCR foram estabelecidas as seguintes condições: a concentração de 1.5 mM de MgCl₂, os primers foram adicionados para uma concentração final de 0.5 mM cada, a concentração de dNTPs foi de 0.2 mM em reação e foram utilizadas 2.5 unidades de *Taq* DNA polimerase por reação. A alíquota de DNA utilizada para a reação de amplificação foi padronizada em 1.0 µl de uma TNE padrão. A alíquota de DNA utilizada na etapa de reamplificação do produto de PCR foi padronizada em 0.5 µl de uma diluição 1:50 do PCR original.

Entre as temperaturas testadas durante os ciclos de amplificação, a etapa para o anelamento dos primers foi a mais decisiva para aumentar a especificidade do produto de PCR. Os primers utilizados para a amplificação das regiões gênicas foram selecionados de acordo com dados descritos na literatura para amplificação do DNAmT de outras espécies de insetos (Simon et al, 1994). Cada região analisada foi submetida à amplificação com mais de um par de primers específicos em diferentes combinações, com o objetivo de determinar qual arranjo de primers geraria maior resolução do produto. As sequências dos primers estão descritas na Tabela 1 de Materiais e Métodos.

1.1. A região rica em A+T

A região rica em A+T foi amplificada em duas etapas distintas. O processo consistiu de uma primeira amplificação contendo 30 ciclos com etapas de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento com primers externos (TM-N-193 e SR-J-14233, Figura 3) a 58°C por 1 minuto e a elongação a 60°C por 2 minutos. Segue-se um ciclo final idêntico, exceto pelo tempo de elongação de 10 minutos. A reamplificação com primers internos à sequência amplificada em um PCR anterior ("nested" PCR) permitiu a recuperação mais específica da região A+T. A reação de reamplificação manteve as mesmas condições de desnaturação e elongação, sendo o

anelamento com primers internos (TI-N-24 e SR-J-14776, Figura 3) realizado a 56°C por 1 minuto.

As quatro combinações de primers testadas para a amplificação da região A+T estão descritas a seguir. Neste trabalho, o primer SR-J-14233 amplifica eficientemente a região A+T das espécies estudadas quando combinado com o primer TM-N-193, produzindo um fragmento com aproximadamente 2029 pb para *C. hominivorax* e *C. macellaria*, 1826 pb para *P. eximia*, 1567 pb para *C. megacephala* e 2396 pb para *D. hominis*. Ainda foram testados os pares de primers TM-N-193 e SR-J-14776 e os pares TM-N-24 e SR-J-14776. Ambas as combinações de primers geraram produtos inespecíficos. No entanto, esta última combinação se mostrou útil quando utilizada para a reamplificação de uma amostra do produto proveniente de uma amplificação anterior com os primers TM-N-193 e SR-J-14233, produzindo fragmentos específicos com aproximadamente 1430 pb para *C. hominivorax*, 1490 pb para *C. macellaria*, 1377 pb para *P. eximia*, 1220 pb para *C. megacephala* e 1820 pb para *D. hominis* (Figura 5a). A reamplificação da região A+T produziu fragmentos cujos tamanhos variaram num intervalo de 1200 pb a 1800 pb entre as espécies de Calliphoridae e Oestridae identificando padrões interespecíficos neste grupo de espécies.

A região A+T do DNAm de 8 populações, geográficas e temporais, de *C. hominivorax* também foi amplificada, gerando em todas as amostras um único fragmento de aproximadamente 1400 pb (Figura 5b), não tendo sido encontradas variações nas populações de *C. hominivorax* analisadas com relação aos tamanhos dos fragmentos amplificados para região A+T. Porém, esta região, para amostras da espécie *P. eximia*, provenientes respectivamente de material em decomposição e de miíase primária em *Canis familiaris*, apresentou variação em tamanho, tendo sido identificados dois fragmentos distintos para a região A+T com aproximadamente 1370 pb e 1500 pb (Figura 5c e 5d).

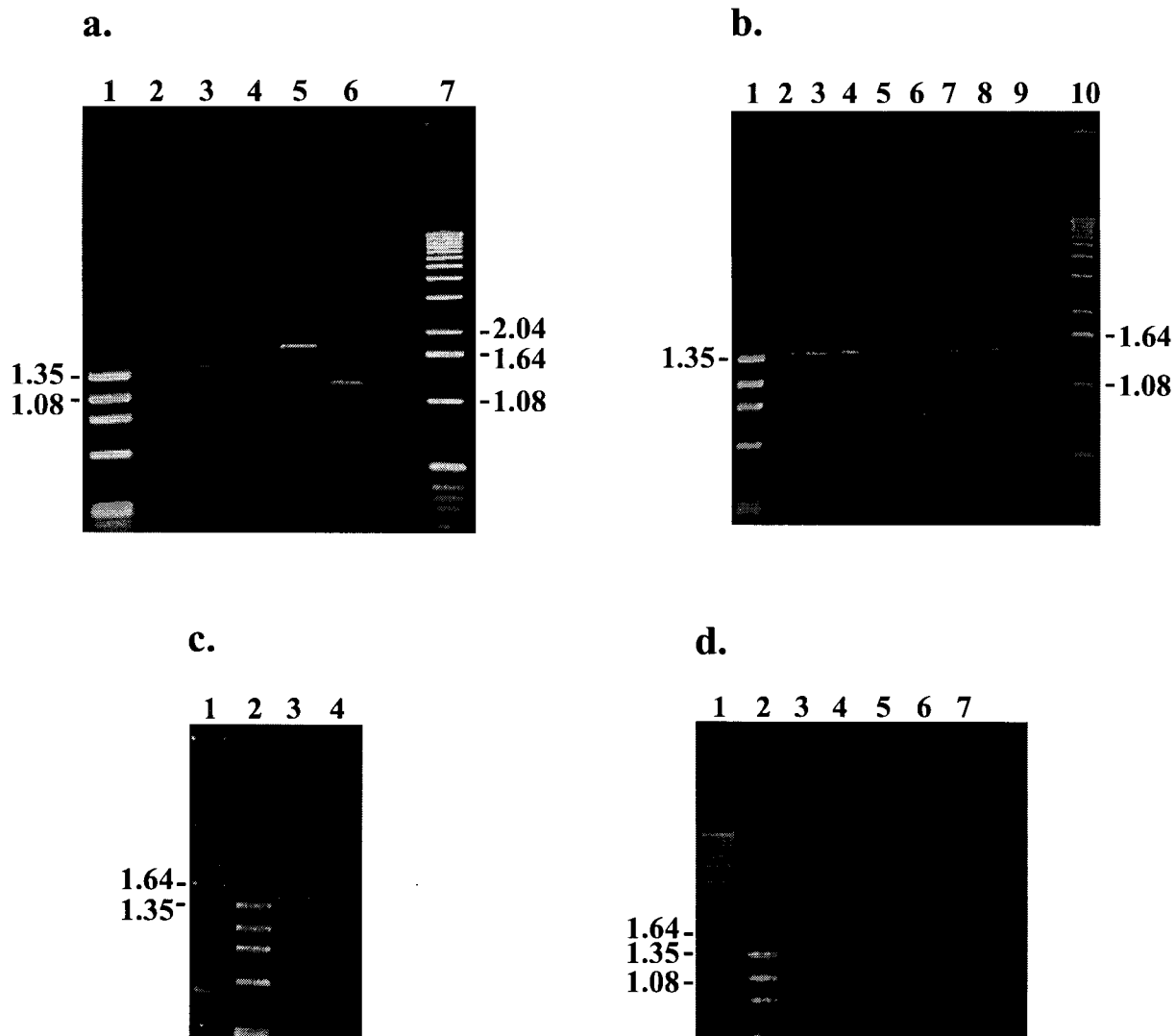


Figura 5- a) Região rica em A+T das 5 espécies estudadas. Coluna 2- *C. hominivorax*; coluna 3- *C. macellaria*; coluna 4- *P. eximia*; coluna 5- *D. hominis* e coluna 6- *C. megacephala*. Colunas 1 e 7 correspondem aos marcadores Φ X174 digerido com *Hae*III e 1Kb DNA Ladder, respectivamente. b) Região rica em A+T de 8 populações de *C. hominivorax*: coluna 2- Alfenas (MG); coluna 3, Caraguatatuba-SP (Ca)-1; coluna 4- Ca-2; coluna 5- Ca-3; coluna 6- Ca-4; coluna 7-Morro do Chapéu (BA); coluna 8- Botucatu (SP); coluna 9- Manaus (AM). Colunas 1 e 10 correspondem aos marcadores Φ X174 digerido com *Hae*III e 1Kb DNA Ladder, respectivamente. c) Região rica em A+T de 2 amostras de *Phaenicia eximia*: coluna 3- amostra proveniente de miíase primária em cão e coluna 4- amostra proveniente de miíase primária em carcaça. As colunas 1 e 2 correspondem aos marcadores 1Kb DNA Ladder e Φ X174 digerido com *Hae*III, respectivamente. d) Região rica em A+T de 2 amostras de *P. eximia* (aDNA): coluna 3- amostra de Botucatu; coluna 4- amostra coletada em miíase de cão em Barão Geraldo-Campinas; colunas 5 e 6- amostras de Campinas coletada em carcaça; coluna 7- amostra de um espécime seco mantido em coleção desde 1986. Colunas 1 e 2- Correspondem ao marcadores 1Kb DNA Ladder Φ X174 digerido com *Hae* III, respectivamente.

1.2. Regiões Gênicas Codificadoras

Para as regiões gênicas codificadoras, rRNAs 12S e 16S, COI/II, Cit.b e ND2, as temperaturas de desnaturação e elongação foram mantidas constantes, em 94°C e 72°C respectivamente. Foram padronizadas temperaturas específicas para anelamento destas regiões. Os primers utilizados na amplificação das regiões gênicas compreendendo o rRNA 12S e as subunidades I e II da Citocromo Oxidase foram anelados a 47°C. As regiões do Citocromo b e do rRNA 16S foram aneladas aos primers a 55°C, e o anelamento específico para a região ND2 ocorreu a 42° C. Para uma amplificação eficiente, o intervalo de anelamento estabelecido para estas regiões foi de 1 minuto e 15 segundos.

A região COI/II das espécies analisadas foi amplificada com os primers C2-N-3661 e C1-J-2195 gerando um fragmento de aproximadamente 1560 pb para todas as espécies (Figura 6a). A região ND2 foi amplificada com os primers TM-J-206 e C1-N-2191 resultando em um fragmento de 2100 pb, com parte do gene da subunidade I da citocromo oxidase incluído (Figura 6b). Foram obtidos resultados de amplificação mais definidos para a região do citocromo b através da combinação dos primers N1-N-12595 e CB-J-10933 gerando um fragmento de aproximadamente 1500 pb (Figura 6c). A amplificação dos RNAs ribossomais, resultou em um fragmento de aproximadamente 1200 pb para a região 12S quando amplificada com os pares de primers SR-N-14588 e LR-J-13417 (Figura 6d). A região do rRNA 16S do DNAmT das espécies de Calliphoridae e Oestridae analisadas foi amplificada com os primers LR-N-13398 e LR-J-12887 gerando um produto com 638 pb (Figura 6d). Os primers utilizados, amplificaram eficientemente estas regiões específicas do DNAmT das espécies estudadas resultando em tamanhos similares aos esperados quando comparados às regiões homólogas descritas para *D. yakuba*.

A técnica de PCR também permitiu a recuperação da informação genética de regiões específicas do DNAmT de amostras antigas (coletadas há mais de dez anos), de coleções entomológicas e mantidas sob diferentes condições de preservação. A região COI/II do DNAmT de um indivíduo adulto de *C. hominivorax* preservado em álcool 70% por mais de 10 anos foi amplificada, confirmando a eficiência da técnica para a análise de amostras contendo parte do DNA degradado (Figura 6a). Também a região rica em A+T de um espécime seco de *P. eximia*, registrado e mantido em insetário desde 1986, foi eficientemente amplificada com primers internos

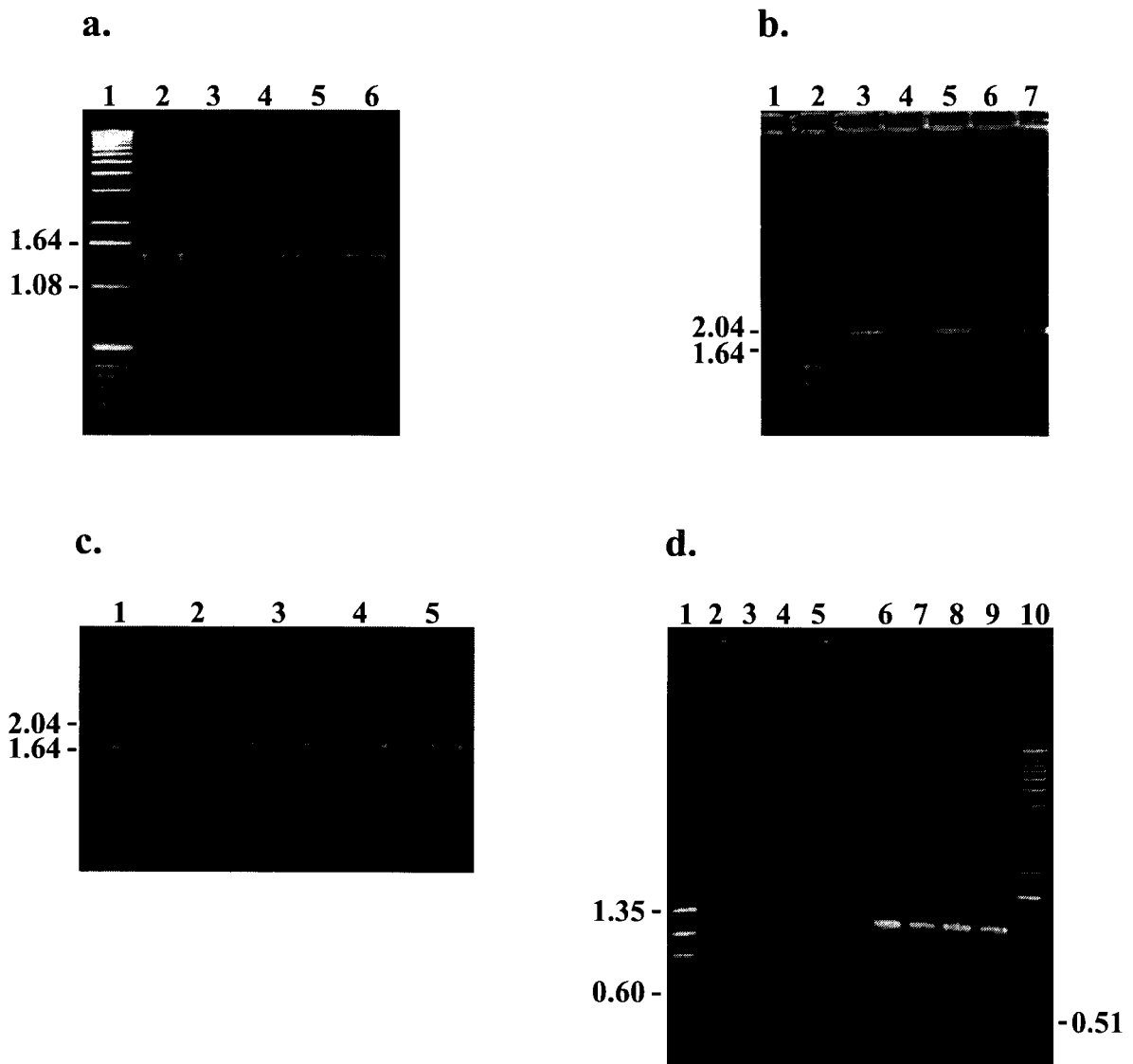


Fig. 6- a) **Região COI/II.** Coluna 2- *C. hominivorax*, amostra preservada em álcool 70%; coluna 3- *C. macellaria*; coluna 4- *P. eximia*; coluna 5- *C. megacephala* e coluna 6- *D. hominis*. Coluna 1- marcador Ladder 1 Kb. b) **Região ND2.** Coluna 3- *C. hominivorax*; coluna 4- *C. macellaria*; coluna 5- *P. eximia*; coluna 6- *C. megacephala*; coluna 7- *D. hominis*. As colunas 1 e 2 correspondem aos marcadores Ladder 1 Kb e Φ X174 digerido com *Hae*III, respectivamente. c) **Região do Citocromo b.** Coluna 2- *C. hominivorax*; coluna 3- *C. macellaria*; coluna 4- *P. eximia*; coluna 5- *D. hominis*. Coluna 1- marcador Ladder 1 Kb. d) **Regiões gênicas ribossomais.** Colunas 2 a 5, **rRNA 16S** e colunas 6 a 9, **rRNA 12S**. Colunas 2 e 6- *C. hominivorax*; colunas 3 e 7- *C. macellaria*; colunas 4 e 8- *P. eximia* e colunas 5 e 9- *D. hominis*. As colunas 1 e 10 correspondem aos marcadores Φ X174 digerido com *Hae*III e Ladder 1 Kb, respectivamente.

a partir de uma alíquota de 2 µl não diluída do produto de amplificação anterior, realizada com os primers externos (Figura 5d).

Com exceção da região A+T, as demais regiões gênicas do DNAm das espécies e populações analisadas, se mostraram constantes quanto aos tamanhos dos fragmentos amplificados.

2. Análise das Sequências Nucleotídicas

A região rica em A+T, amplificada para as cinco espécies, foi eficientemente inserida em vetor de clonagem específico para insertos provenientes da reação de PCR (pMOS*Blue*). Após a purificação de eventuais resíduos remanecentes da reação de PCR (Materias e Métodos item 2.3.2), foi verificado que a diálise em filtro Millipore VM 0.05 µM permitiu uma reação de ligação eficiente, não obtida com os outros métodos testados.

Os insertos contêm integralmente a região rica em A+T, além de incluir as sequências parciais da extremidade 5' do rRNA 12S (180 pb) e a extremidade 3' do tRNA^{lle} (50 pb). Para a caracterização da região controle, foram selecionados 2 clones de um indivíduo de cada espécie. As sequências completas obtidas para os 10 clones estão descritas na Figura 7.

<crRNA^{11a}>A>TTTACCCCTATCAAGGTTAAAGCCCTTTTCATCAGGCCAATTCATATAAAGTA<A+T>GACTTCCCATGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTATTTTA
 TACTTATTTTTATAAAAATAAAAATTAATATTTTGTATATTTATTTTTTAATTTTAAATAATTTAAAAATAGTAAAAAAAATAAGTGTGTATTTTATTAATTT
 TATTTAGATAAATTTAAAATTTTGGCATATATATATATATATATTTATATATATATTTATTCATATATTTCTATTTATATATAAAATATGTTCCAAATAGAT
 ATTAATTTTAATAATTAATAAATTTTATATAAATATATAAATAAAGTATCTATCTATAAGTTTAAATAATTTCAATAATTTGATTTTAATTTCCACTA
 TAAACATTAATATCTATAAAAAATAGTTTAAAGATTTTGTAACTATGATATACTTAACTGAATTTGAAATTTTTTTTTTATCTAAATTAATAGATATATAT
 AATTAATTAATATTTATATATTAATGAATATCTATTAAATCTTATTGGGTATATGGACCAAAAAATAAATTTTTGCACGCTTCAATATAAAAAATGGA
 GAGGTATATATAGATGAAATATATATTTAAATTTAGTTAATAGAAAACTCATTATATAAGCAATTTATTTACTTATTAATAAGTAATACCATTTAAAAA
 AAAAAAATAAAACCTAGTTGAGTTAAAAAATGAAATTTTTCTAAATTTTTTACTATTTTAAATTTATTAATAAATTAATATATATTTAATAAAAATTT
 ATAAATTTATTTTATTTTAAATTTAGTAAATAAATAGGGGGTTTATTTATTAATATAAAGTAAGTATAAATTTTACATTTGATTTTATTTGTTACAG
 GAGTAGTACCAATTTATAAATATCTATTTTATAAATTTTATAAATTTTATAAATTTTATTTATTAATAATATAAATTTAATTAGTTAATTAATTTATAA
 ATTATTTTGGAGAAATTTGGACTGTTAAAAATAGGGGTATCAAAAATCTAACAGTAGCGTGCAGAGATTTTTTGCTCTAATATAGTTTTCCTTTAAAT
 GGGTATGAAATTTTCTGCACGCTACTGTTAGATTTTGGGGTCTCAATTTTACATTTGTTTTTATTTATATATATTTTTTTCTTCATTTTTTTTAGTAAGTG
 TATTTTTCAGTGTTAAATATGAAATATATAGATGTAATTTAATTTGATTACTTTTTTTTAAATTTTGTAGTTAATAAAAAATATATTTATTTAAATTT
 ATTATTTTATAGTTTATAGTTT<crRNA12S>ATAAAGTTTATTTTGGCTTGTAAATTTATTTATAGTTTAAATTTATATGTAAATTTTTGTGTGAATTT
 TTATTTTATTTTAAATAGTAATAAATTAATTTTATTCGCAGTAATTAATTTATTAATTAAGGAAACCTTGGAAATAGTAACTAAGAGATTTGACA
 AAATTCGTGCCAGC

>*Phaenicia eximia* Clone 1 (PeC1): 1353bp

[illegible][illegible]

44

> *Chrysomya megacephala* Clone 1 (CmegC1): (1209 bp)

[illegible]

> *Chrysomya megacephala* Clone 2 (CmegC2): (1210 bp)

<trNA¹⁸>A>TTTACCCATATCAAGGTAAACCGTTTCATCAGGCCAATTCATTAAAGAGTA<A+T>AGATTCCCATGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGTTTTA
 TTTTATAGTAATTTTTTTGTGATTTATTAATAAAATACATTATAAAATTTAAATATTAATAATTATAAAAGTAATAGTTTATATAAATGAAAA
 AAAATAAAATTTAGATAAATAAAAATGCAATATATATATATATAAATTTATATATATTTTATCATATATTTTATAATATATAAATGAAATATA
 ATGTTATATAAAATTAATAATTAATAAATTTATTAATAAAATATAAATAATAATTCACATACATTATTAATATATTTTTTAAACAGTCAATTTCTA
 CATAAATTAATAGATAAATCATTTATTAATAATATTTAATTAATGATATCTTAACTGGATTTAAAATTTTTTTTTTACTCTAAATTAATAGATATATA
 TTAATTAATTAATAATTTATATATTAATAGATATCTATTAATTTTATTTGGTATATAGACCAAAAATAAATTTTTGCACGCTTCAATATAAAATTTGG
 AGAGGTATATTTAAATGAATATATATATTTTTTTTATATATATAAATAAAAAATAAAAAAATCATGAAAAATCAATTAATAAATTAAT
 TATACTAAATTTTTGTTATTTTATTTTAAATTTTATGTTTTTATTTTAAATTTTAAATAAGTATAAATATATATATATATATTGTTA
 GGGGATAAATAATATGTCATATAAAATAATCATGGTATTTTATTTGTAACAGGAGTATTTACCAATTTATAATTATTTAGAAATAGTTTAATTTCTA
 TTAATATAATTAATAATGAATGTAATATTATTACATGATTACCCATCAAGGTAAACCGTTTCATCAGGCCAATTCATTAAAGAGTAAGATTCCCATG
 TTTACTAATTTTATTTATTTATTTAATTAATAATATTAATAAATTTATTTTATTTATTTTAAATTTTATTTGT<trNA12S>ATAAAGTTTTATTTTGG
 CTAGTAAAGTTTTATTTAGTTTAAATTTATATGTAATTTTTTGTGTAATTTTTATTTTAAATAAATAAATTAATTTATTTTATCGCAGTAAATTA
 ATATATTATAATTTAGGGAAACCTAGAAATAGTAATCTAAAGAGTATTTGACAAAAATTCGTGCCAGC

5. *Dermatobia hominis*

>*Dermatobia. hominis* Clone 1 (DhC1): 1792bp

[illegible]

Figura 7. continuação.

> *Dermatobia hominis* Clone 2 (DhC2): 1794bp

```
<tRNAIle>ATTTACCCCTATCAAGGTAACCCTTTTTCAGGCAATTCATT<A+T>TTTTTTTTTTTTTTTTTTTATTTTATTGTTTTTTTTTTAGTGAA
ATTTAGAAATATTATAAATTGATTAATTTATTTTAAATAATTTAATTAGTATTTAATAAAAAAAGATATAATTTTTTAATTAAATTTATGGTTA
AAGTTAATTTAAATGTAAATAATTAAGTTTGCATATATATATATATATATTTATATATATTAATATACATTCATCTATATATATATTAATTTAT
GTATATAAATTTATATTTTCATTTAATAAATAAATAATTTATATATATATAAATTTATTTATATCATTAATCTTTAAAGTAAAAATATAAATATATAA
CATTTAGGTGGAGAAATATATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA
ATAGATAAATATTGATTAATTAACATTTATATATTAATATTTATCTATTAATCCTTATTTGGTATATAGACCTAAAAAAATTTCTGTACGGTCA
ATATAAATTTATGGTATAAATTAATAAATAAATCTTTTTTTGATTTTTTTATTTTTAAAGGAAATCTAATTATCTATAAATTTTCATAAAAAAATAA
TTAAATTTATATATATAAATAAATTTTAGACGATTATAAATAAATTGATATCTTTTTTAAATTAATAAAAAACATGAAATTTATTTGAAAAAA
ACAAAAATTTTAAATTATTGATAAATTTTCATTTAAAAAATTTTATTTTGAAGAAATTTTGAAGAAATTTTGAAGAAATTTTGAAGAAATTTTGAAG
ATTTTAAATTTTGTAAATTTTGCAAAATTTTGATTTTTTTTCATTAATTTTATCTTTTTTAAAGAAATGAAAAATTTGTTCAATATATAT
ATATATATTTATAAATATTTTAAATATATATATAAATCAATATATATTTATATATGTATATACATATATTACTTAAATTTATTTATATAATTTATTTT
ATATTAATTTTAAAGTATTATTTAAATTTATTTAAATTTATTTATTTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTT
ATAAATTTATTTGATTTTATGATGTTTTTATGATGTTTTTATGATGTTTTTATGATGTTTTTATGATGTTTTTATGATGTTTTTATGATGTTTTT
ATGATTTATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATAT
GTGTGTGTGTATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATAT
ATGTATATGTATGCATGTATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATAT
ATCTAATAATATTTATTTTAAATTTTGTATTATATATATAAATATCTATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATAT
CTTATAAATTTATTTATTTAATTTAATTTATATGTAATTTTGTGTGGATTTTATTTATTTTAAAAATGATAAAATTTTATTTAATCGCAGTAATTA
ATTTTATTTAATTAAGGAACTTTAGAAATAGTAAATTTAAAGAGTATTTGACAAATTCGTGCCAGC
```

Figura 7. continuação.

2.1. Análise da Composição Nucleotídica

A partir da análise das sequências primárias, foi possível detectar a presença de elementos estruturais distribuídos na região controle em todas as espécies estudadas. Neste trabalho, são denominados de elementos estruturais, trechos de sequência primária caracterizados por séries nucleotídicas como poli-Ts, poli-As, repetições [pirimidina-purina]_n e trechos ricos em G+A. Dentre os elementos conservados de sequência primária observados, indicados em rosa (Figura 7), pode-se ressaltar a ocorrência de um longo trecho de poli-Ts localizado imediatamente após a extremidade 3' do gene tRNA^{Ile}. Mais adiante nas sequências, é possível identificar um série de repetições AT em "tandem" ainda na porção 5' da região A+T. Observa-se também um trecho de poli-As localizado na região central destas sequências. Analisando-se especificamente as sequências da região controle de *D. hominis*, podem ser observados vários trechos contendo séries de repetições dinucleotídicas [pirimidina-purina]_n (compostas por unidades TA, CA e TG) frequentes na porção proximal ao gene rRNA 12S. Confirmando sua denominação, esta região apresenta uma elevada composição nucleotídica em favor de adeninas e timinas em todas as espécies analisadas, conforme descrito na Tabela 5.

Tabela 5 - Análise da Composição Nucleotídica da Região Controle de Replicação.

Espécies/Clones	A	T	C	G	% A+T	Total (pb)
<i>C. hominivorax</i> - 1	41.9	49.1	3.6	5.4	91.0	1176
<i>C. hominivorax</i> - 2	41.9	48.9	3.5	5.7	90.8	1174
<i>C. macellaria</i> - 1	39.0	47.9	5.2	7.8	86.9	1223
<i>C. macellaria</i> - 2	38.8	47.9	5.2	8.1	86.7	1220
<i>P. eximia</i> - 1	42.6	47.6	4.0	5.8	90.2	1125
<i>P. eximia</i> - 2	42.8	47.5	3.8	5.8	90.3	1118
<i>C. megacephala</i> - 1	42.3	46.4	5.2	6.1	88.7	981
<i>C. megacephala</i> - 2	42.1	46.7	5.0	6.2	88.8	981
<i>D. hominis</i> - 1	42.3	48.4	3.0	6.3	90.7	1573
<i>D. hominis</i> - 2	41.6	48.0	3.0	6.3	89.6	1573

Estes valores estão descritos em porcentagem, exceto o Total

2.2. Caracterizando a Variabilidade Genética da Região Controle

A análise das sequências nucleotídicas da região controle destas espécies através de alinhamento, permite uma abordagem comparativa mais informativa para a caracterização da variabilidade genética. Desta maneira, é possível observar a ocorrência de substituições de bases envolvendo eventos específicos de transição, transversão e, ainda, inserções e/ou deleções nucleotídicas. Estes dados foram também importantes para estimar a frequência destes eventos e determinar a divergência nucleotídica entre as espécies.

Através do alinhamento das sequências completas da região controle das espécies, *C. hominivorax*, *C. macellaria*, *P. eximia*, *C. megacephala* e *D. hominis*, foi possível caracterizar dois domínios principais (Figura 8). Um primeiro domínio, denominado de **A**, localizado na região proximal ao gene do tRNA^{lle}, onde estão distribuídos os blocos de sequência conservados (quadro em vermelho) e, um segundo domínio denominado de **B** (quadro em azul), onde predominam eventos de inserção ou deleção mais amplos e elementos de sequência repetidos, sendo caracterizado como o domínio variável da região A+T.

Os resultados apresentados na Tabela 6 permitem a identificação dos eventos evolutivos característicos para a região controle e a estimativa da divergência de sequência entre as espécies e entre os clones de uma mesma espécie, indicando uma predominância de transversões sobre transições, onde as substituições do tipo A ↔ T são significativamente mais frequentes.

Domínio A

	tRNA ^{21a}																		
	1	15	16	30	31	45	46	60	61	75	76	90							
C. hominivorax1	-ATTTACCCCTATCAA	GGTAATCCTTTTAT		CAGGCAATTCATTAA	AAGTAGGATTCCCAT	ACAACCTTTTTTTTTT	TTTTTTTTT---ATGT	87											
C. hominivorax2	-ATTTACCCCTATCAA	GGTAATCCTTTTAT		CGGGCAATTCATTAA	AAGTAGGATTCCCAT	ACGATTTTTTTTTTTT	TTTTTTTTTTTATGT	89											
C. macellaria1	TATTTACCCCTATCAA	GGTAACCTTTTTCAT		CAGGCAATTCATTAA	AAGTAGACTTCCCAT	GT---TTTTTTTTTTT	TTTTTTTTT---T--	82											
C. macellaria2	TATTTACCCCTATCAA	GGTAACCTTTTTCAT		CAGGCAATTCATTAA	AAGTAGACTTCCCAT	G----TTTTTTTTTTT	TTTTTTTTT---T--	80											
C. megacephala1	-ATTTACCCCTATCAA	GGTAACCTTTTTCAT		CAGGCAATTCATTAA	GAGTAGAGATTCCCAT	G----TTTTTTTTTTT	TTTTTTTTTGTG-TTTT	84											
C. megacephala2	-ATTTACCCCTATCAA	GGTAACCTTTTTCAT		CAGGCAATTCATTAA	GAGTAGAGATTCCCAT	G----TTTTTTTTTTT	TTTTTTTTTGTG-TTTT	84											
P. eximia1	TATTTACCCCTATCAA	GGTAATCCTTTTAT		CAGGCAATTCATTAA	AAGTAGGTTTTCAT	G----TTTTTTTTTTT	TTTTTTTTT-----	80											
P. eximia2	-ATTTACCCCTATCAA	GGTAATCCTTTTAT		CAGGCAATTCATTAA	AAGTAGGTTTTCAT	G-----TTTTTTT	TTTTTTTTT-----	76											
D. hominis1	TATTTACCCCTATCAA	GGTAACCTTTT-TT		CAGGCAATTCATT	TTTTTTTTTTTTTTT	T---TATTTTTTAT	GTTTTTTTTTAGTGA	85											
D. hominis2	TATTTACCCCTATCAA	GGTAACCTTTT-TT		CAGGCAATTCATT	TTTTTTTTTTTTTTT	T---TATTTTTTAT	GTTTTTTTTTAGTGA	85											
C. hominivorax1	ATATTT---ATACTA	TTTTTT-ATAAAAT	91 105 106	120 121	135 136	150 151	165 166	180											
C. hominivorax2	ATATTT---ATACTA	TTTTTT-ATAAAAT		AAAATATACTAATTA	ATATTTTATTTTTAA	TTTTTAATAATTTAA	TTAGTAATAAATATT	173											
C. macellaria1	ATTTT---ATACTT	ATTTTT-ATAAAAT		AAAATTAATTAATTT	GTATTTTATATTTAA	TTTTTAATAATTTAA	ATAGTAAAAAAATA	175											
C. macellaria2	ATTTT---ATACTT	ATTTTT-ATAAAAT		AAAATTAATTAATTT	GTATTTTATTTTAA	TTTTTAATAATTTAA	ATAGTAAAAAAATA	167											
C. megacephala1	ATTTTA---TAGTAA	TTTTTT-TGTGATTT		ATTAATAAATAAAC	ATTATAAAATCTAA	TATTAATAATTTATA	ATAGTAAATAGTTT	165											
C. megacephala2	ATTTTA---TAGTAA	TTTTTT-TGTGATTT		ATTAATAAATAAAC	ATTATAAAATTTAA	TATTAATAATTTATA	ATAGTAAATAGTTT	170											
P. eximia1	-TCCTT---ATACTA	AAATTT-TTAAAAA		GAAATATTTTTTTTT	ATTATT-ATAATTTA	TTTACATAATAAAT	TTAGTAATTATGATT	170											
P. eximia2	-TCCTT---ATACTA	AAATTT-TTAAAAA		AAGTGTTTTTTTTTT	ATTATT-ATAATTTA	TTTACATAATAAAT	TTAGTAATTATGATT	164											
D. hominis1	AATTTAGAAATATTA	TAAATTGATTAATTT		ATTTTAAATAATTTT	AATTAGTATTTTAA	AAAAAAGATATAAT	TTTTTAATTAAAT	160											
D. hominis2	AATTTAGAAATATTA	TAAATTGATTAATTT		ATTTTAAATAATTTT	AATTAGTATTTTAA	AAAAAAGATATAAT	TTTTTAATTAAAT	175											
C. hominivorax1	TAATATTTTATTA	ATAAATTGAAAAA	181 195 196	210 211	225 226	240 241	255 256	270											
C. hominivorax2	TAATATTTTATTA	ATAAATTGAAAAA		ATAAATTGAAAAA	ATAAATTGAAAAA	ATAAATTGAAAAA	ATAAATTGAAAAA	260											
C. macellaria1	AGTTGATTTTATTA	TTTT-ATTAGATA		TTAAATTTTGCATAT	ATATATATATATATA	---ATTATATATAT	TATTTATCATATATT	260											
C. macellaria2	AGTTGATTTTATTA	TTTT-ATTAGATA		TTAAATTTTGCATAT	ATATATATATATATA	---ATTATATATAT	TATTTATCATATATT	253											
C. megacephala1	ATAAATTGAAAAA	ATAA-ATTAGATA		TTAAATTTTGCATAT	ATATATATATATATA	---ATTATATATAT	TATTTATCATATATT	249											
C. megacephala2	ATAAATTGAAAAA	ATAA-ATTAGATA		TTAAATTTTGCATAT	ATATATATATATATA	---ATTATATATAT	TATTTATCATATATT	254											
P. eximia1	TTTATAAAAAATTTT	TTAT-ATGTAATA		TTAAATTTTGCATAT	ATATATATATATATA	T---ATTATATATAC	TTTATCATATATT	254											
P. eximia2	TTTATAAAAAATTTT	TTAT-ATGTAATA		TTAAATTTTGCATAT	ATATATATATATATA	T---ATTATATATAC	TTTATCATATATT	249											
D. hominis1	TATGGTTAAAGTTAA	TTAAATGTAATA		TTAAAGTTTGCATAT	ATATATATATATATA	---TTTATATATAT	TATATACATTCATC	247											
D. hominis2	TATGGTTAAAGTTAA	TTAAATGTAATA		TTAAAGTTTGCATAT	ATATATATATATATA	---TTTATATATAT	TATATACATTCATC	261											
C. hominivorax1	TATATTTTATTA	ATAAATTGAAAAA	271 285 286	300 301	315 316	330 331	345 346	360											
C. hominivorax2	TATATTTTATTA	ATAAATTGAAAAA		ATAAATTGAAAAA	ATAAATTGAAAAA	ATAAATTGAAAAA	ATAAATTGAAAAA	348											
C. macellaria1	TCTATTTTATTA	ATAAATTGAAAAA		ATAAATTGAAAAA	ATAAATTGAAAAA	ATAAATTGAAAAA	ATAAATTGAAAAA	348											
C. macellaria2	TCTATTTTATTA	ATAAATTGAAAAA		ATAAATTGAAAAA	ATAAATTGAAAAA	ATAAATTGAAAAA	ATAAATTGAAAAA	341											
C. megacephala1	TATAAT-ATATTA	TTATGAATATAATG		TATAAATTAAT-AA	TTAATAAATTTATTA	TATAAT-ATTATA	TATAAATTTATCT	337											
C. megacephala2	TATAAT-ATATTA	TTATGAATATAATG		TATAAATTAAT-AA	TTAATAAATTTATTA	TATAAT-ATTATA	TATAAATTTATCT	341											
P. eximia1	TATATATATATTA	ATAAATTGAAAAA		ATAAATTGAAAAA	ATAAATTGAAAAA	ATAAATTGAAAAA	ATAAATTGAAAAA	341											
P. eximia2	TATATATATATTA	ATAAATTGAAAAA		ATAAATTGAAAAA	ATAAATTGAAAAA	ATAAATTGAAAAA	ATAAATTGAAAAA	338											
D. hominis1	TATATATATATTA	ATAAATTGAAAAA		ATAAATTGAAAAA	ATAAATTGAAAAA	ATAAATTGAAAAA	ATAAATTGAAAAA	336											
D. hominis2	TATATATATATTA	ATAAATTGAAAAA		ATAAATTGAAAAA	ATAAATTGAAAAA	ATAAATTGAAAAA	ATAAATTGAAAAA	349											
C. hominivorax1	ATAAAGTTTAAATGAT	TTTATTAATTAAT	361 375 376	390 391	405 406	420 421	435 436	450											
C. hominivorax2	ATAAAGTTTAAATGAT	TTTATTAATTAAT		ATAAAGTTTAAATGAT	ATAAAGTTTAAATGAT	ATAAAGTTTAAATGAT	ATAAAGTTTAAATGAT	438											
C. macellaria1	ATAAAGTTTAAATGAT	TTTATTAATTAAT		ATAAAGTTTAAATGAT	ATAAAGTTTAAATGAT	ATAAAGTTTAAATGAT	ATAAAGTTTAAATGAT	438											
C. macellaria2	ATAAAGTTTAAATGAT	TTTATTAATTAAT		ATAAAGTTTAAATGAT	ATAAAGTTTAAATGAT	ATAAAGTTTAAATGAT	ATAAAGTTTAAATGAT	431											
C. megacephala1	TTAT--TAAATTTT	TTTTTAAACAGTCA		ATTCTAC-ATAATA	ATTAGATAAATCATT	ATTAAATAATTTTA	ATTAAATAATTTT	427											
C. megacephala2	TTAT--TAAATTTT	TTTTTAAACAGTCA		ATTCTAC-ATAATA	ATTAGATAAATCATT	ATTAAATAATTTTA	ATTAAATAATTTT	427											
P. eximia1	TTAA--TAAATTTT	TTTTTAAACAGTCA		ATTCTAC-ATAATA	ATTAGATAAATCATT	ATTAAATAATTTTA	ATTAAATAATTTT	424											
P. eximia2	TTAA--TAAATTTT	TTTTTAAACAGTCA		ATTCTAC-ATAATA	ATTAGATAAATCATT	ATTAAATAATTTTA	ATTAAATAATTTT	422											
D. hominis1	ATCTT-TAAAGTAA	ATATAAATATATA		ATTAGGTGGAGAAA	TATATATAAATAATA	ATTAAATAATTTTA	ATTAAATAATTTT	437											
D. hominis2	ATCTT-TAAAGTAA	ATATAAATATATA		ATTAGGTGGAGAAA	TATATATAAATAATA	ATTAAATAATTTTA	ATTAAATAATTTT	437											
C. hominivorax1	TAACCTGGATTGAA	TTTTTTTTTT--ATC	451 465 466	480 481	495 496	510 511	525 526	540											
C. hominivorax2	TAACCTGGATTGAA	TTTTTTTTTT--ATC		TAAATTAATAGATA	ATATTGATTAAATTA	ATATTTATATATTA	TATATACCTATTAA	526											
C. macellaria1	TAACCTGGATTGAA	TTTTTTTTTT--ATC		TAAATTAATAGATA	ATATTGATTAAATTA	ATATTTATATATTA	TATATACCTATTAA	526											
C. macellaria2	TAACCTGGATTGAA	TTTTTTTTTT--ATC		TAAATTAATAGATA	ATATTGATTAAATTA	ATATTTATATATTA	TATATACCTATTAA	519											
C. megacephala1	TAACCTGGATTGAA	TTTTTTTTTT--ATC		TAAATTAATAGATA	ATATTGATTAAATTA	ATATTTATATATTA	TATATACCTATTAA	514											
C. megacephala2	TAACCTGGATTGAA	TTTTTTTTTT--ATC		TAAATTAATAGATA	ATATTGATTAAATTA	ATATTTATATATTA	TATATACCTATTAA	516											
P. eximia1	TAATTTGAATTT-AAA	TTTTTTTTTT--ATC		TAAATTAATAGATA	ATATTGATTAAATTA	ATATTTATATATTA	TATATACCTATTAA	511											
P. eximia2	TAATTTGAATTT-AAA	TTTTTTTTTT--ATC		TAAATTAATAGATA	ATATTGATTAAATTA	ATATTTATATATTA	TATATACCTATTAA	507											
D. hominis1	TAATTTGAATTT-AAA	TTTTTTTTTT--ATC		TAAATTAATAGATA	ATATTGATTAAATTA	ATATTTATATATTA	TATATACCTATTAA	527											
D. hominis2	TAATTTGAATTT-AAA	TTTTTTTTTT--ATC		TAAATTAATAGATA	ATATTGATTAAATTA	ATATTTATATATTA	TATATACCTATTAA	527											
C. hominivorax1	-CCTATTGG-TATAT	AGACCAAAAAATAAT	541 555 556	570 571	585 586	600 601	615 616	630											
C. hominivorax2	-CCTATTGG-TATAT	AGACCAAAAAATAAT		TTTTG-CACG----	-----	-----	CTT-----	566											
C. macellaria1	TCTTATTGG-TATAT	AGACCAAAAAATAAT		TTTTG-CACG----	-----	-----	CTT-----	566											
C. macellaria2	TCTTATTGG-TATAT	AGACCAAAAAATAAT		TTTTG-CACG----	-----	-----	CTT-----	566											
C. megacephala1	TTTATTGG-TATAT	AGACCAAAAAATAAT		TTTTG-CACG----	-----	-----	CTT-----	557											
C. megacephala2	TTTATTGG-TATAT	AGACCAAAAAATAAT		TTTTG-CACG----	-----	-----	CTT-----	556											
P. eximia1	CTATATTGG-TATAT	AGACTAAAAATTCAGA		TTTTG-CACG----	-----	-----	CTT-----	552											
P. eximia2	CTATATTGG-TATAT	AGACTAAAAATTCAGA		TTTTG-CACG----	-----	-----	CTT-----	548											
D. hominis1	CCTTATTGG-TATAT	AGACCTAAAAATAAT		TTTTG-CACG----	-----	-----	CTT-----	617											
D. hominis2	CCTTATTGG-TATAT	AGACCTAAAAATAAT		TTTTG-CACG----	-----	-----	CTT-----	617											

FIGURA 8 - Alinhamento 1 - Alinhamento das sequências completas da região controle para cada espécie e identificação dos domínios principais, **A** (vermelho) e **B** (azul). As sequências assinaladas diferencialmente

Domínio B

	631	645	646	660	661	675	676	690	691	705	706	720	
C. hominivorax1	-----	-----	-----	-----	-----	CAATATAA	AAATGG	-----	-----	-----	-----	AGAGGTATAT	590
C. hominivorax2	-----	-----	-----	-----	-----	CAATATAA	AAATGG	-----	-----	-----	-----	AGAGGTATAT	590
C. macellaria1	-----	-----	-----	-----	-----	CAATATAA	AAATGG	-----	-----	-----	-----	AGAGGTATAT	584
C. macellaria2	-----	-----	-----	-----	-----	CAATATAA	AAATGG	-----	-----	-----	-----	AGAGGTATAT	580
C. megacephala1	-----	-----	-----	-----	-----	CAATATAA	AAATGG	-----	-----	-----	-----	AGAGGTATAT	581
C. megacephala2	-----	-----	-----	-----	-----	CAATATAA	AAATGG	-----	-----	-----	-----	AGAGGTATAT	580
P. eximia1	-----	-----	-----	-----	-----	CAATATAA	AAATGG	-----	-----	-----	-----	AGAGGCATAA	576
P. eximia2	-----	-----	-----	-----	-----	CAATATAA	AAATGG	-----	-----	-----	-----	AGAGGCATAA	572
D. hominis1	TTTATTTTTAAAGGA	AATCTAATTATCTAT	-----	-----	-----	AAATTTTCATAAAAA	AAATAATTAATATAT	ATATATAAATAATTA	ATTTTAGACGATTAT	-----	-----	ATTTTAGACGATTAT	707
D. hominis2	TTTATTTTTAAAGGA	AATCTAATTATCTAT	-----	-----	-----	AAATTTTCATAAAAA	AAATAATTAATATAT	ATATATAAATAATTA	ATTTTAGACGATTAT	-----	-----	ATTTTAGACGATTAT	707
	721	735	736	750	751	765	766	780	781	795	796	810	
C. hominivorax1	AT-----AGATGAAT	TATATATTTAATTTA	ATTAATA-----AGG	ATTTATTATATAATC	ATAAATTTAATTTA	TAATAATTTAATTTA	TAATAATTTAATTTA	TAATAATTTAATTTA	TAATAATTTAATTTA	TAATAATTTAATTTA	TAATAATTTAATTTA	TAATAATTTAATTTA	668
C. hominivorax2	AT-----AGATGAAT	TATATATTTAATTTA	ATTAATA-----AGG	ATTTATTATATAATC	ATAAATTTAATTTA	TAATAATTTAATTTA	TAATAATTTAATTTA	TAATAATTTAATTTA	TAATAATTTAATTTA	TAATAATTTAATTTA	TAATAATTTAATTTA	TAATAATTTAATTTA	670
C. macellaria1	AT-----AGATGAAT	TATATATTTAATTTA	ATTAATA-----AGG	ATTTATTATATAATC	ATAAATTTAATTTA	TAATAATTTAATTTA	TAATAATTTAATTTA	TAATAATTTAATTTA	TAATAATTTAATTTA	TAATAATTTAATTTA	TAATAATTTAATTTA	TAATAATTTAATTTA	665
C. macellaria2	AT-----AGATGAAT	TATATATTTAATTTA	ATTAATA-----AGG	ATTTATTATATAATC	ATAAATTTAATTTA	TAATAATTTAATTTA	TAATAATTTAATTTA	TAATAATTTAATTTA	TAATAATTTAATTTA	TAATAATTTAATTTA	TAATAATTTAATTTA	TAATAATTTAATTTA	661
C. megacephala1	TT-----AAATGAAT	TATATATTTAATTTT	TTATATAT-----ATA	ATAAATAAATAAATAA	ATAAATAAATAAATAA	ATAAATAAATAAATAA	ATAAATAAATAAATAA	ATAAATAAATAAATAA	ATAAATAAATAAATAA	ATAAATAAATAAATAA	ATAAATAAATAAATAA	ATAAATAAATAAATAA	658
C. megacephala2	TT-----AAATGAAT	TATATATTTAATTTT	TTATATAT-----ATA	ATAAATAAATAAATAA	ATAAATAAATAAATAA	ATAAATAAATAAATAA	ATAAATAAATAAATAA	ATAAATAAATAAATAA	ATAAATAAATAAATAA	ATAAATAAATAAATAA	ATAAATAAATAAATAA	ATAAATAAATAAATAA	659
P. eximia1	ATTTAGAAAATGTTT	TATATTTAATATTTT	TTTAAAA-----AAA	AAGAAAAAATAAATAA	AAGAAAAAATAAATAA	AAGAAAAAATAAATAA	AAGAAAAAATAAATAA	AAGAAAAAATAAATAA	AAGAAAAAATAAATAA	AAGAAAAAATAAATAA	AAGAAAAAATAAATAA	AAGAAAAAATAAATAA	660
P. eximia2	ATTTAGAAAATGTTT	TATATTTAATATTTT	TTTAAAA-----AAA	AAGAAAAAATAAATAA	AAGAAAAAATAAATAA	AAGAAAAAATAAATAA	AAGAAAAAATAAATAA	AAGAAAAAATAAATAA	AAGAAAAAATAAATAA	AAGAAAAAATAAATAA	AAGAAAAAATAAATAA	AAGAAAAAATAAATAA	652
D. hominis1	AAAT-----AAATGATA	TCTTTTTTAAATTA	AAAAAAACATGAAA	ATTATATTGAAAAA	ACAAAAATTTTAAAT	ATTGATAAATTTTCA	-----	-----	-----	-----	-----	-----	795
D. hominis2	AAAT-----AAATGATA	TCTTTTTTAAATTA	AAAAAAACATGAAA	ATTATATTGAAAAA	ACAAAAATTTTAAAT	ATTGATAAATTTTCA	-----	-----	-----	-----	-----	-----	795
	811	825	826	840	841	855	856	870	871	885	886	900	
C. hominivorax1	-----AAAAAATAA	A-----	-----	-----	-----	TTTATAAAT	T-----TATTAT	AAATTTT-----	701				
C. hominivorax2	-----AAAAAATAA	A-----	-----	-----	-----	TTTATAAAT	T-----TATTAT	AAATTTT-----	708				
C. macellaria1	-----AAAAAATAA	AAAAACTAG-----	-----	-----	-----	TTGAGTTAAAAAT	TG-----AATTTTTC	TAAATTT-----	719				
C. macellaria2	NAAAAAAATAAATAA	AAAAACTAG-----	-----	-----	-----	TTGAGTTAAAAAT	TG-----AATTTTTC	TAAATTT-----	716				
C. megacephala1	-----T	A-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	678				
C. megacephala2	-----T	A-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	679				
P. eximia1	-----AATATATTC	ATG-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	695				
P. eximia2	-----AATATATTC	ATG-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	687				
D. hominis1	TTTAAAAAATAAATAA	AAAAAAATGAATTT	TATATTGAAGAATTT	TGAAAAATTTAAAAAT	TTTAAAAATTTTAA	AAATTTTGTAAAAAT	-----	-----	885				
D. hominis2	TTTAAAAAATAAATAA	AAAAAAATGAATTT	TATATTGAAGAATTT	TGAAAAATTTAAAAAT	TTTAAAAATTTTAA	AAATTTTGTAAAAAT	-----	-----	885				
	901	915	916	930	931	945	946	960	961	975	976	990	
C. hominivorax1	TTACTATTTT-----A	TATTATTAGCTAATT	AAATATATTATA---	-----TATATA	TTATTATATATTTA	ATTATTTATTTTATT	-----	-----	775				
C. hominivorax2	TTACTATTTT-----A	TATTATTAGCTAATT	AAATATATTATA---	-----TATATA	TTATTATATATTTA	ATTATTTATTTTATT	-----	-----	782				
C. macellaria1	TTACTATTTT-----A	AATTATTAATAAATTT	AATTATATTAT---	-----TAATTA	AAATTTATAAATTTA	TTTTTTTTTAATTAGT	-----	-----	792				
C. macellaria2	TTACTATTTT-----A	AATTATTAATAAATTT	AATTATATTAT---	-----TAATTA	AAATTTATAAATTTA	TTTTTTTTTAATTAGT	-----	-----	789				
C. megacephala1	TGTTATTTT-----A	TTATTTTAAATTTT	ATGTTTATTTT---	-----ATTAA	TTTTTAATAAATGTA	TAAATATATATATAT	-----	-----	752				
C. megacephala2	TGTTATTTT-----A	TTATTTTAAATTTT	ATGTTTATTTT---	-----ATTAA	TTTTTAATAAATGTA	TAAATATATATATAT	-----	-----	753				
P. eximia1	TTACTAATTT-----A	ATTTATATATATTA	AAGTAAATTTATA---	-----AATATT	TTATTTAATAAATTT	ATTGTAATATATATA	-----	-----	769				
P. eximia2	TTACTAATTT-----A	ATTTATATATATTA	AAGTAAATTTATA---	-----AATATT	TTATTTAATAAATTT	ATTGTAATATATATA	-----	-----	761				
D. hominis1	TTGCAAAATTTTGA	TTTTTTTTTCATTA	AAATTTTATCTTTTT	AAGAAAAATGAAAAA	TGTTTCATATATATA	TATATATTATATAAT	-----	-----	975				
D. hominis2	TTGCAAAATTTTGA	TTTTTTTTTCATTA	AAATTTTATCTTTTT	AAGAAAAATGAAAAA	TGTTTCATATATATA	TATATATTATATAAT	-----	-----	975				
	991	1005	1006	1020	1021	1035	1036	1050	1051	1065	1066	1080	
C. hominivorax1	AAATAAATATAGGGG	TTTATTTA-TTATAA	TATAAAATTTAATGTA	-TTAATTTTCATTG-	GAATTTATT-----	-----AATTTTCATT	-----	-----	851				
C. hominivorax2	AAATAAATATAGGGG	TTTATTTA-TTATAA	TATAAAATTTAATGTA	-TTAATTTTCATTG-	GAATTTATT-----	-----AATTTTCATT	-----	-----	858				
C. macellaria1	AAATAAATATAGGGG	TTTATTTA-TTATAA	TATAAAATTTAATGTA	-TTAATTTTCATTG-	GAATTTATT-----	-----AATTTTCATT	-----	-----	879				
C. macellaria2	AAATAAATATAGGGG	TTTATTTA-TTATAA	TATAAAATTTAATGTA	-TTAATTTTCATTG-	GAATTTATT-----	-----AATTTTCATT	-----	-----	876				
C. megacephala1	ATATTATTGTAGGGG	-----ATAA	TATAAATATGATATA	-AAATAATACATGG-	TATTTTATT-----	-----	-----	808					
C. megacephala2	ATATTATTGTAGGGG	-----ATAA	TATAAATATGATATA	-AAATAATACATGG-	TATTTTATT-----	-----	-----	809					
P. eximia1	AAGTTATTAG-GGGA	TAACATAA-ATTTT	TATGATATGAGTATT	-TACCAATTTATAAT	TATTTTAAAT-----	-----AATTTAAGAAA	-----	846					
P. eximia2	AAGTTATTAG-GGGA	TAACATAA-ATTTT	TATGATATGAGTATT	-TACCAATTTATAAT	TATTTTAAAT-----	-----AATTTAAGAAA	-----	838					
D. hominis1	ATTTTAATATATATA	TAAATCAATATATAT	TTATATATGATATA	CATATATTACTTAA	TTTATTATTATAAT	TATTTTATATTAAT	-----	1065					
D. hominis2	ATTTTAATATATATA	TAAATCAATATATAT	TTATATATGATATA	CATATATTACTTAA	TTTATTATTATAAT	TATTTTATATTAAT	-----	1065					
	1081	1095	1096	1110	1111	1125	1126	1140	1141	1155	1156	1170	
C. hominivorax1	GAA-----	TTTATTATTATGGGA	GG---TATTACCAAA	TTTAAATTATTATT	TAAT--TTTACATT	AAAAATTAATTTTT-	-----	-----	924				
C. hominivorax2	GAA-----	TCTATTATTATGGGA	GG---TATTACCAAA	TTTAAATTATTATT	TAAT--TTTACATT	AAAAATTAATTTTT-	-----	-----	931				
C. macellaria1	TTATAAT-----TA	TCTATTTTATAAAT	ATTT-TATAAATCTA	TTTTTATTATTAATA	TATA--AATTTAAT	AGTTATTAAATTTTAT	-----	-----	960				
C. macellaria2	TTATAAT-----TA	TCTATTTTATAAAT	ATTT-TATAAATCTA	TTTTTATTATTAATA	TATA--AATTTAAT	AGTTATTAAATTTTAT	-----	-----	957				
C. megacephala1	-----	-----TGTAACAGGA	GT---ATTTACCAAT	TTATAATTATTTAGA	AATA--GTTTAATTC	TATTAATATATAATT-	-----	-----	872				
C. megacephala2	-----	-----TGTAACAGGA	GT---ATTTACCAAT	TTATAATTATTTAGA	AATA--GTTTAATTC	TATTAATATATAATT-	-----	-----	873				
P. eximia1	AT-----	TTTATTAATAAATAA	ATAAATAAATTACTAA	TTTTTATTATTAATA	ACTAT-AATTAATTT	ATTTATTATTTTTT-	-----	-----	922				
P. eximia2	AT-----	TTTATTAATAAATAA	ATAAATAAATTACTAA	TTTTTATTATTAATA	ACTAT-AATTAATTT	ATTTATTATTTTTT-	-----	-----	914				
D. hominis1	TTAAAAAGTATTATT	TAAATTATTATTAAT	TTATTTATTTTAT	TTTATATTAAATATA	ATAAATAAATAAAT	TATTTATTAATTTAT	-----	1155					
D. hominis2	TTAAAAAGTATTATT	TAAATTATTATTAAT	TTATTTATTTTAT	TTTATATTAAATATA	ATAAATAAATAAAT	TATTTATTAATTTAT	-----	1155					
	1171	1185	1186	1200	1201	1215	1216	1230	1231	1245	1246	1260	
C. hominivorax1	--ATTATT-TAAATA	TTATAAATAAGTAA	AT-TATATGTTTTAT	AATTATA-----	-----ATTAAA	TTATTAAATTTTAAAT	-----	-----	993				
C. hominivorax2	--MTTATT-TAAATA	TTATAAATAAGTAA	AT-TATATATTTTTAT	AATTATA-----	-----ATTAAA	TTATTAAATTTTAAAT	-----	-----	1000				
C. macellaria1	AAATTATT-TTTGAG	AAATTGGAGCTGTTAA	AAATAGGGGTATCAA	AAATCTA-----	-----ACAGTA	CGGTGCAGAGATTTT	-----	-----	1032				
C. macellaria2	AAATTATT-TTTGAG	AAATTGGAGCTGTTAA	AAATAGGGGTATCAA	AAATCTA-----	-----ACAGTA	CGGTGCAGAGATTTT	-----	-----	1029				
C. megacephala1	-----	AAATAGGAATGTAAT	AT-----TATTACAT	GATTT-----	-----	-----	-----	-----	902				
C. megacephala2	-----	AAATAGGAATGTAAT	AT-----TATTACAT	GATTT-----	-----	-----	-----	-----	902				
P. eximia1	--ATTATT-TTAATA	AAATAAAGAGTAAAT	ATTAATAGGGGTAAAT	ATTTT-----	-----ATTAAT	TTATTAAATG-AAAT	-----	-----	989				
P. eximia2	--ATTATT-TTAATA	AAATAAAGAGTAAAT	ATTAATAGGGGTAAAT	ATTTT-----	-----ATTAAT	TTATTAAATG-AAAT	-----	-----	981				
D. hominis1	AAATTATTGTTTGTAT	TTTTATGTAGTTTTT	ATTAGTGATTTTTAT	TATTAATTTAAATAT	TTAAATATTAAATATA	ATGATAATATAAATA	-----	-----	1245				
D. hominis2	AAATTATTGTTTGTAT	TTTTATGTAGTTTTT	ATTAGTGATTTTTAT	TATTAATTTAAATAT	TTAAATATTAAATATA	ATGATAATATAAATA	-----	-----	1245				

Figura 8. (continuação) correspondem aos genes adjacentes à região controle, tRNA^{Leu} e rRNA 12S, e não fazem parte dos domínios específicos, estando eventualmente incluídas para facilitar a diagramação da figura. As seqüências características do domínio A ocorrem nos primeiros 580 nucleotídeos da porção 5' da

Domínio B (continuação)

	1261	1275	1276	1290	1291	1305	1306	1320	1321	1335	1336	1350	
C. hominivorax1	ATGTTATAA-AGAAT	TTAATATTTAATAAT	TATG-ATTTT----							-----TGTGTAT-			1038
C. hominivorax2	ATGTTATAA-AGAAT	TTAATATTTAATAAT	TATG-ATTTT----							-----TGTGTAT-			1045
C. macellaria1	TTGCTCTAATATAGT	TTTCCTTTAAATGGG	TATGAAATTT----							-----TCTGCACG C-			1081
C. macellaria2	TTGCTCTAATATAGT	TTTCCTTTAAATGGG	TATGAAATTT----							-----TCTGCACG C-			1078
C. megacephala1	--ACCCATCAAGGT	AACCCCTTTTCA----	TCAG-----							-----GCAA-			934
C. megacephala2	--ACCCATCAAGGT	AACCCCTTTTCA----	TCAG-----							-----GCAA-			934
P. eximia1	TTTATATATGAGTAA	TTACCAATTTTGTAT	TATTAATAATTT----							-----TATGATTA A-			1038
P. eximia2	TTTATATATGAGTAA	TTACCAATTTTGTAT	TATTAATAATTT----							-----TATAATTA A-			1030
D. hominis1	TTGATATGATTATAT	ATATATATATATATA	TATGTATATTTAATT	GAATATTAGGGGTAT	TTGATTATATACATA	TGTATATATATATAT							1335
D. hominis2	TTGATATGATTATAT	ATATATATATATATA	TATGTATATTTAATT	GAATATTAGGGGTAT	TTGATTATATACATA	TGTATATATATATAT							1335
	1351	1365	1366	1380	1381	1395	1396	1410	1411	1425	1426	1440	
C. hominivorax1	TATATTTAGATTTTA	AG-----	-----TTTAATTTTATA	TTATTACTATTATTA	TTATATT-----	G	GATTTTATTTAATT-						1103
C. hominivorax2	TATATTTAGATTTTA	AG-----	-----TTTAATTTTATA	TTATTACTATTATTA	TTATATT-----	G	GATTTTATTTAATT-						1103
C. macellaria1	TACTGTAGATTTTGG	GGG-----	-----TCCTAATTTTACA	TTGTTTTTAT----	A	TTATATT-----	T	TTTTTCTTCATTTT					1146
C. macellaria2	TACTGTAGATTTTGG	GGG-----	-----TCCTAATTTTACA	TTGTTTTTAT----	A	TTATATT-----	T	TTTTTCTTCATTTT					1143
C. megacephala1	TTCCATTAAGAGTAAG	-----	-----ATTCCTCA	TGTTTACTAA-----									978
C. megacephala2	TTCCATTAAGAGTAAG	-----	-----ATTCCTCA	TGTTTACTAA-----									978
P. eximia1	TTTAAATTTGATATAA	-G-----	-----AAAATTTT	TTATTAGAAA-----									1088
P. eximia2	TTTAAATTTGATATAA	-G-----	-----AAAATTTT	TTATTAGAAA-----									1080
D. hominis1	ATATATATGTTGTG	TGTGTATATATATAT	ATATATTAATTTTATT	TATTTAATAAATTATT	ATATTAGGGGATAT	AATTTTATTAATTTA							1425
D. hominis2	ATATATATGTTGTG	TGTGTATATATATAT	ATATATTAATTTTATT	TATTTAATAAATTATT	ATATTAGGGGATAT	AATTTTATTAATTTA							1425
	1441	1455	1456	1470	1471	1485	1486	1500	1501	1515	1516	1530	
C. hominivorax1	-----AATTGAATTT	TTGAT--AAAAAT--											1129
C. hominivorax2	-----AATTGAATTT	TTGAT--AAAAAT--											1129
C. macellaria1	TTAGTAAGTGTATTT	TTCAATGTTAAAT--											1179
C. macellaria2	TTAGTAAGTGTATTT	TTCAATGTTAAAT--											1176
C. megacephala1	-----	-----											978
C. megacephala2	-----	-----											978
P. eximia1	-----	-----											1096
P. eximia2	-----	-----											1088
D. hominis1	TTTTCATGTATATAT	ATATATGTATATATGTA	TGCATGTATATATAT	TTATATTAAATAAAAT	CGCTGGATTATGTGA	GGAATACTAATGTGA							1515
D. hominis2	TTTTCATGTATATAT	ATATATGTATATATGTA	TGCATGTATATATAT	TTATATTAAATAAAAT	CGCTGGATTATGTGA	GGAATACTAATGTGA							1515
	1531	1545	1546	1560	1561	1575	1576	1590	1591	1605	1606	1620	
C. hominivorax1	TTTTAAAAATATTTA	TTTAATTAATTA-CC	TTTTTTTAAATTTTT	AATAAAGTATAAATTT	TTAATTATTTAAATA	-TATTATTTTATAAT							1217
C. hominivorax2	TTTTAAAAATATTTA	TTTAATTAATTA-CT	TTTTTTTAAATTTTT	AATAAAGTATAAATTT	TTAATTATTTAAATA	-TATTATTTTATAAT							1217
C. macellaria1	TTATATAGATGTAAT	TTTAATGATTA-CT	TTTTTTTAAATTTTT	AATTTAATAAAAAATTT	ATATTATTTT-AAAT	-TATTATTTTATAGT							1265
C. macellaria2	TTATATAGATGTAAT	TTTAATGATTA-CT	TTTTTTTAAATTTTT	AGTTAATAAAAAATTT	ATATTATTTT-AAAT	-TATTATTTTATAGT							1263
C. megacephala1	-----	-----	-----	-----	-----	-----							1022
C. megacephala2	-----	-----	-----	-----	-----	-----							1022
P. eximia1	-----	-----	-----	-----	-----	-----							1167
P. eximia2	-----	-----	-----	-----	-----	-----							1159
D. hominis1	TATTATTAATATTTA	TATATATATTTATCT	AATAAATTTTATTTT	AAAAATTTTGTATT	ATATATAAATATCTA	TATATATTTATTTAT							1605
D. hominis2	TATTATTAATATTTA	TATATATATTTATCT	AATAAATTTTATTTT	AAAAATTTTGTATT	ATATATAAATATCTA	TATATATTTATTTAT							1605
	1621	1635	1636	1650	1651	1665	1666	1680	1681	1695	1696	1710	
C. hominivorax1	TGATGGTATAAAGTT	TTATTTTGCTTGTA	AATT-ATTATTAATT	TAATTTACATGTAAA	TTTTTGTGTGACTTT	TTATTTATTTAAATA							1306
C. hominivorax2	TGATGGTATAAAGTT	TTATTTTGCTTGTA	AATT-ATTATTAATT	TAATTTACATGTAAA	TTTTTGTGTGACTTT	TTATTTATTTAAATA							1307
C. macellaria1	TTATTTGATATAAAGTT	TTATTTTGCTTGTA	AATT-ATTATTAATT	TAATTTATATGTAAA	TTTTTGTGTGAAATTT	TTATTTATTTTAAATA							1355
C. macellaria2	TTATTTGATATAAAGTT	TTATTTTGCTTGTA	AATT-ATTATTAATT	TAATTTATATGTAAA	TTTTTGTGTGAAATTT	TTATTTATTTTAAATA							1353
C. megacephala1	TTATTTGATATAAAGTT	TTATTTTGCTTGTA	AGTTTATTTATAGTT	TAATTTATATGTAAA	TTTTTGTGTGAAATTT	TTACTTATTTTAAATA							1112
C. megacephala2	TTATTTGATATAAAGTT	TTATTTTGCTTGTA	AGTTTATTTATAGTT	TAATTTATATGTAAA	TTTTTGTGTGAAATTT	TTATTTATTTTAAATA							1112
P. eximia1	TAGTGGTATAAAGTT	TTATTTTGCTTGTA	AATT-ATTATTAATT	TAATTTATATGTAAA	TTTTTATATGAATAT	TTATTTATTTTAAATA							1257
P. eximia2	TAGTGGTATAAAGTT	TTATTTTGCTTGTA	AATT-ATTATTAATT	TAATTTATATGTAAA	TTTTTATATGAATAT	TTATTTATTTTAAATA							1249
D. hominis1	TAAATTAATAAAGTT	TTATTTTGCTTATA	AATT-ATTATTAATT	TAATTTATATGTAAA	TTTTTGTGTGAAATTT	TTATTTATTTTAAATA							1695
D. hominis2	TAAATTAATAAAGTT	TTATTTTGCTTATA	AATT-ATTATTAATT	TAATTTATATGTAAA	TTTTTGTGTGAAATTT	TTATTTATTTTAAATA							1695
	1711	1725	1726	1740	1741	1755	1756	1770	1771	1785	1786	1800	
C. hominivorax1	ATAAATAAGTTAATT	GTATTCGCAGTAATT	AGTATTATTAATTTAA	GGAAACTTAGAAATA	GTAATATTAAAGAGT	ATTGACAAAATTCGT							1396
C. hominivorax2	ATAAATAAGTTAATT	GTATTCGCAGTAATT	AGTATTATTAATTTAA	GGAAACTTAGAAATA	GTAATATTAAAGAGT	ATTGACAAAATTCGT							1397
C. macellaria1	GTAAATAAATTAATT	TTATTCGCAGTAATT	AATATTATTAATTTAA	GGAAACTTAGAAATA	GTAATACTAAAGAGT	ATTGACAAAATTCGT							1445
C. macellaria2	GTAAATAAATTAATT	TTATTCGCAGTAATT	AATATTATTAATTTAA	GGAAACTTAGAAATA	GTAATACTAAAGAGT	ATTGACAAAATTCGT							1443
C. megacephala1	ATAAATAAATTAATT	TTATTCGCAGTAATT	AATATTATTAATTTAG	GGAAACTTAGAAATA	GTAATACTAAAGAGT	ATTGACAAAATTCGT							1202
C. megacephala2	ATAAATAAATTAATT	TTATTCGCAGTAATT	AATATTATTAATTTAG	GGAAACTTAGAAATA	GTAATACTAAAGAGT	ATTGACAAAATTCGT							1202
P. eximia1	ACAAATAAATTTTAT	TTATTCGCAGTAATT	AATATTATTAATTTAA	GGAAACTTAGAAATA	GTAATACTAAAGAGT	ATTGACAAAATTCGT							1347
P. eximia2	ACAAATAAATTTTAT	TTATTCGCAGTAATT	AATATTATTAATTTAA	GGAAACTTAGAAATA	GTAATACTAAAGAGT	ATTGACAAAATTCGT							1339
D. hominis1	ATGATAAAATTTTAT	TTAATCGCAGTAATT	AATTTTATTAATTTAA	GGAAACTTAGAAATA	GTAATATTAAAGAGT	ATTGACAAAATTCGT							1785
D. hominis2	ATGATAAAATTTTAT	TTAATCGCAGTAATT	AATTTTATTAATTTAA	GGAAACTTAGAAATA	GTAATATTAAAGAGT	ATTGACAAAATTCGT							1785
	1801	1807											
C. hominivorax1	GCCAGC-	1402											
C. hominivorax2	GCCAGC-	1403											
C. macellaria1	GCCAGCA	1452											
C. macellaria2	GCCAGCA	1450											
C. megacephala1	GCCAGC-	1208											
C. megacephala2	GCCAGC-	1208											
P. eximia1	GCCA---	1351											
P. eximia2	GCCAGC-	1345											
D. hominis1	GCCAGCA	1792											
D. hominis2	GCCAGCA	1792											

rRNA12S

Figura 8. (continuação) região controle.

Tabela 6 - Região Controle: Estimativas de Substituições Nucleotídicas e Divergência Nucleotídica Entre as Espécies. Os eventos de transversões do tipo A ↔ T estão assinalados em negrito.

Espécies/Clones	ns/nv	Transições		Transversões				ns+nv	Total	ns+nv/Total
		AG	TC	AT	AC	TG	CG			
ChC1 X ChC2	*	3	9	0	0	0	0	12	1165	0.010
ChC1 X CmC1	0.417	40	30	128	14	24	2	238	1160	0.205
ChC1 X CmC2	0.313	42	27	127	14	24	2	236	1156	0.204
ChC1 X CmegC1	0.209	25	26	205	16	22	1	295	973	0.303
ChC1 X CmegC2	0.196	24	24	204	16	24	1	293	974	0.300
ChC1 X PeC1	0.199	38	21	247	22	24	3	355	1103	0.322
ChC1 X PeC2	0.178	37	17	253	22	26	2	357	1096	0.326
ChC1 X DhC1	0.190	44	26	315	14	36	3	438	1166	0.376
ChC1 X DhC2	0.190	44	26	315	14	36	3	438	1166	0.376
ChC2 X CmC1	0.412	44	26	129	14	24	3	240	1160	0.207
ChC2 X CmC2	0.408	46	23	128	14	24	3	238	1158	0.206
ChC2 X CmegC1	0.205	25	25	204	17	22	1	294	974	0.302
ChC2 X CmegC2	0.192	24	23	203	17	24	1	292	975	0.299
ChC2 X PeC1	0.199	39	20	247	21	26	3	356	1101	0.323
ChC2 X PeC2	0.175	37	16	253	21	27	2	356	1092	0.326
ChC2 X DhC1	0.190	46	24	312	15	37	4	438	1166	0.376
ChC2 X DhC2	0.190	46	24	312	15	37	4	438	1166	0.376
CmC1 X CmC2	1.333	2	2	3	0	0	0	7	1218	0.006
CmC1 X CmegC1	0.193	27	22	211	17	25	1	303	973	0.311
CmC1 X CmegC2	0.180	27	19	211	17	27	1	302	974	0.310
CmC1 X PeC1	0.252	47	30	243	30	31	1	382	1114	0.343
CmC1 X PeC2	0.246	48	28	246	30	32	1	385	1106	0.348
CmC1 X DhC1	0.232	56	35	314	31	45	3	484	1216	0.398
CmC1 X DhC2	0.232	56	35	314	31	45	3	484	1216	0.398
CmC2 X CmegC1	0.197	29	21	211	18	24	1	304	971	0.313
CmC2 X CmegC2	0.184	29	18	211	18	26	1	303	972	0.312
CmC2 X PeC1	0.256	49	29	243	31	30	1	383	1112	0.344
CmC2 X PeC2	0.249	50	27	246	31	31	1	386	1103	0.350
CmC2 X DhC1	0.235	58	34	313	32	44	3	484	1216	0.398
CmC2 X DhC2	0.235	58	34	313	32	44	3	484	1216	0.398
CmegC1 X CmegC2	1.000	1	2	3	0	0	0	6	979	0.006
CmegC1 X PeC1	0.227	34	24	204	26	23	2	313	969	0.323
CmegC1 X PeC2	0.228	36	22	203	24	24	3	312	961	0.325
CmegC1 X DhC1	0.260	40	33	228	22	29	2	354	978	0.362
CmegC1 X DhC2	0.260	40	33	228	22	29	2	354	978	0.362
CmegC2 X PeC1	0.223	34	23	205	25	24	2	313	970	0.323
CmegC2 X PeC2	0.228	37	21	204	23	24	3	312	962	0.324
CmegC2 X DhC1	0.252	40	31	229	22	29	2	353	978	0.360
CmegC2 X DhC2	0.252	40	31	229	22	29	3	353	978	0.360
PeC1 X PeC2	1.333	8	8	8	0	4	0	28	1116	0.025
PeC1 X DhC1	0.212	45	30	296	25	32	1	429	1119	0.383
PeC1 X DhC2	0.212	45	30	296	25	32	1	429	1119	0.383
PeC2 X DhC1	0.201	43	28	294	24	35	1	425	1110	0.382
PeC2 X DhC2	0.201	43	28	294	24	35	1	425	1110	0.382
DhC1 X DhC2	*	0	0	0	0	0	0	0	1573	*

ns = n° de transições, nv = n° de transversões. ns+nv/Total: divergência nucleotídica entre pares de sequência

2.2.1. Investigando o Domínio A da Região Controle

O alinhamento das sequências parciais do domínio A da região controle (próximo ao tRNA^{Ile}) para todos os clones estudados permitiu a identificação de 7 blocos de sequência conservados, caracterizando sub-domínios específicos, distribuídos de maneira heterogênea pela região A+T destas espécies de dípteros causadores de miíases (Figura 9). Estes sub-domínios conservados foram denominados de CSBs (conserved sequence blocks) de acordo com a nomenclatura adotada a partir da análise comparativa entre sequências provenientes da região controle de mamíferos, onde primeiramente foram observados 3 blocos de sequência conservada (Walberg & Clayton, 1981). Os CSBs descritos neste trabalho (CSBs I – VII) foram identificados primariamente a partir das análises comparativas entre as sequências da região controle das cinco espécies estudadas, independentemente dos CSBs propostos para vertebrados. Estes sub-domínios apresentam padrões de conservação consistentes para a região não-codificadora da molécula de DNAmt nestas espécies. Os elementos estruturais de sequência citados anteriormente se mostram intimamente associados a estas regiões conservadas. A indicação do sítio conservado foi baseada na presença do nucleotídeo consenso em pelo menos um clone de cada espécie.

Os critérios utilizados para a identificação dos sub-domínios conservados ou CSBs no domínio A da região controle foram baseados em características próprias das sequências envolvidas, na distribuição dos sítios conservados e na presença de elementos estruturais associados (Zhang *et al.*, 1995). O CSB I consiste de uma série de poli-Ts, localizado muito próximo ao tRNA^{Ile}, e identificado nesta posição também em espécies de *Drosophila* (Clary & Wolstenholme, 1987, Monforte *et al.*, 1993 e Lewis *et al.*, 1994). O CSB II se caracteriza pela sequência [ATAATTAA] conservada e pela sua posição anterior ao CSB III. Este por sua vez, inclui um longo trecho de repetições em “tandem” [TA(A)]_n, sendo identificados ainda, nas posições nucleotídicas 224 e 251, sítios C e G conservados, respectivamente. O CSB IV se caracteriza por um alto conteúdo de A+T e por incluir repetições [TAA]_n. Novamente um trecho de poli-Ts pode ser identificado no final do CSB V, que inclui ainda sítios conservados C e G nas posições nucleotídicas 413 e 420, respectivamente. Juntamente com o CSB III, o CSB VI se apresenta como um longo trecho de sequência conservada contendo sítios consenso G nas posições nucleotídicas 456, 514, 115 e 522, e sítios consenso C nas posições 498, 525 e 525 (apenas em *P. eximia* esta última posição apresenta uma timina). O CSB VII é bem próximo ao CBS VI, e também contém 2 sítios C e 2 sítios G distribuídos respectivamente nas posições

nucleotídicas 544, 549 e 540, 545, além de um trecho caracterizado pela sequência consenso [CAATATAAA] seguido de um trecho rico em G+A.

CSB I												
	1	15	16	30	31	45	46	60	61	75	76	90
C. megacephala1	AGATTCCCAT--GTT	TTTTTTTTTTTTTT	TTGTTT---TAT-TT	TATAGTAATTT---	TTTTGTGA-TTTAT	TAAATAAAAT---AA						75
C. megacephala2	AGATTCCCAT--GTT	TTTTTTTTTTTTTT	TTGTTT---TAT-TT	TATAGTAATTT---	TTTTGTGA-TTTAT	TAAATAAAAT---AA						75
P. eximia1	GGTTTCTCAT--GTT	TTTTTTTTTTTTTT	TTCTT---TAT-AC	TAA---AATTT---	TTAAAAA-GAAAT	ATTTTTTTTT---AT						72
P. eximia2	GGTTTCCCAT--GTT	TTTTTTTTTTTTTT	---CTT---TAT-AC	TAA---AATTT---	TTAAAAA-AAGTG	TTTTTTTTTT---AT						69
C. hominivorax2	GGATTTCATACGAT	TTTTTTTTTTTTTT	TTTTTATGTATATT	TACTACTATTT---	TTATAAAATAAAA	TATACTAATT---AA						82
C. hominivorax1	GGATTTCATACAA	TTTTTTTTTTTTTT	TTTTAT--GTATATT	TACTACTATTT---	TTATAAAATAAAA	TATACTAATT---AA						80
C. macellaria1	GACTTCCCAT--GTT	TTTTTTTTTTTTTT	---TTT---TAT-TT	TACTACTATTT---	TTATAAAATAAAA	TTAATTATTT---TG						73
C. macellaria2	GACTTCCCAT--GTT	TTTTTTTTTTTTTT	---T---TAT-TT	TACTACTATTT---	TTATAAAATAAAA	TTAATTATTT---TG						71
D. hominis1	---TTTTTTT---TTT	TTTTTTTTTATTTT	ATTGTT---TTTTTT	TAGTGAAATTTAGAA	ATATTATAAATTGAT	TAATTTATTTTAAAT						82
D. hominis2	---TTTTTTT---TTT	TTTTTTTTTATTTT	ATTGTT---TTTTTT	TAGTGAAATTTAGAA	ATATTATAAATTGAT	TAATTTATTTTAAAT						82

CSBII												
	91	105	106	120	121	135	136	150	151	165	166	180
C. megacephala1	CATTATAAA---AT	CTAAATATTAATAAT	TATAAATAGTAAAT	AGTTTATAAATTGAA	A---AAAAATAAATTT	AGATAATTAAATTT						159
C. megacephala2	CATTATAAA---AT	CTAAATATTAATAAT	TATAAATAGTAAAT	AGTTTATAAATTGAA	A---AAAAATAAATTT	AGATAATTAAATTT						159
P. eximia1	TATTATAAATTT---AT	TTACATAATAAAATTT	TA-----GTAATTA	TGATTTTATAAAAAA	A---TTTTTTATATGT	AAATAATTAAATTTT						152
P. eximia2	TATTATAAATTT---AT	TTACATAATAAAATTT	TA-----GTAATTA	TAAATGTTAATGAAAA	A---TTTTTTATATGT	AAATAATTAAATTTT						149
C. hominivorax2	TATTTTATTTTAAAT	TTTAATAATTAAAT	TA-----GTAATTA	ATATTTAATATTTAT	TAAAAATTT-A---TTT	AGATAATTAAATTTT						163
C. hominivorax1	TATTTTATTTTAAAT	TTTAATAATTAAAT	TA-----GTAATTA	ATATTTAATATTTAT	TAAAAATTT-A---TTT	AGATAATTAAATTTT						161
C. macellaria1	TATTTTATTTTAAAT	TTTAATAATTAAAT	TA-----GTAAAAA	AAATAAGTTGTATTT	TATTATTTTA---TTT	AGATAATTAAATTTT						155
C. macellaria2	TATTTTATTTTAAAT	TTTAATAATTAAAT	TA-----GTAAAAA	AAATAAGTTGTATTT	TATTATTTTA---TTT	AGATAATTAAATTTT						153
D. hominis1	AAATTTAATTAGTAT	TTTAATAAAAAAGA	TATAATTTTTTAAT	AAAATTTATGGTTAA	AGTTAATTAAATGT	AAATAATTAAAGTTT						172
D. hominis2	AAATTTAATTAGTAT	TTTAATAAAAAAGA	TATAATTTTTTAAT	AAAATTTATGGTTAA	AGTTAATTAAATGT	AAATAATTAAAGTTT						172

CSB III												
	181	195	196	210	211	225	226	240	241	255	256	270
C. megacephala1	GCATATATATATATA	TATATA---ATTTAT	ATATATT--TATTCA	TATATTTATA-ATAT	ATTAAATTATGAATA	TAATGTTATAAAATTT						243
C. megacephala2	GCATATATATATATA	TATATA---ATTTAT	ATATATT--TATTCA	TATATTTATA-ATAT	ATTAAATTATGAATA	TAATGTTATAAAATTT						243
P. eximia1	GCATATATATATATA	TATATAT--ATTTAT	ATATACT--TATTCA	TATATTTATATATAT	ATTAAAAATGAATA	AACATATAAATATAT						238
P. eximia2	GCATATATATATATA	TATATATAAATTTAT	ATATATT--TATTCA	TATATTTATATATAT	ATTAAAAATGAATA	AACATATAAATATAT						237
C. hominivorax2	GCATATATATATATA	TATATA---ATTTAT	ATATATTATTTATCA	TATATTTATATTTAT	ATTAAAAATGAATA	AATTAATATTTATTTT						250
C. hominivorax1	GCATATATATATATA	TATATATA-ATTTAT	ATATATTATTTATCA	TATATTTATATTTAT	ATTAAAAATGAATA	AATTAATATTTATTTT						250
C. macellaria1	GCATATATATATATA	TATATATA-ATTTAT	ATATATT--TATTCA	TATATTTCTATTTAT	ATTAAAAATGTGACA	AATAGATATTAATTT						242
C. macellaria2	GCATATATATATATA	TATATA---ATTTAT	ATATATT--TATTCA	TATATTTCTATTTAT	ATTAAAAATGTGCTCA	AATAGATATTAATTT						238
D. hominis1	GCATATATATATATA	TATATA---TTTAT	ATATATTAATATACA	TTCATCTATATATAT	ATTAAATTATGTATA	TAATTTTATATTTTTC						258
D. hominis2	GCATATATATATATA	TATATA---TTTAT	ATATATTAATATACA	TTCATCTATATATAT	ATTAAATTATGTATA	TAATTTTATATTTTTC						258

CSB IV												
	271	285	286	300	301	315	316	330	331	345	346	360
C. megacephala1	AAAT--AATTAATAAAT	TATTTATATAAA--AT	TATAAAT--ATAATTC	AC-ATACATTA--TT	AAATTATTTTTTTTAA	AACAATCAATTTCTA						327
C. megacephala2	AAAT--AATTAATAAAT	TATTTATATAAA--AT	TATAAAT--ATAATTC	AC-ATACATTA--TT	AAATTATTTTTTTTAA	AACAGTCAATTTCTA						327
P. eximia1	AAAT--AATTAATAAAT	TATTTATATAAATTA	TATAAAT--AACTATC	CC-ATACATTA--AT	AAATTATTTTTTTTAA	ATAAATCAATTTTCAA						323
P. eximia2	AAAT--AATTAATAAAT	TATTTATATAAATTA	TATAAAT--AACTATC	CC-ATACATTA--AT	AAATTATTTTTTTTAA	ATAAATCAATTTTCAA						322
C. hominivorax2	AAAT--AATTAATAAAT	CATTTATATAAA--AT	TATAAAT--AAATTTA	TCTATCTATAAAGTT	TAATGATTTCAT-AA	TTGATTTAATTTTCCA						336
C. hominivorax1	AAAT--AATTAATAAAT	CATTTATATAAA--AT	TATAAAT--AAATTTA	TCTATCTATAAAGTT	TAATGATTTCAT-AA	TTGATTTAATTTTCCA						336
C. macellaria1	AAAT--AATTAATAAAT	TATTTATATAAT--AT	TATAAAT--AAATGTA	TCTATCTATAAAGTT	TAATAATTTTCAT-AA	TTGATTTAATTTTCCA						328
C. macellaria2	AAAT--AATTAATAAAT	TATTTATATAAT--AT	TATAAAT--AAATGTA	TCTATCTATAAAGTT	TAATAATTTTCAT-AA	TTGATTTAATTTTCCA						324
D. hominis1	ATTTAATAATAAAT	AATTTATATAATA---	TATAAATTTTATTA	TCATTAAATCT--TT	AAAGTAAATATAAAA	TATATAACATTTAGG						343
D. hominis2	ATTTAATAATAAAT	AATTTATATAATA---	TATAAATTTTATTA	TCATTAAATCT--TT	AAAGTAAATATAAAA	TATATAACATTTAGG						343

CSB V												
	361	375	376	390	391	405	406	420	421	435	436	450
C. megacephala1	C--ATAATAATTAGA	TAAATCATTTAAT	AAATATTTAATTA-A	TGATATTTCTTAACGT	GATTT--AAATTTTTT	TTTTTACTCTAAAT						412
C. megacephala2	C--ATAATAATTAGA	TAAATCATTTAAT	AAATATTTAATTA-A	TGATATTTCTTAACGT	GATTT--AAATTTTTT	TTTTTACTCTAAAT						411
P. eximia1	C--ATAATAATTAGA	TAAATATTTAAT	AAAGATTTAATTA-G	TGATATCCTTAATG	AATTT--AAATTTTTT	TTTTG---ATCTAAAT						406
P. eximia2	C--ATAATAATTAGA	TAAATATTTAAT	AAAGATTTAATTA-G	TGATATCCTTAATG	AATTT--AAATTTTTT	TTTTG---ACTAAAT						404
C. hominivorax2	CT-ATAAATTTTATA	GAAATAAAAAATTT	AAAGATTTAGTAACA	TGATATCCTTAACGT	GATTT-GAAATTTTT	TTTTT---ATCTAAAT						422
C. hominivorax1	CT-ATAAATTTTATA	GAAATAAAAAATTT	AAAGATTTAGTAACA	TGATATCCTTAACGT	GATTT-GAAATTTTT	TTTTT---ATCTAAAT						422
C. macellaria1	CT-ATAAACATTATA	TCTATAAAAAATTT	AAAGATTTAGTAACA	TGATATCCTTAACGT	AATTT-GAAATTTTT	TTTTT---ATCTAAAT						414
C. macellaria2	CT-ATAAACATTATA	TCTATAAAAAATTT	AAAGATTTAGTAACA	TGATATCCTTAACGT	AATTT-GAAATTTTT	TTTTT---TCTAAAT						409
D. hominis1	TGGAGAAATAT-ATA	TAAATAATAATTAAT	AAATATTTAATTT-A	AAATATTTCTTAATG	ATCCCGGAAATTTTT	TTTTG--AGTCTGGAT						430
D. hominis2	TGGAGAAATAT-ATA	TAAATAATAATTAAT	AAATATTTAATTT-A	AAATATTTCTTAATG	ATCCCGGAAATTTTT	TTTTG--AGTCTGGAT						430

FIGURA 9 - Alinhamento 2 - Alinhamento obtido para as espécies *C. hominivorax*, *C. macellaria*, *P. eximia*, *C. megacephala* e *D. hominis* a partir de sequências da região controle imediatamente adjacentes ao gene do tRNA^{Ile} (domínio A). Os sub-domínios conservados, diagramaticamente delimitados por quadros com cores distintas, estão identificados através de asteriscos que indicam sítios consenso.

CSB VI													
	451	465	466	480	481	495	496	510	511	525	526	540	
C. megacephala1	TAATAGATATATATT	AATTAATTAATATTT		TATATATTAATAGAT	ATCTATTAATTTTAT	-TTGGTATATAGACC	AAAAATAAATTTTG						501
C. megacephala2	TAATAGATATATATT	AATTAATTAATATTT		TATATATTAATAGAT	ATCTATTAATTTTAT	-TTGGTATATAGACC	AAAAATAAATTTTG						500
P. eximial	TAATAGATATCTATT	AATTAATTAATATTT		TATATATTAATAGAT	ATCTATTAAT-CTAT	ATTGGTATATAGACT	AAAAATTCAGATTTTG						495
P. eximia2	TAATAGATA-CTATT	AATTAATTAATATTT		TATATATTAATAGAT	ATCTATTAAT-CTAT	ATTGGTATATAGACT	AAAAATTCAGATTTTG						492
C. hominivorax2	CAATAGATAAGTATT	GATTAATTAATATTT		TATATATTAATATAT	ATCTATTAATCCTTA-	-TTGGTATATAGACC	AAAAATAAATTTTG						510
C. hominivorax1	TAATAGATAAATATT	GATTAATTAATATTT		TATATATTAATATAT	ACCTATTAATCCTTA-	-TTGGTATATAGACC	AAAAATAAATTTTG						510
C. macelaria1	TAATAGATATATATT	AATTAATTAATATTT		TATATATTAATAAAT	ATCTATTAATTCCTTA	-TTGGTATATGGACC	AAAAATAAATTTTG						503
C. macelaria2	TAATAGATATATATT	AATTAATTAATATTT		TATATATTAATGAAT	ATCTATTAATTCCTTA	TTGGGTATATGGACC	AAAAATAAATTTTG						499
D. homins1	TAATAGATAAATATT	GATTAATTAACACTT		TATATATTAATATTT	ATCTATTAATCCTTA	TTTGGTATATAGACC	TAAAAATAAATTTCTG						520
D. hominis2	TAATAGATAAATATT	GATTAATTAACACTT		TATATATTAATATTT	ATCTATTAATCCTTA	TTTGGTATATAGACC	TAAAAATAAATTTCTG						520

CSB VII													
	541	555	556	570	571								
C. megacephala1	CA-CGCTTCAATATA	AAATT--GG-AGAGG	489										
C. megacephala2	CA-CGCTTCAATATA	AAATT--GG-AGAGG	489										
P. eximial	CA-CGCTTCAATATA	AAATT--TG-AGAGG	483										
P. eximia2	CA-CGCTTCAATATA	AAATT--TG-AGAGG	480										
C. hominivorax2	CA-CGCTTCAATATA	AAAAT--GG-AGAGG	499										
C. hominivorax1	CA-CGCTTCAATATA	AAAAT--GG-AGAGG	499										
C. macelaria1	CA-CGCTTCAATATA	AAAAT--GG-AGAGG	491										
C. macelaria2	CA-CGCTTCAATATA	AAAAT--GG-AGAGG	487										
D. homins1	TAACGGT-CAATATA	AATTTATGGTATAAT	550										
D. hominis2	TAACGGT-CAATATA	AATTTATGGTATAAT	550										

FIGURA 9 - continuação Alinhamento 2.

3. Análises Filogenéticas a partir da Região Controle

O domínio A da região controle, apesar do seu caráter conservado que restringe a utilização de sítios informativos para a análise filogenética, apresenta um alinhamento mais confiável, proporcionado pela menor incidência de "gaps" (falta ou ausência do caráter). A consistência da inferência filogenética está diretamente associada ao alinhamento específico das sequências homólogas. Outro fator limitante que causa interferência na abordagem filogenética é a ocorrência de homoplasias amplamente distribuídas pela sequência analisada, causada por múltiplos eventos de substituição nucleotídica gerando a reversão do caráter analisado. Neste caso, foram utilizadas as sequências relativas ao domínio A da região controle para minimizar eventos homoplásicos.

Baseado nos dados de sequência para a região controle total e na análise das sequências específicas do domínio A, foram reconstruídas as relações filogenéticas entre as cinco espécies, utilizando-se a estimativa de distância nucleotídica (d) obtida através do método de 2-parâmetros de Kimura (1980). As matrizes de distância utilizadas nas análises de "Neighbor-joining" (NJ) estão descritas nas Tabelas 7 e 8. Foram removidos da análise os sítios contendo "gaps" e/ou ambiguidades.

Tabela 7 - Matriz de Distância Nucleotídica obtida pelo Modelo de 2-Parâmetros de Kimura (diagonal superior) e desvio padrão (diagonal inferior) na análise da região controle do genoma mitocondrial (domínios A e B).

Espécies/Clones	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)
1. <i>C. hominivorax</i> Clone 1		0.0085	0.2058	0.2044	0.3859	0.3827	0.4232	0.4323	0.5065	0.5060
2. <i>C. hominivorax</i> Clone 2	0.0030		0.2044	0.2030	0.3843	0.3811	0.4230	0.4323	0.5042	0.5042
3. <i>C. macellaria</i> Clone 1	0.0164	0.0163		0.0074	0.4055	0.4022	0.4366	0.4394	0.5184	0.5184
4. <i>C. macellaria</i> Clone2	0.0163	0.0163	0.0028		0.4091	0.4058	0.4403	0.4431	0.5180	0.5180
5. <i>C. megacephala</i> Clone1	0.0256	0.0255	0.0268	0.0269		0.0053	0.4258	0.4241	0.4961	0.4961
6. <i>C. megacephala</i> Clone 2	0.0255	0.0254	0.0266	0.0268	0.0024		0.4241	0.4241	0.4924	0.4924
7. <i>P. eximia</i> Clone 1	0.0275	0.0275	0.0280	0.0282	0.0275	0.0275		0.0279	0.5225	0.5225
8. <i>P. eximia</i> Clone 2	0.0282	0.0282	0.0283	0.0284	0.0275	0.0275	0.0055		0.5252	0.5252
9. <i>D. hominis</i> Clone 1	0.0324	0.0323	0.0328	0.0327	0.0311	0.0309	0.0330	0.0332		0.000
10. <i>D. hominis</i> Clone 2	0.0324	0.0323	0.0328	0.0327	0.0311	0.0309	0.0330	0.0332	0.000	

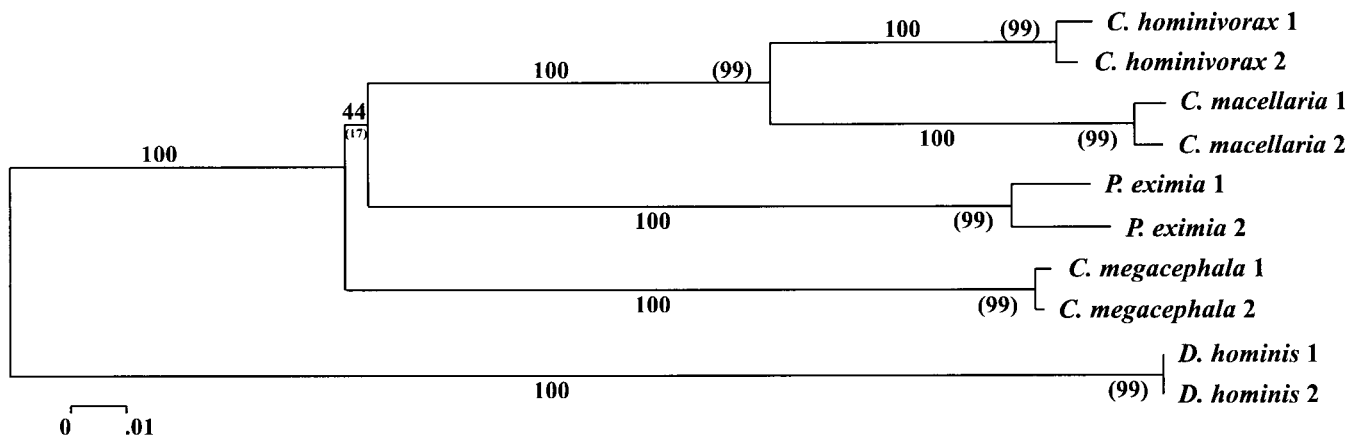
Tabela 8 - Matriz de Distância Nucleotídica obtida pelo Modelo de 2-Parâmetros de Kimura (diagonal superior) e desvio padrão (diagonal inferior) na análise das sequências do domínio A da região controle.

Espécies/Clones	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)
1. <i>C. hominivorax</i> Clone 1		0.0104	0.1278	0.1254	0.2538	0.2510	0.2622	0.2657	0.3943	0.3943
2. <i>C. hominivorax</i> Clone 2	0.0047		0.1254	0.1230	0.2510	0.2482	0.2593	0.2629	0.3910	0.3910
3. <i>C. macellaria</i> Clone 1	0.0173	0.0172		0.0104	0.2779	0.2750	0.2619	0.2650	0.4082	0.4082
4. <i>C. macellaria</i> Clone2	0.0172	0.0170	0.0047		0.2809	0.2781	0.2649	0.2680	0.4045	0.4045
5. <i>C. megacephala</i> Clone1	0.0264	0.0262	0.0281	0.0283		0.0041	0.2516	0.2603	0.3896	0.3896
6. <i>C. megacephala</i> Clone 2	0.0262	0.0261	0.0280	0.0282	0.0029		0.2544	0.2631	0.3863	0.3863
7. <i>P. eximia</i> Clone 1	0.0269	0.0267	0.0268	0.0270	0.0264	0.0266		0.0316	0.3973	0.3973
8. <i>P. eximia</i> Clone 2	0.0272	0.0271	0.0271	0.0273	0.0270	0.0271	0.0082		0.3979	0.3979
9. <i>D. hominis</i> Clone 1	0.0359	0.0357	0.0368	0.0365	0.0354	0.0352	0.0360	0.0361		0.0000
10. <i>D. hominis</i> Clone 2	0.0359	0.0357	0.0368	0.0365	0.0354	0.0352	0.0360	0.0361	0.0000	

As árvores de Maxima Parcimônia (MP) (Fitch, 1971) foram obtidas a partir do método de "branch-and-bound", apropriado para acessar a árvore mais parcimoniosa entre conjuntos de até 10 unidades comparativas, neste caso representados pelos clones (Fig 10b e 11b). A espécie *D. hominis* representou o grupo externo nestas análises.

Ambos os métodos empregados, NJ e MP, resolveram as relações filogenéticas entre as espécies estudadas resultando árvores com topologias idênticas para um mesmo conjunto de sequências analisadas, mas apresentaram divergências devido à natureza das sequências utilizadas. As sequências do domínio A geraram árvores onde a espécie geneticamente mais próxima ao gênero *Cochliomyia* foi *P. eximia*. Entretanto, as árvores derivadas da análise dos dados completos de sequência, incluindo os domínios A e B, resultaram em uma topologia diferente, onde *C. megacephala* ocupa uma posição adjacente ao ramo das *Cochliomyia*.

a.



b.

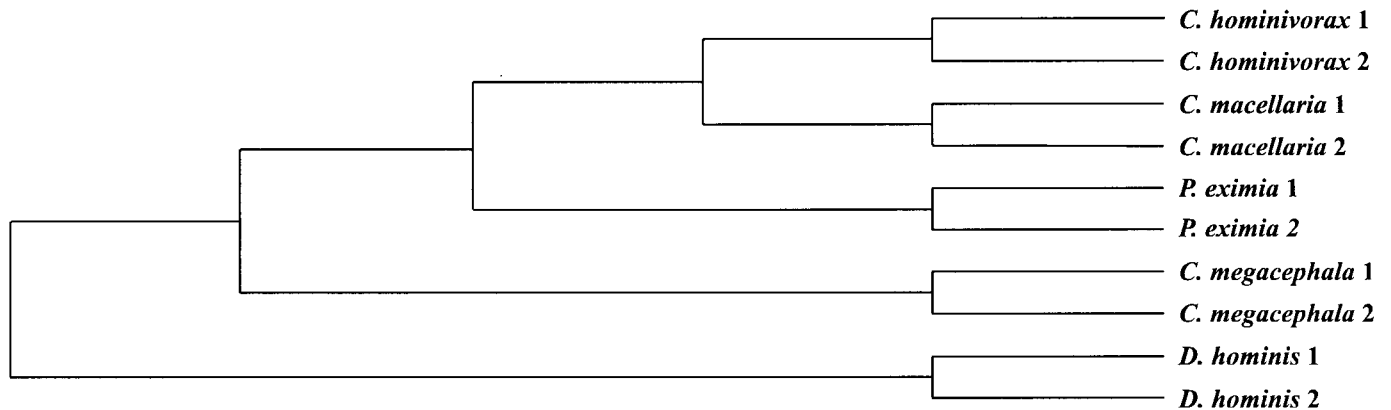


Figura 11- a) Árvore de Neighbor-joining obtida através da análise das sequências parciais da região controle utilizando o modelo Kimura 2-parâmetros. Os valores de BCL (“bootstrap confidence level”) e, entre parênteses, CP (“confidence level for t-test”) estão indicados na figura. **b)** Árvore de Máxima Parcimônia obtida por análise de “branch and bound” das sequências parciais da região controle das espécies causadoras de miíases estudadas.

4. Análise da Formação de Estruturas Secundárias na Região Controle

O domínio A da região controle de *C. hominivorax*, *C. macellaria*, *P. eximia*, *C. megacephala* e *D. hominis* foi analisado com relação ao potencial de formação de estruturas secundárias. Através dos programas PCFOLD (Zuker, 1989) e MOLECULE (Lapalme et al, 1982) algumas estruturas potenciais foram identificadas nesta região para estas espécies. Dentre as estruturas produzidas, foram analisadas aquelas sequências onde a formação de grampos tende a ocorrer espontaneamente, formando estruturas energeticamente mais estáveis. A estabilidade energética da estrutura secundária descrita para a região controle do genoma mitocondrial em *Drosophila* também foi determinada para permitir análises comparativas (Figura 12).

4.1. Elementos de sequência

Foram identificados, para cada estrutura secundária potencial, atributos de sequência específicos registrados na literatura (Zhang *et al.*, 1995) como elementos conservados, localizados nas sequências adjacentes à sequência envolvida na formação da estrutura secundária. Estes elementos compreendem uma sequência 3'-[TATA] anterior e uma sequência [G(A)nT]-5' posterior à estrutura (indicados nas figuras 12 a 17). Nem sempre foi possível identificar estes elementos para todas as estruturas descritas. Alças ricas em timina também foram registradas como elementos de sequência importantes (indicadas com setas).

Duas estruturas principais foram descritas para a espécie *C. hominivorax*. Na Estrutura I (Figura 13a) apenas o elemento [TATA] foi identificado. Esta estrutura localiza-se próxima ao longo trecho poli-T e apresenta uma energia livre de -8.2 kcal/mol (Figura 12). A Estrutura II apresenta pelo menos três motivos [TATA] anteriores a sequências formadoras de grampo e um elemento [GAAAT] em uma extremidade envolvida na formação da haste da estrutura secundária (Figura 13b).

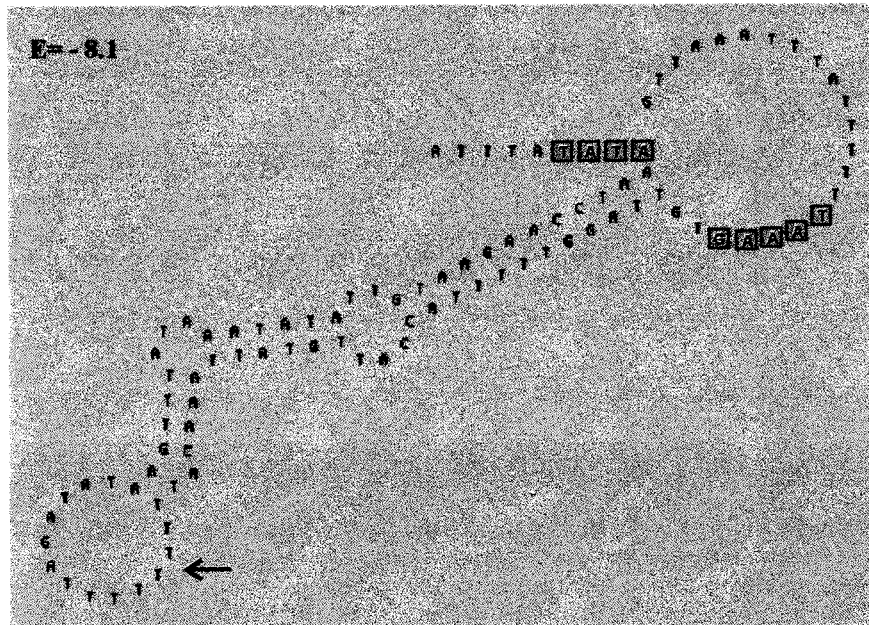
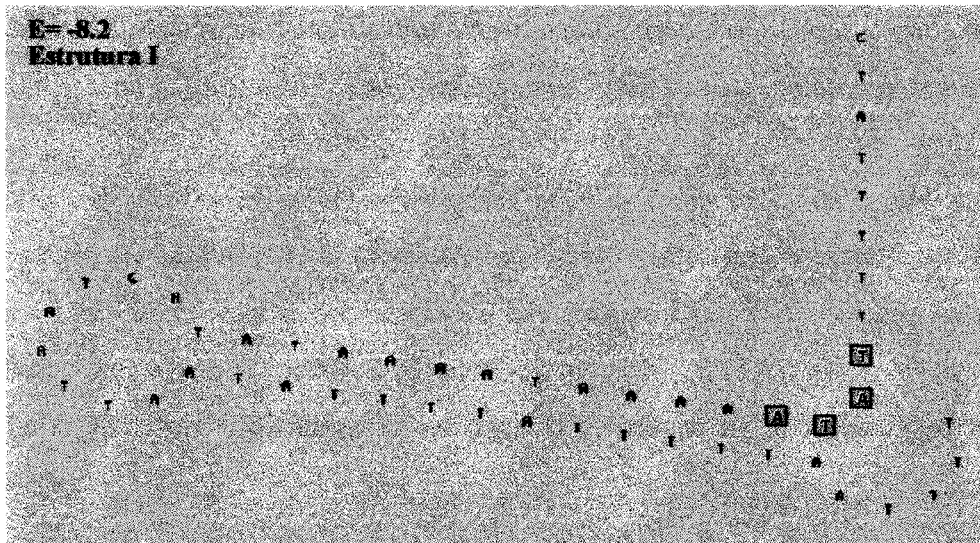


Figura 12- Estruturas secundárias da Região A+T da espécie *D. yakuba*. **a.** A seta está indicando a alça rica em Timina (T-loop) na estrutura. E = Energia livre (kcal/mol). Clary and Wolstenholme, 1987.

E-8.2

Estrutura I



E= -15.0
Estrutura II

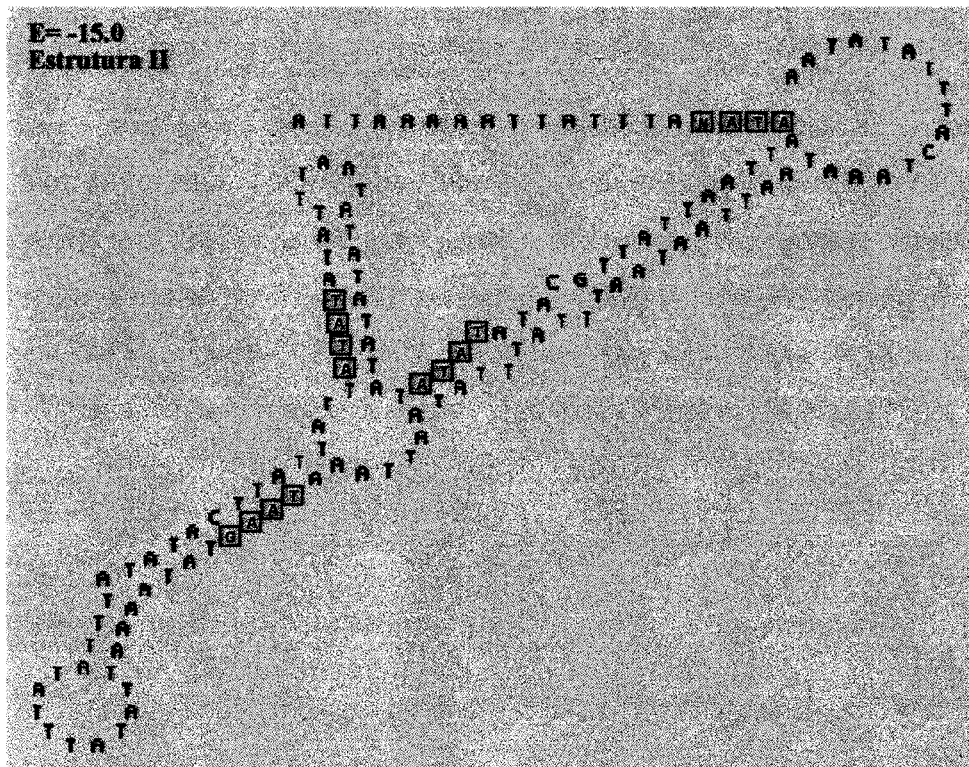


Figura 13- Estruturas secundárias da Região A+T da espécie *C. hominivorax*. **a.** Estrutura I. **b.** Estrutura II. **E** = Energia livre (kcal/mol).

Também foram descritas para *C. macellaria* duas estruturas presentes na região controle. Em ambas as estruturas podem ser identificados os elementos descritos anteriormente, além de uma alça rica em timina na Estrutura I (Figura 14a), também localizada na região próxima ao poli-T.

A Estrutura I de *P. eximia* ocorre em seguida ao poli-T, no início da região controle. Entretanto uma sequência [GTAAT] foi localizada na região onde seria esperado o elemento [G(A)_nT] (Figura 15c), sendo que a ocorrência de um elemento [G(A)₆T] foi encontrada 12 nucleotídeos adiante na sequência. Estão indicados os motivos [TATA] nas três sequências apresentadas (Figura 15), com uma alteração no caso da Estrutura III que possui um motivo [TAAT] (Figura 15b).

Para a espécie *C. megacephala* duas regiões foram descritas como potencialmente formadoras de estruturas secundárias, a primeira (Figura 16b), Estrutura I, apresenta ambos os elementos considerados consenso, sendo que a série [GAAT] integra a porção final da haste do grampo. Na Estrutura II não foi encontrado o elemento [TATA], entretanto uma alça rica em timina está presente conforme mostra a Figura 16a.

Em *D. hominis* ocorre uma estrutura secundária incluindo parte do poli-T, podendo ser identificados os motivos citados anteriormente envolvidos na formação da haste do grampo (Figura 17c) e uma alça rica em timina. As outras duas estruturas descritas para *D. hominis* (II e III) envolvem amplos trechos de sequência nucleotídica (100 - 150 pb), sendo estruturas termodinamicamente muito estáveis (-12.2 e -18.6 kcal/mol, respectivamente, Figuras 17a e b). Ainda na Estrutura III também foram identificados os motivos [TATA] e [GAAAAT].

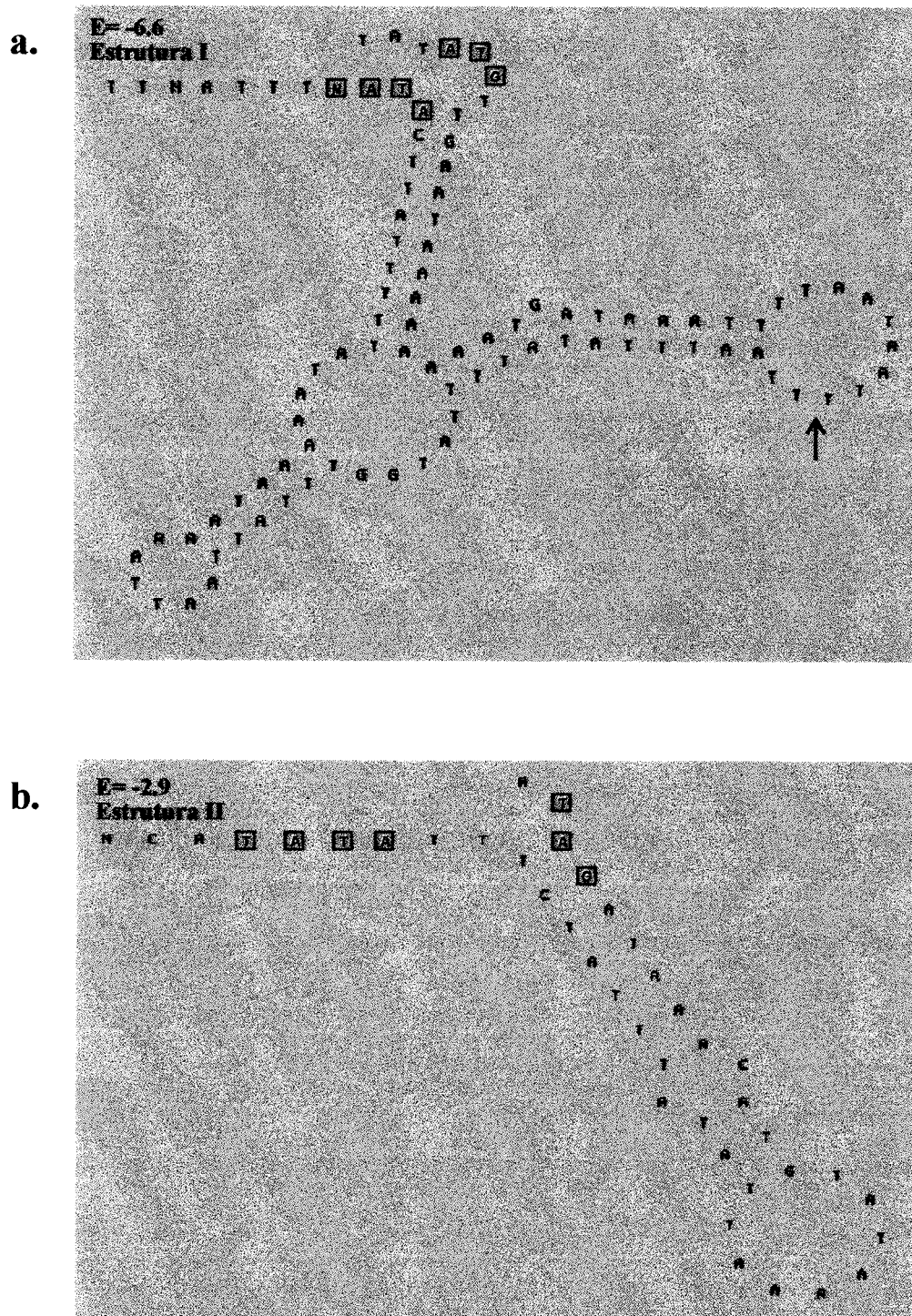
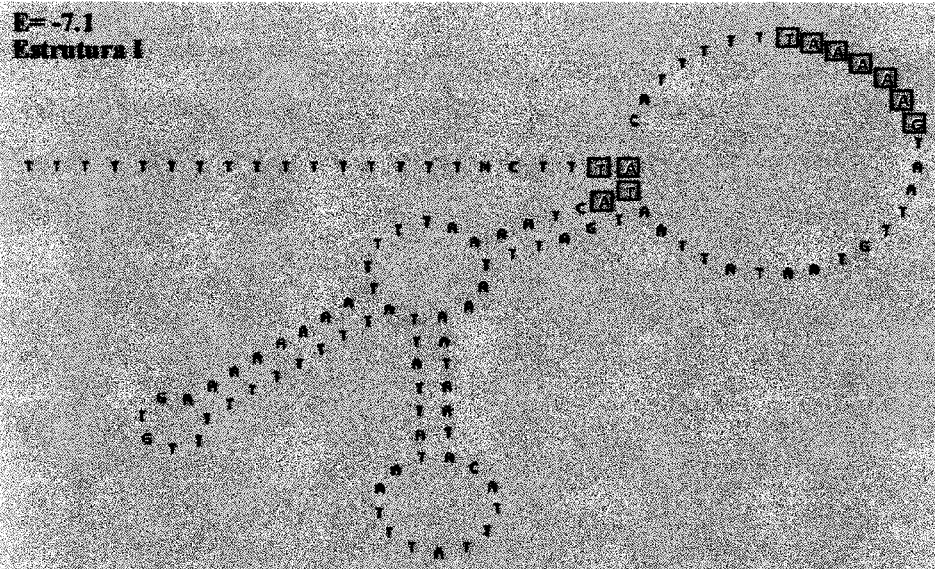
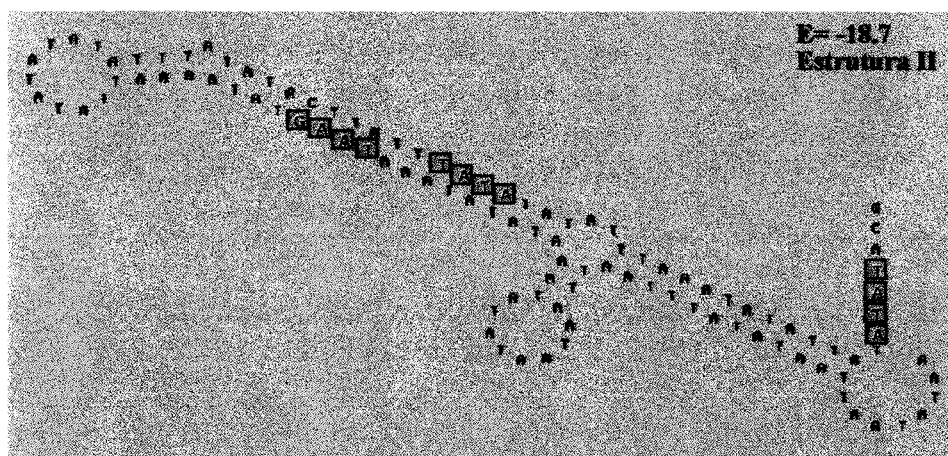


Figura 14- Estruturas secundárias da Região A+T da espécie *C. macellaria*. a. Estrutura I. b. Estrutura II. A seta está indicando a alça rica em Timina (T-loop) na estrutura. E = Energia livre (kcal/mol).

a.



b.



c.

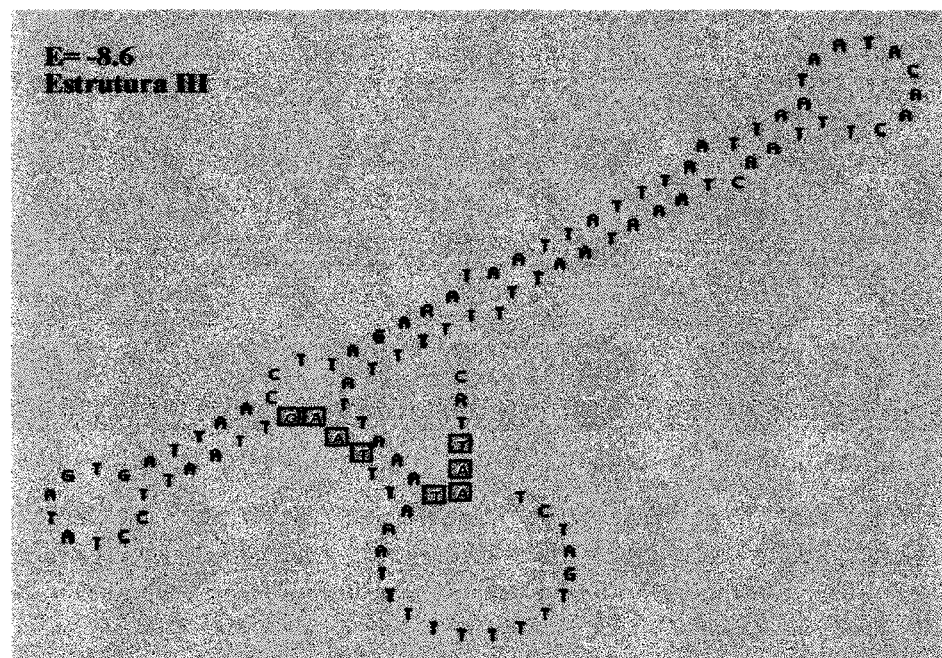


Figura 15- Estruturas secundárias da Região A+T da espécie *P. eximia*. a. Estrutura I. b. Estrutura II. c. Estrutura III. E = Energia livre (kcal/mol).

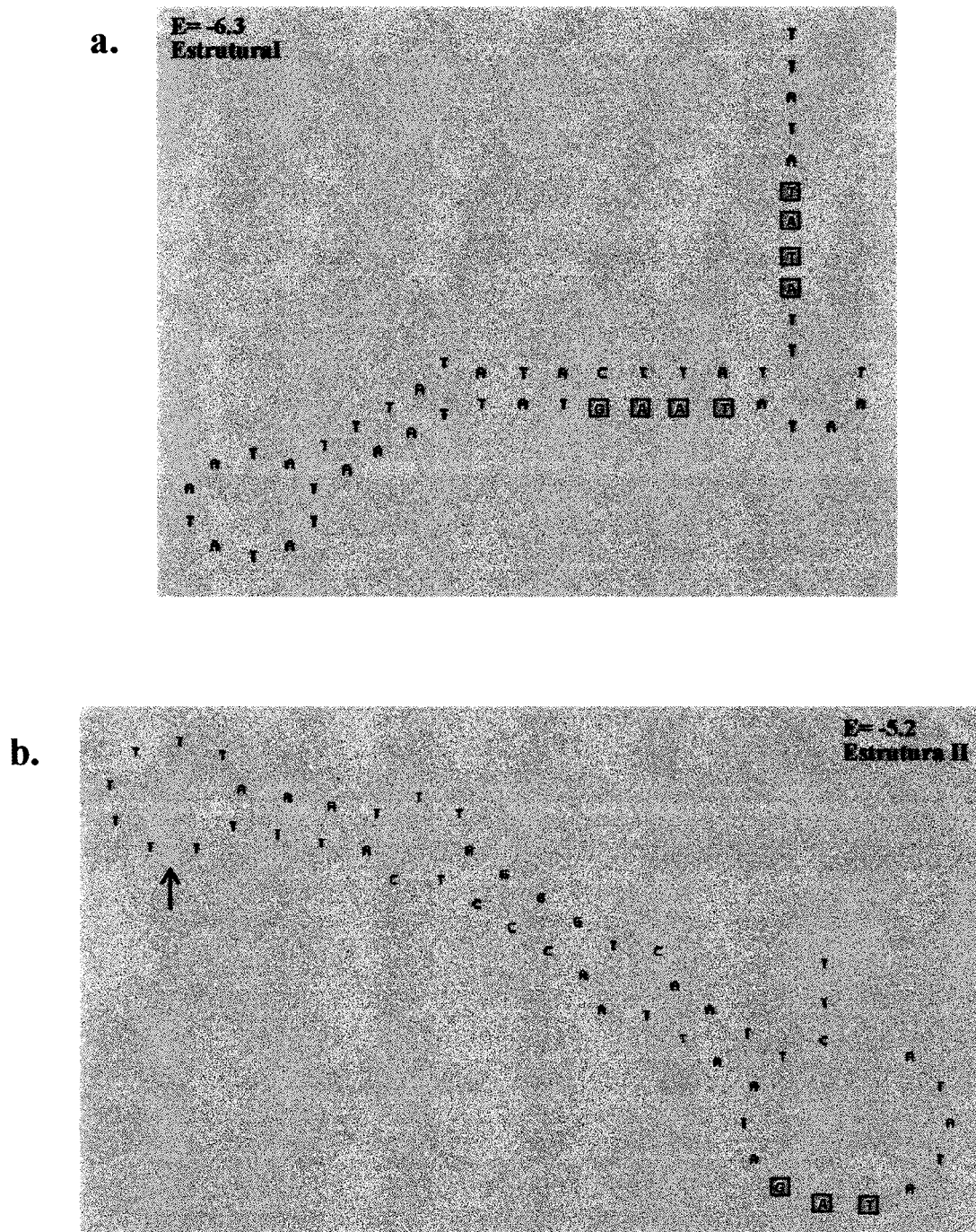


Figura 16- Estruturas secundárias da Região A+T da espécie *C. megacephala*. **a.** Estrutura I. **b.** Estrutura II. A seta está indicando a alça rica em Timina (T-loop) na estrutura. **E** = Energia livre (kcal/mol).

4.2. Associação Entre Sequências Conservadas e Estruturas Secundárias

Todas as estruturas secundárias potenciais descritas neste trabalho estão intimamente associadas com os blocos de sequência conservados identificados para o domínio A da região controle de replicação das espécies analisadas. Não foi possível estabelecer uma correlação precisa entre as estruturas secundárias observadas e os sub-domínios específicos, uma vez que algumas estruturas podem compreender mais de um CSB, dependendo da espécie, o que dificulta a visualização destas estruturas no alinhamento.

Para identificar as possíveis homologias de sequência primária, foi realizado um alinhamento entre as sequências do domínio A da região controle das espécies estudadas com a sequência homóloga da região A+T do genoma de *Drosophila yakuba*. Apesar da distância filogenética entre as espécies comparadas dificultar o alinhamento, foram identificados trechos de sequência consenso significativos associados a todos os CSB caracterizados neste trabalho. Foi observado que a estrutura secundária previamente descrita para *Drosophila* está localizada na região do CSB IV.

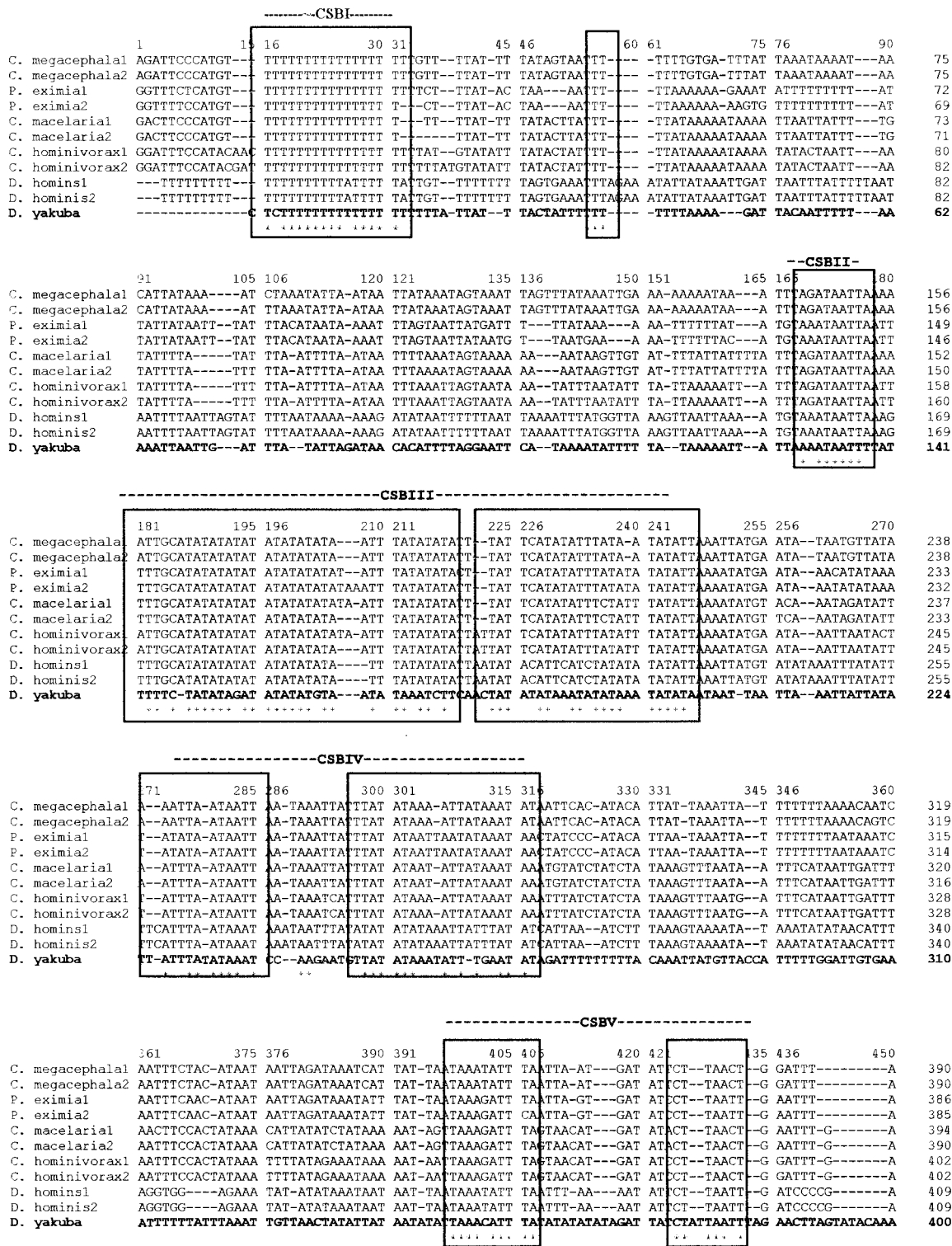


Figura 18. (continuação) - Alinhamento 3 - Alinhamento da região controle (domínio A) das espécies *C. hominivorax*, *C. macellaria*, *P. eximia*, *C. megacephala* e *D. hominis* com a sequência homóloga de *D. yakuba*. Os blocos em azul representam as regiões consenso entre as espécies. A sequência rosa em *D. yakuba* representa a região formadora da estrutura secundária, os elementos [TATA] e [G(A)_nT]

---CBSV---										---CBSVI---									
	451		465	466		480	481		495	496		510	511		525	526		540	
C. megacephala1	AATTTTTTTTTT	---	ACTCTAAATTAATA	GATAT-ATATTAATT	AATTAAATATTATA	TATTA---ATAGATA	TCTA-TTAATTTAT		472										
C. megacephala2	AATTTTTTTTTT	---	ACTCTAAATTAATA	GATAT-ATATTAATT	AATTAAATATTATA	TATTA---ATAGATA	TCTA-TTAATTTAT		471										
P. eximia1	AATTTTTTTTTG	---	ATCTAAATTAATA	GATAT-CTATTAATT	AATTAAATATTATA	TATTA---ATAGATA	TCTA-TTAATCTATA		466										
P. eximia2	AATTTTTTTTTG	---	ACTAAATTAATA	GATA-CTATTAATT	AATTAAATATTATA	TATTA---ATAGATA	TCTA-TTAATCTATA		463										
C. macelaria1	AATTTTTTTTTT	---	ATCTAAATTAATA	GATAT-ATATTAATT	AATTAAATATTATA	TATTA---ATAAATA	TCTA-TTAATCTTA		474										
C. macelaria2	AATTTTTTTTTA	---	TCTAAATTAATA	GATAT-ATATTAATT	AATTAAATATTATA	TATTA---ATGAATA	TCTA-TTAATCTTA		469										
C. hominivorax1	AATTTTTTTTTT	---	ATCTAAATTAATA	GATAA-ATATTGATT	AATTAAATATTATA	TATTA---ATATATA	CCTA-TTAATCCT-A		481										
C. hominivorax2	AATTTTTTTTTT	---	ATCTAAATCAATA	GATAA-GIATTGATT	AATTAAATATTATA	TATTA---ATATATA	TCTA-TTAATCCT-A		481										
D. hominis1	AATTTTTTTTTG	---	AGTCTGGATTAATA	GATAA-ATATTGATT	AATTAAACATTATA	TATTA---ATATTTA	TCTA-TTAATCCTTA		490										
D. hominis2	AATTTTTTTTTG	---	AGTCTGGATTAATA	GATAA-ATATTGATT	AATTAAACATTATA	TATTA---ATATTTA	TCTA-TTAATCCTTA		490										
D. yakuba	AATTTTTTTTTTAAA	AAAAAA	AAAGAATA	GGTTTTTTATTATT	TAT-AAATAATTATT	AATTAGAAAAATTTA	TTTAATTAAATAAT		489										

---CSBVII---																			
	541		555	556		570	571		585	586		600	601		615	616		630	
C. megacephala1	TT-GGTAT--ATAGA	CC-AAAAA	AAATTT	TTGCA-CGCTTCAAT	-ATAAAAT--GG-A	G--AGG-----	-----	-----	527										
C. megacephala2	TT-GGTAT--ATAGA	CC-AAAAA	AAATTT	TTGCA-CGCTTCAAT	-ATAAAAT--GG-A	G--AGGT-----	-----	-----	527										
P. eximia1	TT-GGTAT--ATAGA	CT-AAAAA	TAGATT	TTGCA-CGCTTCAAT	-ATAAAAT--TG-A	G--AGG-----	-----	-----	521										
P. eximia2	TT-GGTAT--ATAGA	CT-AAAAA	TAGATT	TTGCA-CGCTTCAAT	-ATAAAAT--TG-A	G--AGG-----	-----	-----	518										
C. macelaria1	TT-GGTAT--ATAGA	CC-AAAAA	AAATTT	TTGCA-CGCTTCAAT	-ATAAAAT--GG-A	G--AGG-----	-----	-----	529										
C. macelaria2	TTGGGTAT--ATGGA	CC-AAAAA	AAATTT	TTGCA-CGCTTCAAT	-ATAAAAT--GG-A	G--AGG-----	-----	-----	525										
C. hominivorax1	TT-GGTAT--ATAGA	CC-AAAAA	AAATTT	TTGCA-CGCTTCAAT	-ATAAAAT--GG-A	G--AGGT-----	-----	-----	537										
C. hominivorax2	TT-GGTAT--ATAGA	CC-AAAAA	AAATTT	TTGCA-CGCTTCAAT	-ATAAAAT--GG-A	G--AGGT-----	-----	-----	537										
D. hominis1	TTTGGTAT--ATAGA	CCTAAAAA	AAA-TTT	CTGTAACGGT-CAAT	-ATAAAATTTATGGTA	T--AATTAAAAATTA	ATCTTTTTTTTGATT		573										
D. hominis2	TTTGGTAT--ATAGA	CCTAAAAA	AAA-TTT	CTGTAACGGT-CAAT	-ATAAAATTTATGGTA	T--AATTAAAAATTA	ATCTTTTTTTTGATT		573										
D. yakuba	TTTAAAAATTAATATT	TTAAAAAT	TATTATA	ATTATTAAATTAATT	TATAAAAATTTTTTAA	TTTATTTAATTAACA	AATATTGTTTTATAA		579										

Figura 18. (continuação) estão indicados nesta espécie em vermelho. Blocos incluídos nos sub-domínios (CSB) caracterizados neste trabalho estão indicados também em vermelho.

DISCUSSÃO

1. Acesso à Região Controle do Genoma Mitocondrial

A região rica em A+T do genoma mitocondrial de insetos tem sido descrita como uma região gênica de difícil acesso metodológico, apesar das técnicas recentes de Biologia Molecular fornecerem ferramentas adequadas para a amplificação, a clonagem e o sequenciamento de praticamente qualquer sequência íntegra de DNA, independente de sua origem. O potencial de formação de estruturas secundárias e a presença de sequências envolvidas na origem de replicação do genoma mitocondrial, conferem propriedades específicas à região controle. Estas propriedades podem influenciar principalmente a eficiência dos sistemas de amplificação pela *Taq* DNA polimerase e a clonagem em bactérias, interferindo em processos biológicos básicos como a elongação da cadeia de DNA e a regulação da replicação.

A constituição extremamente rica em bases adenina e timina da região controle de replicação, também pode interferir na condução experimental devido às propriedades termoestáveis destas sequências exigirem parâmetros de temperatura mais amenos.

Os padrões de variabilidade encontrados para a região rica em A+T têm indicado baixa homologia de sequência entre as espécies estudadas e inviabilizam a construção de primers universais que possibilitem a amplificação eficiente desta região do genoma mitocondrial em espécies onde estas sequências ainda não foram determinadas. A escassez de primers específicos para esta região requer a otimização das estratégias de amplificação através do uso de diferentes combinações dos conjuntos de primers disponíveis.

Interferências na amplificação da região controle também podem ter ocorrido devido à presença de repetições em tandem e heteroplasmia entre e dentro das espécies analisadas. Inicialmente, parece não ser possível garantir se o produto amplificado representa o alvo autêntico da investigação devido à falta de conhecimento prévio sobre o tamanho preciso desta região para a maioria das espécies. Produtos de amplificação inespecíficos, podem ser devido a artefatos próprios da reação de PCR. Sub-produtos de PCR gerados devido à ocorrência de eventos de “slippage” da enzima DNA polimerase, são frequentemente observados associados à presença de elementos repetidos em tandem, como séries dinucleotídicas [TAs] e sequências de homopolímeros, poli-Ts e poli-As (Levinson & Gutman, 1987; Rand & Harrison, 1989; Broughton & Dowling, 1994).

Deve-se ressaltar ainda, que existe pouca informação de sequência nucleotídica disponível para esta região em insetos. O acesso à região controle do DNAm de insetos pode exigir, muitas vezes, etapas de padronização adicionais, justificando em parte a escassez de informação nesta área.

Neste trabalho, a estratégia de amplificação em duas etapas distintas, com dois primers universais ancorados nos genes de tRNA adjacentes à região controle (tRNA^{Met} e tRNA^{Ile}) e outros dois no rRNA 12S, foi fundamental para aumentar, em quantidade e resolução, o produto de amplificação da região A+T, fornecendo material adequado para os procedimentos posteriores de clonagem e sequenciamento.

2. Evolução de Sequências Genômicas Ricas em A+T

A composição nucleotídica do genoma mitocondrial de insetos, apresenta um desvio peculiar a favor de um elevado conteúdo de adeninas e timinas, como citado anteriormente. A análise detalhada dos padrões de substituição dos nucleotídeos A e T em regiões codificadoras e não codificadoras, nas posições 3' dos códons de genes estruturais e a função desempenhada nas estruturas secundárias, têm levado vários autores a sugerir a existência de pressão de mutação direcional a favor de um elevado conteúdo de A+T no genoma mitocondrial de insetos (Clary & Wolstenholme, 1985; Wolstenholme & Clary, 1985; Jukes & Bhushan, 1986; Crozier & Crozier, 1993 e Jermin *et al.*, 1994a e b).

A análise do alinhamento das sequências completas da região controle das espécies estudadas neste trabalho, forneceram importantes informações quanto à natureza e à frequência das substituições nucleotídicas. Foi verificada uma alta taxa de substituição nucleotídica para esta região, caracterizada predominantemente por eventos de transversão (84%), onde a proporção transição:transversão foi até 1:5. Dentre as transversões possíveis, as substituições nos sentidos A→T e T→A foram as mais abundantes, representando de 76 a 86% do total de ocorrências. De acordo com a Tabela 6, verificou-se que este desvio ocorre na região controle de maneira geral. Estes dados indicam que esta região não somente apresenta um desvio a favor do conteúdo A+T, como evolui no sentido da manutenção desta composição, uma vez estabelecida a predominância dos eventos de transversão nestas sequências.

Possíveis divergências entre clones da mesma espécie, podem ser decorrentes de eventuais erros de incorporação nucleotídica nas sequências, pela enzima *Taq* DNA polimerase,

durante o processo de amplificação, e/ou de eventos de recombinação desigual entre cadeias de DNA parcialmente amplificadas durante o PCR, e/ou da introdução de erros durante a replicação em cultura de bactérias na sequência do clone. A ocorrência de todos estes eventos simultaneamente pode estar contribuindo na determinação da divergência nucleotídica observada, justificando os valores obtidos. Porém, estes erros não parecem comprometer significativamente a interpretação dos resultados. Entretanto, a existência de uma condição de heteroplasmia, onde cada clone pode estar representando a região controle de moléculas de DNAm_t distintas, coexistentes em um mesmo indivíduo, ainda não pode ser descartada.

Em espécies de *Drosophila* (Clary & Wolstenholme, 1987) também foi observado um excesso de transversões sobre transições na análise do padrão de substituição nucleotídica para a região A+T, contrastando com resultados anteriores obtidos para genes mitocondriais estruturais em *D. yakuba* e *D. melanogaster*, onde eventos de transição e transversão apresentam frequências similares (Wolstenholme & Clary, 1985). Para a região rica em A+T de *Drosophila*, eventos A $\leftrightarrow$ T foram o tipo de substituição mais freqüente, representando 71 a 97% de todas as transversões.

Inohira *et al.* (1997), analisando a região rica em A+T das espécies *D. melanogaster*, *D. simulans*, *D. mauritiana* e *D. yakuba*, observaram que na distribuição de transições e transversões em sub-domínios distintos, os eventos de transversão predominam nas comparações interespecíficas, conferindo um padrão de substituição nucleotídica peculiar quando comparado a estudos prévios no sub-grupo *melanogaster* com outras sequências envolvendo DNAm_t e nuclear (Satta & Takahata, 1990; Caccone *et al.*, 1996 a).

Em insetos ainda não existe uma explicação precisa da razão do DNAm_t ter se tornado rico em A+T durante sua evolução. Assumindo-se que o desvio AT seja uma característica evolutiva ancestral, tem sido postulado que enzimas envolvidas com a transcrição e replicação de sequências ricas em A+T tenham evoluído de tal modo, que uma molécula com elevado conteúdo G+C seja replicada menos eficientemente (Wolstenholme & Clary, 1985). Isto pode ser devido ao elevado requerimento energético necessário para desnaturar as cadeias complementares da molécula de DNA ricas em G+C ou devido à disponibilidade de dNTPs (desoxirribonucleotídeos trifosfato) no ambiente. Consequentemente, uma vez estabelecida uma molécula rica em A+T, é

razoável supor que ocorra seleção no sentido de manter um nível ótimo no conteúdo de adeninas e timinas no genoma mitocondrial como um todo.

Estudos mais recentes propuseram mecanismos moleculares que poderiam explicar este desvio na proporção nucleotídica no genoma mitocondrial de insetos: É conhecido que algum processo mutacional natural favoreça a geração do desvio A+T. A guanina gera por alcalinização a conversão para O⁶-metilguanina que frequentemente estabelece pareamento errôneo com a timina, levando à substituição de um par GC por um par AT (Watson *et al.*, 1987). Agentes alcalinos capazes de produzir O⁶-metilguanina são gerados pelo metabolismo endógeno de células procariotas (Rebeck & Samson, 1991). Embora seja necessária uma análise mais detalhada sobre os eventos bioquímicos envolvidos em processos de conversão nucleotídica durante o metabolismo endógeno das células, é possível que um processo equivalente ocorra em eucariotos.

Alternativamente, Martin (1995) constatou a associação indireta entre o aumento da taxa metabólica específica e a composição nucleotídica do DNAm animal. A taxa metabólica de um organismo relaciona-se diretamente com a produção de radicais livres que por sua vez geram danos oxidativos no DNAm, levando a mutações, na sua maioria substituições nucleotídicas em sítios neutros, que alteram a proporção GC da molécula. Uma combinação entre a maior susceptibilidade de dCTP e dGTP a danos oxidativos, e a incorporação preferencial de ATP pela polimerase em oposição aos sítos apurínicos e/ou apirimidínicos produzidos, poderia explicar o desvio a favor da composição A+T em genomas expostos a ambientes oxigenados com taxas aceleradas de danos no DNA. Nas células animais, mais de 90% do oxigênio é consumido pelas mitocôndrias (Richter *et al.*, 1988).

Nas 5 espécies causadoras de miíases analisadas, a estimativa do conteúdo A+T corresponde em média a 89.6% da composição nucleotídica da região controle. Uma vez que a maquinaria enzimática envolvida na regulação dos processos de replicação e transcrição deve reconhecer sítios específicos de interação dentro da região controle, supõe-se que o alto conteúdo A+T do genoma mitocondrial como um todo, e desta região em especial, esteja associado à evolução da interação entre o sistema genético de replicação e/ou transcrição e o genoma mitocondrial de insetos.

3- Evolução da Organização Estrutural da Região Controle

3.1. Domínios Estruturais

A região controle das espécies de Calliphoridae e Oestridae estudadas apresenta uma organização estrutural semelhante aos padrões descritos para várias espécies de *Drosophila* (Clary & Wolstenholme, 1985 e 1987; Monnerot *et al.*, 1990). Estas espécies apresentam dois domínios distintos que as classificam como pertencente ao grupo I proposto por Zhang *et al.* (1997). A região controle do grupo I se caracteriza por apresentar um domínio A adjacente ao tRNA^{Ile} altamente conservado, contendo a origem de replicação do genoma mitocondrial (Goddard & Wolstenholme, 1980), seguido por um segundo domínio B, aparentemente sem função, onde está concentrada a variabilidade tanto em sequência quanto em tamanho da região controle. Devido à ocorrência de eventos freqüentes de inserção e/ou deleção, observados principalmente na região B e à alta conservação em sequência nucleotídica da região A, sugere-se que estas sub-regiões A e B descritas para *Drosophila* (Inohira *et al.*, 1997) sejam homólogas em estrutura e função aos domínios A e B propostos para as espécies analisadas neste trabalho.

Wolstenholme (1992), sugere que a conservação tende a ser mantida no genoma mitocondrial adotando-se uma estratégia evolutiva que concentra a variabilidade, isto é, sequências repetidas, inserções e deleções, em uma região não codificadora da molécula, ao invés de dispersa entre os genes mitocondriais. A análise conduzida neste trabalho mostra que isto não se aplica ao domínio A, cujo caráter conservado indica padrões específicos de restrição funcional. Por outro lado, o domínio B da região controle destas espécies apresenta padrões de variabilidade condizentes com a estratégia evolutiva proposta por Wolstenholme, 1992.

Komiya *et al.* (1995) analisaram duas regiões intergênicas presentes nas espécies do grupo *Drosophila immigrans*, caracterizando uma região altamente conservada, em tamanho e sequência, entre os genes do tRNA^{Gln} e tRNA^{Ile}. De acordo com estes autores, a conservação da região intergênica I sugere que estas sequências não codificadoras cumprem algum papel, ainda desconhecido, nos processos de replicação ou transcrição do DNAmt. Porém, com relação a outra região, a ampla variação em tamanho e a elevada taxa de substituição nucleotídica, parece representar uma consequência evolutiva associada a sequências de DNA que podem ter perdido sua função no genoma mitocondrial. Os padrões de organização geral destas regiões intergênicas, caracterizando um domínio conservado com um possível papel em processos regulatórios e, um

domínio variável aparentemente sem propriedades funcionais associadas, parecem homólogos aos encontrados para a região controle das espécies estudadas neste trabalho.

3.2. Sub-Domínios Conservados em Sequência (CSB)

A investigação do padrão de organização estrutural do domínio A da região controle (Figura 9) permitiu a identificação de 7 sub-domínios específicos (CSBs) responsáveis por conferir o caráter conservado da região controle observado para as espécies estudadas.

A presença de CSBs na região controle de todos os vertebrados examinados, tem sugerido uma possível função biológica para estas regiões. Tem sido sugerido o envolvimento destas sequências consenso nos processos de replicação e transcrição do genoma mitocondrial animal (Walberg & Clayton, 1981; Saccone et al, 1991; Gemmell *et al.*, 1996).

Em insetos, a presença de sub-domínios conservados associados a elementos de sequência específicos foram identificados em análises comparativas da região controle (Zhang *et al.*, 1995). Estes elementos de sequência foram denominados de elementos estruturais uma vez que, suas propriedades estruturais e a localização relativa, mais do que a sequência primária propriamente, estão conservadas. Estas evidências podem estar indicando a importância funcional destes elementos no genoma mitocondrial de insetos.

Segundo Zhang *et al.* (1997), foram descritos 4 elementos estruturais de sequência primária presentes em todas as espécies de insetos cuja região controle foi caracterizada. Estes elementos também foram identificados nas espécies estudadas neste trabalho (Figuras 8 e 9) conforme descrito a seguir:

(1) Um homopolímero [poli-T] na extremidade 5' da região controle que presume-se estar envolvido diretamente no controle da transcrição e/ou iniciação da replicação (Clary & Wolstenholme, 1987; Lewis et al, 1994; Zhang *et al.*, 1995). Neste trabalho este elemento é homólogo ao CSB I.

(2) Um elemento formado por [poli-TA(A)]_n normalmente presente entre o poli-T e uma estrutura secundária conservada (Monforte *et al.*, 1993). Nas espécies estudadas neste trabalho, uma sequência com uma série [TA] em tandem foi identificada constituindo parte do CSB III.

(3) Uma sequência formadora de estrutura secundária em grampo ocorre na região controle em dípteros e ortópteros e sugere-se que esteja associada à origem de replicação da fita L da molécula de DNAm (Clary & Wolstenholme, 1987; Monforte *et al.*, 1993; Zhang *et al.*,

1995). A sequência da estrutura secundária de *Drosophila* foi indicada no alinhamento 3 (Figura 18), onde observa-se uma associação com o subdomínio CSB IV. As sequências formadoras de estruturas secundárias na região controle das espécies analisadas neste trabalho também estão presentes na região do sub-domínio CSB IV, e são ainda observadas associadas com outros CSBs do domínio A.

(4) Em seguida a esta estrutura secundária, seria esperado um bloco de sequências ricas em G+A, porém, devido a baixa similaridade da sequência nucleotídica primária entre as espécies estudadas, sugere-se que este elemento possa ser taxon-específico. Verifica-se no sub-domínio CSB VI e, em seguida ao CBS VII, uma frequência maior de Gs, indicando a possível ocorrência deste elemento estrutural para estas espécies.

Além destas sequências específicas, pode ser observado em seguida ao elemento rico em G+A, um trecho de poli-A a partir do qual as sequências assumem características próprias do domínio B da região controle. Este elemento poli-A indica a existência de uma sequência de Ts em tandem na cadeia oposta do DNAm, caracterizando o início do domínio A no sentido 5' → 3'. Lewis *et al.* (1994) observaram a ocorrência de um elemento de sequência conservado (poli-T) presente na cadeia oposta à fita que apresenta o outro poli-T adjacente ao gene tRNA^{lle} em *Drosophila*. A presença de trechos com séries de timina ainda não está associada a uma função específica, mas acredita-se que possam agir como um fator determinante na caracterização da origem de replicação em *Drosophila* associado aos domínios conservados. É interessante citar que na região controle de mamíferos, Gemmell *et al.* (1996) registraram 7 sequências polipirimidínicas descritas como sítios potenciais de ligação da proteína mitocondrial associada a DNA simples fita (“mtSSB-protein”), previamente identificada por Mignotte *et al.* (1985). Esta proteína associa-se especificamente a regiões simples fita polipirimidínicas. Ainda em mamíferos, dois domínios conservados (CSB1 e CSB2) foram identificados como sítios de ligação preferencial do fator de transcrição mitocondrial (MTF) e da mtSSB, alertando para as propriedades funcionais destes domínios (Gemmell *et al.*, 1996).

Gemmell *et al.* (1996) analisando os padrões de conservação estrutural da região controle em estudos comparativos entre mamíferos, observaram que as estruturas de sequência consenso da região controle do grupo Monotremata e da origem de replicação do cromossomo bacteriano (OriC) consistem de blocos de sequência conservados intercalados. Apesar dos blocos de sequência conservados bacterianos não apresentarem relação em sequência primária com as

sequências conservadas do domínio central de Monotremata, a organização geral da OriC assemelha-se àquela da região controle do DNAm de mamíferos. Southern *et al.* (1988) sugerem que esta característica deve ser reflexo da origem procariota do sistema genético da mitocôndria, ou então, o padrão de sequências conservadas e variáveis intercaladas representa uma organização estrutural extremamente eficiente para a origem de replicação genômica e evoluiu independentemente, por convergência, em cada um destes sistemas genéticos.

3.3. Estruturas Secundárias do DNA Mitocondrial

O estudo do potencial de formação de estruturas secundárias através da análise de sequências envolvidas na formação de “grampos” termo-estáveis no domínio conservado (A) da região controle destas espécies, apresenta um interesse especial devido a evidências que sugerem que a replicação de moléculas de DNA circulares é iniciada dentro ou próximo de estruturas com estas características (Zannis-Hadjopoulos *et al.*, 1988).

Neste trabalho, alguns critérios foram estabelecidos para a escolha das estruturas secundárias potenciais formadas na região proximal ao gene do tRNA^{lle} da região controle (domínio A): (1) a análise dos dados disponíveis na literatura para as espécies de *Drosophila*; (2) as propriedades termodinâmicas destas estruturas, garantindo a formação de grampos energeticamente estáveis; (3) a localização relativa destas estruturas dentro da região controle; (4) a associação destas sequências formadoras de grampo às regiões conservadas (CSB) do domínio A; (5) os padrões de similaridade conformacional assumido entre as espécies analisadas; e (6) a presença de elementos de sequência [TATA] e [G(A)_nT] nas regiões próximas à estrutura proposta para a maioria das espécies analisadas.

Apesar da predominância de estruturas secundárias em forma de grampo, conformações estruturais envolvendo formas em trevo ou cruciformes foram também observadas na região controle de vertebrados e parecem estar associadas com funções regulatórias (Brown *et al.*, 1986; Hoelzel *et al.*, 1991 ; Gemmell *et al.*, 1996; Marshall *et al.*, 1997). Neste trabalho, estruturas apresentando um eixo principal derivando grampos laterais foram observadas para *C. hominivorax*, Estrutura II (Figura 13), *C. macellaria*, Estrutura I (Figura 14), *P. eximia*, Estruturas II e III (Figura 15) e *D. hominis*, Estrutura III (Figura 17). As demais estruturas descritas formam grampos simples.

A análise da formação de estruturas secundárias identificou que a estrutura I de *C. hominivorax*. (Figura 13a) apresenta uma energia livre de -8.2 kcal/mol, similar a termoestabilidade da estrutura descrita para espécies de *Drosophila* (Inohira et al., 1997 - Figura 12). Enquanto que a localização da estrutura II na região controle de *C. hominivorax* (Figura 13b) se assemelha em posição à estrutura presente em *Drosophila*. Apesar da formação espontânea de duas estruturas na região controle de *C. macellaria*, o valor de energia associado a estas formações está abaixo dos encontrados para *C. hominivorax*, enquanto a estrutura I possui uma conformação estrutural semelhante a estrutura I descrita em *P.eximia*. A estrutura II de *C. macellaria* (Figura 14b) mapeia em uma região equivalente às sequências envolvidas no grampo de *Drosophila*. Foi ainda observado que a Estrutura II de *P. eximia* (Figura 15a) é equivalente em parte à estrutura II descrita para *C. hominivorax* (Figura 13b).

Zhang *et al.* (1995) observaram que não existe similaridade de sequência significativa entre as regiões envolvidas na formação de estruturas secundárias entre espécies de *Drosophila* e Orthoptera, sendo que as principais similaridades encontradas seriam (1) a conformação estrutural em forma de grampo, (2) a conservação das sequências adjacentes ao grampo e, (3) a localização relativa desta estrutura na região controle e, possivelmente, os elementos conservados [TATA] e [G(A)_nT] seriam sinais de reconhecimento específicos para a interação de fatores trans-ativadores com a estrutura secundária.

Marshall e Baker (1997), verificaram que entre espécies de aves e vertebrados de modo geral, a composição de bases, os elementos de sequência primária, a formação de estruturas secundárias e a ordem dos genes adjacentes à região controle se mantêm conservados. Estes autores concluem que apesar da função específica dos CSB ser incerta, sua conservação entre vertebrados sugere que elas sejam fundamentais para as funções regulatórias exercidas pelo D-loop. Entretanto, os altos índices de variação na região controle indicam que as estruturas secundárias podem ser mais relevantes do que a sequência primária na manutenção da funcionalidade dessa região. Porém, a natureza da estrutura secundária, em forma de grampo ou trevo, nem sempre seria um aspecto tão importante para a função da molécula. Estas observações também são consistentes com os resultados obtidos na caracterização da região controle das espécies causadoras de miíases, revelando um padrão geral de homologia para a organização estrutural de sequências envolvidas nos sistemas de regulação da replicação do genoma mitocondrial animal.

Em insetos, Clary & Wolstenholme (1987) consideram como origem de replicação uma estrutura secundária em forma de grampo, encontrada dentro de um elemento de sequência conservado em *Drosophila*. Monforte *et al.*, (1993) também identificaram a existência de sub-regiões em comparações entre espécies de *Drosophila*, capazes de formar estruturas em grampo. Em *D.ambigua*, a presença de uma estrutura secundária estável foi comprovada através de estudos utilizando a nuclease S1 para o reconhecimento de regiões específicas envolvidas na formação desta estrutura, permitindo a localização da mesma precisamente dentro do domínio conservado, a partir da constatação de um sítio sensível à digestão com a enzima.

Neste trabalho, as sequências envolvidas na formação de estruturas secundárias que podem ser biologicamente importantes para processos de regulação, estão associadas com os sub-domínios conservados para todas as espécies, principalmente os sub-domínios CSB III e IV. Entretanto, estudos mais detalhados envolvendo inclusive a caracterização das propriedades bioquímicas destas sequências, como seu potencial de associação com proteínas mitocondriais específicas, se fazem necessários para esclarecer sua importância biológica.

4. Utilidade Filogenética da Região Controle do Genoma Mitocondrial

Em insetos, uma das principais questões envolvendo a caracterização da região controle do genoma mitocondrial, consiste na utilização apropriada dos dados relativos às sequências nucleotídicas desta região, através de análises comparativas baseadas na identificação de padrões de homologia.

Uma vez caracterizada a região controle do genoma mitocondrial destas espécies, tendo sido abordados os aspectos estruturais e os padrões de organização geral desta região, torna-se possível a avaliação da utilidade destas sequências ricas em A+T da região controle para fornecer dados informativos no estabelecimento das relações filogenéticas neste grupo de espécies.

Existem controvérsias a respeito da variabilidade da região controle, fundamental para a abordagem das relações filogenéticas. Em insetos, alguns estudos indicam que a região controle pode não representar a sequência mais variável do genoma mitocondrial (Caccone *et al.*, 1996; Zhang & Hewitt, 1996). A reduzida variabilidade desta região pode estar sendo determinada por alguns fatores. A região controle, sendo extremamente rica em A+T, parece estar sob pressão de mutação a favor deste desvio. Assim as vias de mutação possíveis, limitadas a eventos A↔T e G/C→A/T favorecem o acúmulo de mutações reversas e convergências (Simon *et al.*, 1994),

causando um decréscimo na taxa evolutiva observada. Além disso, os sítios G ou C remanescentes na sequência podem conferir propriedades funcionais importantes, não contribuindo como elementos indicadores de variabilidade genética.

O potencial informativo da região controle pode ser discutido tanto do ponto de vista da análise filogenética interespecífica, como na abordagem das relações intra-específicas. Segundo Zhang *et al.* (1997), para as espécies que possuem regiões controle com domínios conservados, como a região controle do grupo I, característica de *Drosophila*, os estudos filogenéticos devem ser elaborados utilizando-se o domínio conservado. Estudos onde não foi possível utilizar a variabilidade genética da região A+T para a obtenção de sítios informativos (Taylor *et al.*, 1993) normalmente utilizaram sequências com elevado conteúdo de A+T (95 - 96%) e analisaram um tamanho de região controle significativamente reduzido (~350 pb).

Nei (1991), demonstra através de simulação em computador, que o método de Neighbor-joining proposto por Saitou & Nei (1987) é um dos métodos de distância mais eficientes para a recuperação da topologia correta para um conjunto de espécies correlacionadas. Neste trabalho, as árvores obtidas por Neighbor-joining (NJ) e Máxima parcimônia (MP), resultaram na mesma topologia recuperando os padrões de relações interespecíficas propostas.

A partir das árvores filogenéticas obtidas para estas espécies (Figuras 10 e 11), foram verificadas inconsistências em relação às topologias apresentadas quando da utilização das sequências totais da região A+T na análise filogenética, incluindo os domínios A e B; quando comparadas àquelas obtidas considerando-se somente as sequências do domínio A da região controle. Supõe-se que o padrão de relações apresentado pelas árvores derivadas da análise das sequências completas desta região, pode estar comprometido devido às frequentes homoplasias, deleções e repetições características, principalmente, do domínio variável B. Especialmente a espécie *Dermatobia hominis*, contribui para restringir a confiabilidade do alinhamento, apresentando longos trechos com repetições dinucleotídicas constituídas por pares [pirimidina-purina]. Estas repetições estão intimamente associadas ao tamanho da região A+T, que nesta espécie atinge aproximadamente 1800 pb. Assim, a inclusão de uma região de evolução rápida com estas características, domínio B, parece não ser apropriada para resolver as relações filogenéticas entre os níveis taxonômicos abordados.

Apesar dos valores encontrados para BCL (grau de confiança do “bootstrap”) e CP (grau de confiança do teste-t serem maiores para a árvore de Neighbor-joining construída a partir da

sequência nucleotídica da região controle como um todo (BCL= 48 e CP= 31), a interpretação desta topologia parece não ser conclusiva entre *Chrysomya* e *Phaenicia*, uma vez que *C. megacephala*, uma espécie originária do Velho Mundo, apresenta-se posicionada entre *P. eximia* e o gênero *Cochliomyia*, todas espécies caracterizadas por sua distribuição Neotropical.

Alguns critérios foram definidos para o estabelecimento de quais sequências da região controle seriam mais informativas, permitindo a resolução filogenética nestas espécies. Os parâmetros avaliados indicaram o domínio A como mais adequado para averiguar os padrões de relações interespecíficas, devido as seguintes características: (1) o caráter conservado deste subdomínio, minimizando a incidência de homoplasias (convergências, mutações reversas e paralelismos); (2) a obtenção de um alinhamento mais consistente e confiável, distribuindo mais adequadamente os “gaps” e ambiguidades; e (3) devido à ausência de extensos eventos de deleção e inserção e/ou repetições de sequências, não comprometendo o alinhamento e, conseqüentemente, os sítios utilizados nas inferências filogenéticas.

A análise da família Calliphoridae resultou no agrupamento das espécies do gênero *Cochliomyia* (*C. hominivorax* e *C. macellaria*) que apresentaram as menores distâncias genéticas. Associado a este grupo, assumindo uma posição intermediária na árvore, foi identificada *P. eximia*, que apresenta também uma distribuição Neotropical. A espécie invasora do continente americano, *C. megacephala*, originalmente do Velho Mundo, foi posicionada em um ramo mais distante das demais espécies de Calliphoridae analisadas. O gênero *Phaenicia* apresenta uma distribuição Holoártica, sendo constituído em sua maioria, por espécies originalmente e predominantemente, distribuídas nas regiões Paleártica e Etiópica (Zumpt, 1973). Porém, este gênero apresenta um padrão de distribuição mais amplo e abrange espécies que são ectoparasitas facultativos, ao longo de sua distribuição geográfica, comportamento que foi recentemente registrado para *P. eximia* (Azeredo-Espin & Madeira, 1996). Stevens & Wall (1997) verificaram que algumas espécies do gênero *Phaenicia* podem apresentar-se como saprófagas, enquanto que sob diferentes condições ambientais, podem manifestar o comportamento de parasitas obrigatórios.

A análise de espécies do gênero *Phaenicia*, tem demonstrado que este grupo parece estar evoluindo para o estabelecimento de uma interessante estratégia adaptativa relacionada ao hábito de causar miíases (Stevens & Wall, 1997). Esta estratégia pode estar conferindo uma maior plasticidade fenotípica para *P. eximia*, favorecendo a ocupação de novos nichos e corroborando a

sua posição intermediária entre espécies causadoras de miíases primárias nas árvores obtidas (Figuras 10 e 11).

As árvores de NJ posicionaram *D. hominis* como grupo externo com relação às espécies de califorídeos. Esta espécie foi incluída nas análises filogenéticas por ser considerada uma das principais causadoras de miíase primária na região Neotropical e por pertencer a uma família caracterizada por estratégias evolutivas especializadas quanto ao parasitismo.

A hipótese da evolução do parasitismo por miíases a partir de uma origem saprófaga, proposta por Zumpt (1965) sugere uma tendência evolutiva de espécies adaptadas em carcaças em direção a espécies causadoras de miíases obrigatórias, que se alimentam de tecidos vivos dos hospedeiros. A evolução deste hábito, não parece envolver obrigatoriamente uma origem monofilética deste caráter. A hipótese de uma possível origem polifilética, corroborada pelos dados obtidos, fornece uma explicação mais parcimoniosa para a evolução deste parasitismo entre espécies dos diferentes gêneros da família Calliphoridae.

Uma dificuldade adicional que compromete, em parte, a ilustração dos padrões de relações interespecíficas neste grupo, é a escassez de estudos mais amplos e concordantes com relação à distribuição geográfica destas espécies associados a estudos de morfologia, biologia básica e aspectos comportamentais das moscas causadoras de miíases. Estudos mais detalhados sobre as relações entre estas espécies são fundamentais para esclarecer a história evolutiva deste grupo. A inclusão de uma maior representatividade no número de espécies analisadas, com a utilização de diferentes marcadores moleculares, permitirá explorar os mecanismos evolutivos responsáveis pela diversidade de comportamentos nos vários níveis de parasitismo apresentado pelas espécies desse importante grupo.

CONCLUSÕES

1. Para as espécies estudadas, a amplificação das regiões relativas aos genes dos rRNA12S, rRNA16S, das subunidades COI/II, ND2 e citocromo b baseadas na localização dos primers em sequências previamente descritas, vieram a confirmar a conservação em tamanho e em organização do conteúdo gênico característico do DNAm^t animal, onde estas regiões gênicas apresentaram homologia com o modelo estabelecido para *Drosophila yakuba*.

2. A estratégia de amplificação da região controle envolvendo uma etapa adicional de reamplificação dos produtos de PCR, com primers internos, foi fundamental para aumentar a especificidade da reação, garantindo a recuperação eficiente da região A+T para as espécies estudadas neste trabalho.

3. Análises preliminares tiveram êxito na amplificação da região controle de um espécime de *C. hominivorax* fixado em álcool 70% e de um espécime de *P. eximia* conservado em insetário. Com a disponibilidade de material biológico mantido em condições adequadas de preservação, em coleções entomológicas e de museus, os padrões de variabilidade previamente existentes para estas espécies podem ser recuperados.

4. A frequência e a natureza das substituições nucleotídicas da região controle, indicam uma evolução no sentido da manutenção de um desvio significativo a favor de nucleotídeos A+T, possivelmente associado à dinâmica energética do sistema de replicação do DNAm^t de insetos.

5. Com a identificação de um domínio conservado próximo do gene tRNA^{lle} (A) e um domínio variável na porção 5' desta região (B), foi verificado que taxas evolutivas distintas atuam independentemente sobre esta região não codificadora.

6. Através da construção de primers específicos para os diferentes domínios da região controle, a amplificação de sequências nestas regiões pode ser eficientemente otimizada permitindo a recuperação de praticamente qualquer sequência domínio-específica.

7. A identificação de sub-domínios de sequência conservada (CSBs) e estruturas secundárias energeticamente estáveis no domínio A indica a presença de possíveis elementos regulatórios em *cis*, que parecem ser sítios potenciais de interação com o sistema de replicação/transcrição do DNAm de estas espécies.

8. Devido à consistência do alinhamento, as sequências do domínio A se mostraram mais apropriadas para indicar as relações filogenéticas. As sequências específicas do domínio variável (B) da região controle permitiram a identificação de marcadores diagnósticos para o estudo em nível intraespecífico de polimorfismos genéticos e estrutura de populações destas espécies.

9. O padrão de relações filogenéticas derivado da análise de sequências da região controle demonstra o potencial deste marcador genético em estabelecer associações evolutivas entre estas espécies causadoras de miasas. Através da ampliação desta análise para outros gêneros e espécies da família Calliphoridae, será possível inferir sobre a origem evolutiva do hábito de parasitismo.

10. Uma vez estabelecida a caracterização estrutural da região controle, ampliam-se as perspectivas para elucidação da interação de possíveis sequências regulatórias (CSBs e estruturas secundárias) com fatores mitocondriais envolvidos no sistema de replicação/transcrição deste genoma.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albertin, D. 1933.** Revision of the Genus *Lucilia* R. -D. (Diptera, Calliphoridae). Linnaean Society Journal of Zoology **38**: 389-463.
- Anderson, S; de Bruijn, M. H. L.; Coulson, A. R.; Eperon, I. C.; Sanger, F.; Young, I. G. 1982.** Complete Sequence of Bovine Mitochondrial DNA. Conserved Features of the Mammalian Genome. J. Mol. Biol. **156**, 683-717.
- Anderson, S; Bankier, A. T.; Barrell, B. G.; de Bruijn, M. H. L.; Coulson, A. R.; Drouin, J.; Eperon, I. C.; Nierlich, D. P.; Roe, B. A.; Sanger, F.; Smith, A. J. H.; Staden, R.; Young, I. G. 1981.** Sequence and Organization of the Human Mitochondrial Genome. Nature **290**, 457- 465.
- Andrade, E. N. 1929.** Pesquisas sobre o Berne. Archos. Inst. Biol. São Paulo **2**:53-60.
- Arias, M. C.; Sheppard W. S. 1996.** Molecular Phylogenetics of Honey Bee Subspecies (*Apis mellifera* L.) Inferred from Mitochondrial DNA Sequence. Mol. Phylogen. Evol. **5** (3): 557-566.
- 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.
- Asakawa S.; Kumazawa Y.; Araki t.; Himeno H.; Miura K.; Watanabe K. 1991.** Strand-specific Nucleotide Composition Bias in Echinoderm and Vertebrate Mitochondrial Genome. J. Mol. Evol. **32** (6): 511-520.

- Azeredo Espin, A. L. M. 1987.** Análise Cariotípica, Morfométrica e de Compatibilidade Sexual, em Linhagens Brasileiras de *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae). Ph. D. Thesis. Universidade Estadual de Campinas, 149p.
- Azeredo Espin, A. L. M. 1993.** Mitochondrial DNA Variability in Geographic Populations os Screwworm Fly from Brasil. International Atomic Energy Agency, p. 161-165.
- Azeredo Espin, A. L. M.; Madeira, N. G. 1996.** Primary Myiasis in Dog caused by *Phaenicia eximia* (Diptera: Calliphoridae) and Preliminary Mitochondrial DNA Analysis of the Species in Brasil. J. Med. Entomology **33** (5): 839-843
- Baumgartner, D. L. 1988.** Spread of Introduced *Chrysomya* Blowflies (Diptera: Calliphoridae) in the Neotropics with records new to Venezuela. Biotropica **20** (2): 167-168.
- Baumgartner, D. L.; Greenberg, B. 1984.** The genus *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) in the New World. J. Med. Entomol., **21** (1): 105-113.
- Baumgartner, D. L.; Greenberg, B. 1985.** Distribution and Medical Ecology of the Blow Flies (Diptera: Calliphoridae) of Peru. Ann. Entomol. Soc. Am. **78**: 565-587.
- Beagley, C.T.; Okada, N. A.; Wolstenholme, D. R. 1996.** Two Mitochondrial Group I Intron in a Metazoan, the Sea Anemone *Metridium senile*: One Intron Contains Genes for Subunits 1 and 3 of NADH Dehydrogenase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**: 11 5619-5623.
- Beard, C. B.; Hamm, D. M.; Collins, F. H. 1993.** The Mitochondrial Genome of the Mosquito *Anopheles gambiae*: DNA Sequence, Genome Organization and Comparisons with Mitochondrial Sequence of the Other Insects. Insect Molecular Biology **2** (2): 103-124.
- Beckenbach, A. T.; Wei, Y. W.; Liu, H. 1993.** Relationships in the *Drosophila obscura* Species Group, Inferred from Mitochondrial Cytochrome Oxidase II Sequences. Mol. Biol. Evol. **10**: 186-204.

- Beesley, W. N. 1990.** Halt in spread of New World Screw-worm in Africa? *Vet. Rec.* 126 (19): 488-489.
- Boore J. L.; Brown W. M. 1994.** Complete DNA Sequence of the Mitochondrial Genome of the Black Chiton, *Katharina tunicata*. *Genetics* **138**: 423-443
- Boore J. L.; Brown W. M. 1995.** Complete Sequence of the Mitochondrial DNA of the Annelid Worm *Lumbricus terrestris*. *Genetics* **141**: 305-319
- Boyce, T. M.; Zwick, M.E.; Aquadro, C. F. 1989.** Mitochondrial DNA in the Bark Weevils: Size Structure and Heteroplasmy. *Genetics* **123**: 825-836.
- 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.
- Broughton, R. E.; Dowling, T. E. 1994.** Length Variation in Mitochondrial DNA of the Minnow *Cyprinella spiloptera*. *Genetics* **138** (1): 179-190.
- Brown, W. M. 1985.** The Mitochondrial Genome of Animals. 95-130 In: *Molecular Evolutionary Genetics*, edited by R. J. Macintyre. Plenum Press, N.Y.
- Brown, G. G.; Gadaleta, G.; Pepe, G.; Saccone, C.; Sbisà, E. 1986.** Structural Conservation and Variation in the D-loop-containing Region of Vertebrate Mitochondrial DNA. *J. Mol. Biol.* **192**, 503-511.
- Bultmann, H.; Laird, C. D. 1973.** Mitochondrial DNA from *Drosophila melanogaster*. *Biochem. Biophys. Acta* **299** (2): 196-209.
- Cabot, E. L.; Beckenbach, A. 1989.** Simultaneous Editing of Multiple Nucleic Acid and Protein Sequences With ESEE. *Comput. Appl. Biosci.* **5**: 233-234.

- Caccone, A.; Moriyama, E. N.; Gleason, J. M.; Nigro, L.; Powell, J. R. 1996a.** A Molecular Phylogeny for the *Drosophila melanogaster* Subgroup and the Problem of Polymorphism Data. *Mol. Biol. Evol.* **13** (9): 1224-1232.
- Caccone, A.; Garcia, B. A.; Powell, J. R. 1996b.** Evolution of the Mitochondrial DNA Control Region in the *Anopheles gambiae* Complex. *Insect. Mol. Biol.* **5** (1): 51-59.
- Cano, R. J. 1996.** Analysing Ancient DNA. *Endeavour* **20**: 4 162-167.
- Cantatore, P.; Roberti, M.; Rainaldi, G.; Gadaleta, M. N.; Saccone, C. 1989.** The Complete Nucleotide Sequence, Gene Organization, and Genetic Code of the Mitochondrial Genome of *Paracentrotus lividus*. *J. Biol. Chem.* **264**: 10965-10975.
- Chomyn, A.; Mariottini, P.; Cleeter, M. W. J.; Ragan, C. I.; Matsuno-Yagi, A; Hatefi, Y.; Doolittle, R. F.; Attardi, G. 1985.** Six Unidentified Reading Frames of Human Mitochondrial DNA Encode Components of the Respiratory-Chain NADH Dehydrogenase. *Nature* **314** (18): 592-597.
- Chomyn, A.; Cleeter, M. W. J.; Ragan, C. I.; Riley, M.; Doolittle, R. F.; Attardi, G. 1986.** URF 6, Last Unidentified Reading Frame of Human Mitochondrial DNA, Codes for NADH Dehydrogenase Subunit. *Science* (**234**): 614-618.
- 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 e III e ATPase Subunit 6. *Nucleic Acids Research* **11** (12): 4211-4227.
- Clary, D. O.; Wolstenholme, D. R. 1985.** The Mitochondrial DNA Molecule of *Drosophila yakuba*: Nucleotide Sequence, Gene Organization and Genetic Code. *J. Mol. Evol.* **22**: 252-271.

- 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.
- Clayton, D. A. 1982.** Replication of Animal Mitochondrial DNA. *Cell* **28**: 693-705.
- Clayton, D. A. 1984.** Transcription of the Mammalian Mitochondrial Genome. *Ann. Rev. Biochem.* **53**: 573-594.
- Clayton, D. A. 1991.** Replication and Transcription of Vertebrate Mitochondrial DNA. *Ann. Rev. Cell Biol.* **7**: 453-478.
- Crozier, R. H.; Crozier, Y.C. 1993.** The Mitochondrial Genome of the Honeybee *Apis mellifera*: Complete Sequence and Genome Organization. *Genetics* **133**: 97-117.
- 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.
- De Giorgi, C.; Martiradonna, A.; Lanave, C.; Saccone, C. 1996.** Complete Sequence of the Mitochondrial DNA in the Sea Urchin *Arabacia lixula*: Conserved Features of the Echinoid Mitochondrial Genome. *Mol. Phylogenet. Evol.* **5** (2): 323-332
- DeSalle, R. 1992.** The Phylogenetic Relationships of Flies in the Family Drosophilidae deduced from mtDNA Sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* **1**: 31-40.
- DeSalle, R. 1994.** Implications of Ancient DNA for Phylogenetic Studies. *Experientia* **50**: 542-550.
- DeSalle R.; Freedman, T.; Prager, E. M.; Wilson, A. C. 1987.** Tempo and Mode of Sequence Evolution in Mitochondrial DNA of Hawaiian *Drosophila*. *J. Mol. Evol.* **26**: 157-164

- Erlich, H. A. (ed.) 1989.** PCR Technology. Principles and Applications for DNA Amplification. Stockton Press, N. Y.
- Fauron, C. M. -R.; Wolstnholme D. R. 1976.** Structural Heterogeneity of Mitochondrial DNA Molecules within the Genus *Drosophila*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **73**: 3623-3627.
- Fauron, C. M. -R.; Wolstnholme D. R. 1980a.** Extensive Diversity among *Drosophila* Species with Respect to Nucleotide Sequences within the Adenine + Timine -rich Region of Mitochondrial DNA Molecules. Nucleic Acids Res. **8**: 2439-2452.
- Fauron, C. M. -R.; Wolstnholme D. R. 1980b.** Intraspecific Diversity of Nucleotide Sequence within the Adenine + Timine - rich Region Mitochondrial DNA Molecules of *Drosophila mauritiana*, *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans*. Nucleic Acids Res. **8**: 5391-5410.
- Ferreira, M. J. M. 1978.** Sinantropia de Dípteros Muscóides de Curitiba, Paraná I: Calliphoridae. Revta. Bras. Biol. **38**: 445-454.
- Ferreira, M. J. M. 1982.** Sinantropia de Calliphoridae (Diptera) em Goiânia, Goiás. Rev. Bras. Biol. **43** (2): 199-210.
- Fitch, W. M., 1971.** Towards Defining the Course of Evolution: Minimum Change for a Specific Tree Topology. Systematic Zoology **20**: 406-416.
- Flavell R. A.; Jones, I. G. 1970.** Mitochondrial Deoxyribonucleic Acid from *Tetrahymena pyriformis* and Its Kinetic Complexity. Biochem. J. **116**: 811-817.
- Flook, P. K.; Rowell, C. H. F.; Gellissen, G. 1995.** The Sequence Organization, and Evolution of the *Locusta migratoria* Mitochondrial Genome. J. Mol. Evol. **41**: 928-941.

- Funk, D. J.; Futuyma, D. J.; Orti, G.; Meyer, A., 1995.** Mitochondrial DNA Sequences and Multiple Data Set: A Phylogenetic Study of Phytophagous Beetles (Chrysomelidae: *Ophraella*). *Mol. Biol. Evol.* **12** (4): 627-640.
- Gemmell, N. J.; Western, P. S.; Watsom, J. M.; Graves, J. A. M. 1996.** Evolution of the Mammalian Mitochondrial Control Region - Comparisons of Control Region sequences Between Monotreme and Therian Mammals. *Mol. Biol. Evol.* **13** (6): 798-808.
- Gillham, N. W. 1994.** Organelle Genes and Genomes. Oxford University Press, Inc
- Gillman, H.; Cunningham, E. P.; Sidahmed, A. E. 1992.** The New World Screwworm Eradication Programme. North Africa 1988-1992. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).
- Goddard, J. M.; Wolstenholme, D. R. 1978.** Origin and Direction of Replication in Mitochondrial DNA molecules from *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **75**: 3886-3890.
- Goddard, J. M.; Wolstenholme, D. R. 1980.** Origin and Direction of Replication in Mitochondrial DNA Molecules from the Genus *Drosophila*. *Nucleic Acids Res.* **8**: 741-757.
- Goddard, J. M.; Lago, P. K. 1985.** Notes on Blow Fly (Diptera: Calliphoridae) Succession on Carrion in Northern Mississippi. *J. Entomol. Sci.* **20**: 312-317.
- Goldenthal, M. J.; Mckenna, K. A.; Joslyn, D. J. 1991.** Mitochondrial DNA of the Blow Fly *Phormia regina*: Restriction Analysis and Gene Localization. *Biochem. Genetics* **29** (1/3) 1-11.
- Greenberg, B. 1973.** Flies and Disease., vol. 2. Princeton University Press. N. J. pp 447.

- Guimarães, J. H. 1984.** Considerações Gerais sobre Moscas do Gênero *Chrysomya* no Brasil. *Agrochimica Ciba Geigy*, São Paulo, **24**: 8-12.
- Guimarães, J. H.; Prado, A. P.; Linhares, A. X. 1978.** Tree Newly Introduced Blow Fly Species in Southern Brazil (Diptera: Calliphoridae). *Revta. Bras. Ent*; **22** (1): 53- 60.
- Guimarães, J. H.; Prado, A. P. & Buralli, G. M. 1979.** Dispersal and Distribution of Tree Newly Introduced Species of *Chrysomya* Robineau-Desvoidy in Brazil (Diptera: Calliphoridae). *Revta. Bras. Ent.* **23** (4): 245-255.
- Guimarães, J. H.; Papavero, N.; Prado, A. P. 1983.** As Mííases na Região Neotropical (Identificação, Biologia, Bibliografia). *Revta. Bras. Zool.* **1** (4): 239-416.
- Harrison, R. G. 1989.** Animal Mitochondrial DNA as a Genetic Marker in Population and Evolutionary Biology. *Trends Ecol. Evol.* **4**: 6-11.
- Hatzoglou, E.; Rodakis, G. C.; Lecanidou, R. 1995.** Complete Sequence and Gene Organization of the Mitochondrial Genome of the Land Snail *Albinaria coerulea*. *Genetics* **140**: 1353-1366.
- Higuchi, R. G.; Ochman, H. 1989.** Production of Single -stranded DNA Templates by Exonuclease Digestion Following the Polymerase Chain Reaction. *Nucl. Acids Res.* **17**: 5865.
- Ho, C. -M; Liu, Y. -M; Wei, Y. -H; Hu, S. -T. 1995.** Gene for Cytochrome c Oxidase Subunit II in the Mitochondrial DNA of *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* **32** (2): 174-180.
- Hoelzel, A. R.; Hancock, J. M.; Dover, G. A. 1991.** Evolution of the Cetacean Mitochondrial D-loop Region. *Mol. Biol. Evol.* **8** (4): 475-493.

- Hoffmann, R. J.; Boore, J. L.; Brown, W. M. 1992.** A Novel Mitochondrial Genome Organization for the Blue Mussel *Mytilus edulis*. *Genetics* **131**: 397-412.
- Holton, T. A.; Graham, M. W. 1990.** A Simple and Efficient Method for Direct Cloning of PCR Products Using ddT-tailed Vectors. *Nucl. Acids Res.* **19** (5): 1156.
- Hsu Chen, C. -C.; Kotin, R. M.; Dubin, D. T. 1984.** Sequences of the Coding and Flanking Regions of the Large Ribosomal Subunit RNA Gene of Mosquito Mitochondria. *Nucl. Acids Res.* **12**: 7771-7785.
- Huang, X. 1996.** An Improved Sequence Assembly Program. *Genomics* **33**: 21-31.
- Imbiriba, A. S.; Izutani, D. T.; Milhoretto, I. T.; Luz, E. 1977.** Introdução da *Chrysomya chloropyga* (Wiedemann, 1818) na Região Neotropical (Diptera: Calliphoridae). *Arq. Biol. Tecnol.* **20**: 35-39.
- Infante, M. E. & Azeredo Espin, A. M. L. 1995.** Genetic Variability in Mitochondrial DNA of Screwworm, *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae), from Brazil. *Biochemical Genetics* **33**: 737-756.
- Innis, M. A.; Gelfand, D.H.; Sninsky, J. J.; White, T. J. (ed.s) 1990.** PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications. Academic Press, San Diego.
- Inohira, K.; Hara, T; Matsuura, E. T. 1997.** Nucleotide Sequence Divergence in the A+T-rich Region of Mitochondrial DNA in *Drosophila simulans* and *Drosophila mauritiana*. *Mol. Biol. Evol.* **14** (8): 814-822
- Jacobs, H. T.; Elliot, D. J.; Math, V. B.; Farquharson, A. 1988.** Nucleotide Sequence and Gene Organization of Sea Urchin Mitochondrial DNA. *J. Mol. Biol.* **202**: 185-217.

- Jermiin, L. S.; Crozier, R. H. 1994a.** The Cytochrome b Region in the Mitochondrial DNA of the Ant *Tetraponera rufoniger*: Sequence Divergence in Hymenoptera may be Associated with Nucleotide Content. *J. Mol. Evol.* **38**: 282-294.
- Jermiin, L. S.; Graur, D.; Lowe, R. M.; Crozier, R. H. 1994b.** Analysis of Directional Mutation Pressure and Nucleotide Content in Mitochondrial Cytochrome b Genes. *J. Mol. Evol.* **39**: 160-173.
- Jukes, T. H.; Bhushan, V. 1986.** Silent Nucleotide Substitutions and G+C Content of Some Mitochondrial and Bacterial Genes. *J. Mol. Evol.* **24** (1-2): 39-44.
- Kimura, M. 1980.** A Simple Method for Estimating Evolutionary Rate of Base Substitution Through Comparative studies of Nucleotide Sequences. *J. Mol. Evol.* **16**: 111-120.
- Knipling, E. F. 1955.** Possibilities of Insect Control of Erradication Through the Use of Sexually Sterile Males. *J. Econ. Entom.* **48**: 459-462.
- Kocher, T. D.; White T. J. 1989.** Evolutionary Analysis via PCR. pp. 137-147. In: H. A. Erlich, ed. *PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification*. Stockton Press, New York.
- Kocher, T. D.; Thomas, W. K.; Meyer A.; Edwards, S. V.; Pääbo, S.; Villablanca F. X.; Wilson A. C. 1989.** Dynamics of Mitochondrial DNA Evolution in Animals: Amplification and Sequencing with Conserved Primers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**: 6196-6200.
- Komiya, K.; Kondoh, T.; Aotsuka, T. 1995.** Evolution of the Noncoding Regions in *Drosophila* Mitochondrial DNA: Two Intergenic Regions. *Biochem. Genet.* **33** (3-4): 73-82.
- Krafsur, E. S. 1987.** Climatological Correlates of Screwworm (*Cochliomyia hominivorax*) abundance in Texas, USA. *Med. Vet. Entomol.* **1** (1): 71-80.

- Kumar, S.; Tamura, K.; Nei, M. 1993.** MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis, Version 1.01. The Pennsylvania state University, University Park, P.A.
- Lane, R. P.; Lovell, C.R.; Griffith, W. A. D. 1987.** Human Cutaneous Myiasis - a Reviwed and Report of Three Cases Due to *Dermatobia hominis*. Clin. Exp. Dermatol. **12** (1): 40-45.
- Lang, B. F.; Burger, G.; O'Kelly, C. J.; Cedergren, R.; Golding, B. G.; Lemieux, C.; Sankoff, D.; Turmel, M.; Gray, MW. 1997.** An Ancestral Mitochondrial DNA Resembling a Eubacterial Genome in Miniature. Nature **387**: 493-497.
- Lapalme, G.; Cedergren, R. J.; Sankoff, D. 1982.** An Algorithm for the Display of Nucleic Acid Secondary Structure. Nucl. Acids Res. **10** (24): 835-836.
- LaRoche, J.; Snyder, M.; Cook, D. I.; Fuller, K.; Zouros, E. 1990.** Molecular Characterization of a Repeat Element Causing Large-Scale size Variation in the Mitochondrial DNA of the Sea Scallop *Placopecten magellanicus*. Mol. Biol. Evol. **7**: 45-64.
- Lessinger, A. C.; Azeredo Espin, A. M. L. 1996.** Genetic Characterization of the Mitochondrial Genome of Flies that Cause Myiasis by Polymerase Chain Reaction and RFLP. Brazilian J. Genet. **19** (3) - Supplement pp. 279, B-341.
- Lessinger, A. C.; Azeredo Espin, A. M. L. 1997.** Analysis of the Mitochondrial Genome of Flies that Cause Myiasis by Polymersase Chain Reaction and RFLP. Proceedings of the XX International Congress of Entomology pp. 250, 08-085.
- Levinson, G.; Gutman, G. A. 1987.** Slipped-strand Mispairing: a Major Mecanism for DNA Sequence Evolution. Mol. Biol. Evol. **4** (3): 203-221.

- Lewis, D. L.; Farr, C. L.; Farquhar, A. L.; Kaguni, L. S. 1994.** Sequence, Organization, and Evolution of the A+T Region of *Drosophila melanogaster* Mitochondrial DNA. *Mol. Biol. Evol.* **11** (3): 523-538.
- Lewis, D. L.; Farr, C. L.; Kaguni, L. S. 1995.** *Drosophila melanogaster* Mitochondrial DNA: Completion of the Nucleotide Sequence and Evolutionary Comparisons. *Insect Mol. Biol.* **4** (4): 263-278.
- Linhares, A. X. 1981.** Synanthropy of Calliphoridae and Sarcophagidae (Diptera) in the City of Campinas, São Paulo, Brazil. *Revta. Bras. Ent.* **25** (3): 189-215.
- Lunt, D. H.; Zhang, D. -X.; Szymura, J.M.; Hewitt, G. M. 1996.** The Insect Cytochrome Oxidase I Gene: Evolutionary Patterns and Conserved Primers for Phylogenetic Studies. *Insect. Mol. Biol.* **5** (3): 150-165.
- Madeira, N. G.; Dias, E. S.; Marcarenhas, C. S. 1982.** Contribuição ao Conhecimento da Fauna de Calliphoridae (Diptera) Sinantrópicos da Pampulha - Belo Horizonte, M. G. *Rev. Bras. Entomol.* **26**: 137- 140.
- Madeira, N. G.; Silveira, G. A. R.; Pavan, C. 1989.** The Occurrence of Primary Myiasis in Cats caused by *Phaenicia eximia* (Diptera: Calliphoridae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Suplemento* **84** (IV).
- Marchuk, D.; Drumm, M.; Saulino, A.; Collins, F. S. 1990.** Construction of T-vectors, a Rapid and General System for Direct Cloning of Unmodified Polymerase Chain Reaction Products. *Nucl. Acids Res.* **19** (5): 1154.
- Mariluis, J. C. 1983.** Presencia del Género *Chrysomya* Robineau-Desvoidy, 1830 en la Región Neotropical (*Calliphoridae*, *Chrysomyiinae*, *Chrysomyiini*). *Rev. Soc. Entomol. Argent.* **42**: 141-142.

- Mariluis, J. C.; Schnack, J. A.; Muzón, J.; Spinelli, G. R. 1990.** Moscas Calliphoridae y Mesembrinellidae de Puerto Iguazu. Composicion Especifica y Ecologica (Insetos, Diptera). Graellsia **46**: 7-18.
- Marshall, H. D.; Baker, A. J. 1997.** Structural Conservation and Variation in the Mitochondrial Control Region of the Fringilline Finches (*Fingilla spp.*) and the Greenfinch (*Carduelis chlois*). Mol. Biol. Evol. **14** (2): 173-184.
- Martin, A. P. 1995.** Metabolic Rate and Directional Nucleotide Substitution in Animal Mitochondrial DNA. Mol. Biol. Evol. **12** (6): 1124-1131.
- Mendes, J.; Linhares, A. X. 1993.** Atratividade por Iscas e Estágios de Desenvolvimento Ovariano em Várias Espécies Sinantrópicas de Calliphoridae (Diptera). Revta. Bras. Entomol. **37**: 157-166.
- Mignotte, B.; Marsault, J.; Barat-Gueride, M. 1988.** Effects of the *Xenopus Laevis* Mitochondrial Single-stranded DNA-binding protein on the Activity of DNA Polymerase γ . Eur. J. Biochem. **174**: 479-484.
- Mitchell, S. E.; Cockburn, A. F.; Seawright, J. A. 1993.** The Mitochondrial genome of *Anopheles quadrimaculatus* species A: Complete Nucleotide Sequence and Gene Organization. Genome, **36**: 1058-1073.
- Monforte, A.; Barrio, E.; Latorre, A. 1993.** Characterization of the Length Polymorphism in the A+T-rich Region of the *Drosophila obscura* Group Species. J. Mol. Evol. **36**: 214-223.
- Monnerot, M.; Solignac, M. and Wolstenholme, D. R. 1990.** Discrepancy in Divergence of the Mitochondrial and Nuclear Genomes of *Drosophila teissieri* and *Drosophila yakuba*. J. Mol. Evol. **30**: 500-508.
- Moritz, C.; Dowling, E. and Brown, W. M. 1987.** Evolution of Animal Mitochondrial DNA: Relevance for Population Biology and Systematics. Ann. Rev. Ecol. Sys. **18**: 269-292.

- Moriyama, E. N.; Gojobori, T. 1992.** Rates of Synonymous Substitution and Base Composition of Nuclear genes in *Drosophila*. *Genetics* **130**: 855-861.
- Mullis, K. B.; Faloona, F. A. 1987.** Specific Synthesis of DNA in vitro via a Polymerase - Catalyzed Chain Reaction. *Meth. Enzymol.* **155**: 335-350.
- Mullis, K. B.; Faloona, F. A.; Scharf, S. J.; Saiki, R. K.; Horn, G. T.; Erlich, H. A. 1986.** Specific Enzymatic Amplification of DNA in vitro: The Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **51**: 263-273.
- Nei, M. 1991.** Relative Efficiencies of Different Tree Making Method for Molecular Data. In: *Recent Advances in Phylogenetic Studies of DNA Sequences.* pp. 90-128. (Miyamoto, M. M. and Cracraft, J. L. Eds.) Oxford University Press, Oxford.
- Nigro, L.; Solignac, M.; Sharp, P. M. 1991.** Mitochondrial DNA Sequence Divergence in the *Melanogaster* and Oriental Species Subgroups of *Drosophila*. *J. Mol. Evol.* **33**: 156-162.
- Ojala, D.; Montoya, J.; Attardi, G. 1981.** tRNA Punctuation Model of RNA Processing in Human Mitochondria. *Nature* **290**: 470-474.
- Okimoto, R.; Macfarlane, J. L.; Clary, D. O.; Wolstenholme, D. R. 1992.** The Mitochondrial Genomes of Two Nematodes, *Caenorhabditis elegans* and *Ascaris suum*. *Genetics* **130**: 471-498.
- Pääbo, S.; Gifford, J. A.; Wilson, A. C. 1988.** Mitochondrial DNA Sequences from a 7000-year Old Brain. *Nucl. Acid. Res.* **16**: 9775-9787.
- Pääbo, S.; Higuchi, R.; Wilson, A. C. 1989.** Ancient DNA and the Polymerase Chain Reaction. *J. Biol. Chem.* **264**: 9709-9712.
- Palmer, J. D. 1997.** The Mitochondrial that Time Forgot. *Nature* **387**: 454 – 455.

- Palumbi, S. R. 1996.** The Polymerase Chain Reaction. pp. 205-246. In: Molecular Systematics. (Hillis, D.M.; Moritz, C.; Mable, B. K.(Eds.) Sinauer Associates, Inc. Publishers Sunderland, Massachusetts USA.
- Peacock, W. J.; Brutlag, D.; Goldring, E.; Appels, R; Hinton, C. W.; Lindsley; D. L. 1974.** The Organization of Highly Repeated DNA Sequences in *Drosophila melanogaster* Chromosomes. Cold Spring Harbor Symposia on Quant. Biol. **38**: 405-416.
- Peris, S. V. 1986.** Some Additional Data on the Distribution of *Chrysomya* Species in South America (Diptera). Eos **61**: 239-240.
- Plikaytis, B. D.; Carlone, G. M.; Edmonds, P.; Mayer, L. W. 1986.** Robust Estimation of Standard Curves for Protein Molecular Weight and Linear-duplex DNA Base-pair Number After Gel Electrophoresis. Ann. Biochem. **152** (2): 346-364.
- Polan, M. L.; Friedman, S.; Gall, J. G.; Gehring, W. 1973.** Isolation and Characterization of Mitochondrial DNA from *Drosophila melanogaster*. J. Cell Biol. **56**: 580-589.
- Powell, J. R.; Caccone, A.; Amato, G. D.; Yoon, C. 1986.** Rates of Nucleotide Substitution in *Drosophila* Mitochondrial DNA and Nuclear DNA are Similar. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83**: 9090-9093.
- Prado, A. P. & Guimarães, J. H. 1982.** Estado Atual da Distribuição e Dispersão das Espécies do Gênero *Chrysomya* R-D na Região Neotropical (Diptera: Calliphoridae). Revta. Bras. Ent. **26** (3-4): 225-231.
- Pruess, K. P.; Zhu, X.; Powers, T. O. 1992.** Mitochondrial Transfer RNA Genes in a Black Fly *Simulium vattatum* (Diptera: Simuliidae), Indicate Long Divergence from Mosquito (Diptera: Culicidae) and Fruit Fly (Diptera: Drosophilidae). J. Med. Entomol. **29** (4): 644-651.

- Rand, D. M.; Harrison, R.G. 1989.** Molecular Population Genetics of Mitochondrial DNA Size Variation in Crickets. *Genetics* **121**: 551-569.
- Rebeck, G. W.; Samson, L. 1991.** Increased Spontaneous Mutation and Alkylation Sensitivity of *Escherichia coli* Strains Lacking the *ogt* O6-Methylguanine DNA Repair Methyltransferase. *J. Bacteriol.* **173** (6): 2068-2076.
- Richter C.; Park, J. W.; Ames, B. N. 1988.** Normal Oxidative Damage to Mitochondrial and Nuclear DNA is Extensive. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85** (17): 6465-6467.
- Roehrdanz, R. L. 1989.** Intraspecific Genetic Variability in Mitochondrial DNA of the Screwworm Fly (*Cochliomyia hominivorax*). *Biochem. Genet.* **27** (9-10): 551-569.
- Roehrdanz, R. L.; Johnson, D. A. 1988.** Mitochondrial DNA Variation Among Geographical Populations of the Screwworm Fly, *Cochliomyia hominivorax*. *J. Med. Entomol.* **25** (2): 136-141.
- Rubenstein, J. L.; Burtlag, D.; Clayton, D. A. 1977.** The Mitochondrial DNA of *Drosophila melanogaster* Exists in Two Distinct and Stable Superhelical Forms. *Cell* **12** (2): 471-482.
- Saccone, C.; Pesole, G.; Sbisà, E. 1991.** The Main Regulatory Region of Mammalian Mitochondrial DNA: Structure-Function Model and Evolutionary Pattern. *J. Mol. Evol.* **33**: 83-91.
- Saitou and Nei, M. 1987.** The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**: 406-425.
- Sambook, J; Fritsch, E. F. & Maniatis, T. 1989.** Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Sancho, E. 1988.** *Dermatobia*, The Neotropical Warble-Fly. *Parasitology Today* **4** (9): 242-246.

- Satta, Y.; Takahata, N. 1990.** Evolution of *Drosophila* Mitochondrial DNA and the History of the *melanogaster* subgroup. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **87** (24): 9558-9562.
- Shadel, G. S.; Clayton, D. A. 1993.** Mitochondrial Transcription Initiation: Variation and Conservation. J. Biol. Chem. **268** (22): 16083-16086.
- Simon, C. 1991** Molecular Systematics at the Species Boundary: Exploiting Conserved and Variable Regions of the Mitochondrial Genome of Animals via Direct sequencing from Amplified DNA. In: G. M. Hewitt, A. W. B. Johnston and J. P. W. Young (ed.s), NATO ASI Series vol. **57** Molecular Techniques in Taxonomy. Springer-Verlag, Berlin pp.33-71.
- 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.
- Smith, S. M.; Fuerst, P.; Meckenburg, K. L. 1996.** Mitochondrial DNA Sequence of Cytochrome Oxidase II from *Calliphora erythrocephala*: Evolution of Blow Flies (Diptera: Calliphoridae) Ann. Entomol. Soc. Am. **89** (1): 28-36.
- Solignac M.; Monnerot, M.; Mounolou, J. -C. 1986.** Mitochondrial DNA Evolution in the *melanogaster* Species Subgroup of *Drosophila*. J. Mol. Evol. **23**: 31-40.
- Southern, S. O.; Southern, P. J.; Dizon, A. E. 1988.** Molecular Characterization of a Cloned Dolphin Mitochondrial Genome. J. Mol. Evol. **28**: 32-42
- Sperling, F. A. H.; Anderson, G. S. and Hickey, D. A. 1994.** A DNA-Based Approach to the Identification of Insect Species Used for Postmortem Interval Estimation. J. Forensic Sciences, JFSA, **39** (2): 418-427.

- Stern, D. L. 1994.** A Phylogenetic Analysis of Soldier Evolution in the Aphid Family Hormaphididae. *Proc. R. Soc. Lond. B* **256**: 203-209.
- Stevens J.; Wall, R. 1997.** The Evolution of Ectoparasitism in the Genus *Lucilia* (Diptera: Calliphoridae). *Int. J. Parasitol.* **27** (1): 51-59.
- Su, Z. -H.; Ohama, T.; Okada, T. S.; Nakamura, K.; Ishikawa, R.; Osawa, S. 1996.** Phylogenetic Relationships and Evolution of the Japanese Carabinae Ground Beetles Based on Mitochondrial ND5 Gene Sequences. *J. Mol. Evol.* **42**: 124-129.
- Szymura, J. M.; Lunt, D. H.; Hewitt, G. M. 1996.** The Sequence and Structure of the Meadow Grassfopper (*Chorthippus parallelus*) Mitochondrial srRNA, ND2, COI, COII, ATPase8 and 9 tRNA genes. *Insect Mol. Biol.* **5** (2): 127-139.
- Taylor, M. F. J.; Mckechnie, S. W.; Pierce, N.; Kreitman, M. 1993.** The Lepidopteran Mitochondrial Control Region: Structure and Evolution. *Mol. Biol. Evol.* **10**: 1259-1272.
- Taylor, D. B.; Szalanski, A. L.; Peterson II, R. D. 1996.** Identification of Screwworm Species by Polymerase Chain Reaction- Restriction Fragment Length Polymorphism. *Med. Vet. Entomol.* **10**: 63-70.
- Thomas, W. K.; Pääbo, S.; Villablanca, F.; Wilson, A. C. 1990.** Spatial and Temporal Continuity of Kangaroo Rat Populations Shown by Sequencing Mitochondrial DNA from Museum Specimens. *J. Mol. Evol.* **31**: 101-112.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J. 1994.** Clustal W: Improving the Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment Through Sequence Weighting, Positions-Specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice. *Nucleic Acids Research*, **22**: 4673-4680

- Valle, J. S. e Azeredo-Espin, A. M. L. 1995.** Mitochondrial DNA Variation in Two Brazilian Populations of *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae). *Braz. J. Genetics*, **18** (4): 521-526
- Valverde J. R.; Batuecas B.; Moratilla, C.; Marco, R.; Garesse, R. 1994.** The Complete Mitochondrial DNA Sequence of the Crustacean *Artemia franciscana*. *J. Mol. Evol.* **39**: 400-408.
- Watson, J. D.; Hopkins, N. H.; Roberts, J. W.; Steitz, J. A.; Weiner, A. M. 1987.** Molecular Biology of The Gene. Vol. 1 pp. 346-347. Benjamin/Cummings, Menlo Park, California.
- Walberg, M. W.; Clayton, D. A. 1981.** Sequence and Properties of the Human KB Cell and Mouse L Cell D-loop Regions of Mitochondrial DNA. *Nucl. Acids Res.* **9** (20): 5411-5421.
- Wolstenholme, D. R. 1992.** Animal Mitochondrial DNA: Structure and Evolution. *International Review of Cytology*, **141**: 173-216.
- Wolstenholme, D. R; Clary, D. O. 1985.** Sequence Evolution of *Drosophila* Mitochondrial DNA. *Genetics* **109**: 725-744.
- Wolstenholme, D. R.; Goddard, J. M.; Fauron, C. M. -R. 1979.** Structure and Replication of Mitochondrial DNA from the Genus *Drosophila*. *Extrachromosomal DNA* (Cummings, D. J.; Borst, P.; Dawid, I. B.; Weissman, S. M.; Fox, C. F. eds) 409-425. Academic Press, N. Y.
- Wolstenholme, D. R.; Goddard, J. M.; Fauron, C. M. -R. 1983.** Replication of *Drosophila* Mitochondrial DNA. pp. 131-148. in: *Replication of Viral and Cellular Genomes*. (V. Becker ed.) Martinus Nijhoff Publishing Boston.
- Xiong, B.; Kocher, T. D. 1991.** Comparisons of Mitochondrial DNA Sequences of Seven Morphospecies of Black Flies (Diptera: Simuliidae). *Genome* **34** (2): 306-311.

- Xiong, B.; Kocher, T. D. 1993.** Intraespecific Variation in Sibling Species of *Simulium venustum* and *Simulium verecundum complexes* (Diptera: Simuliidae) Revealed by the Sequence of the Mitochondrial 16S rRNA gene. *Mol. Phylogenet. Evol.* **2** (4): 293-303.
- Yoon, C. K; Aquadro C. F. 1994.** Mitochondrial DNA Variation Among the *Drosophila athabasca* Semispecies and *Drosophila affinis*. *J. of Heredity* **85**: 421-426.
- Zannis-Hadjopoulos M.; Frappier, L.; Khoury, M.; Price, C. B. 1988.** Effect of Anti-Cruciform DNA Monoclonal Antibodies on DNA Replication. *EMBO J.* **7** (6): 1837-1844.
- Zhang, D. -X., Hewitt, G. M. 1996.** Highly Conserved Nuclear Copies of the Mitochondrial Control Region in the Desert locust *Schistocerca gregaria*: Some Implications for Population Studies. *Mol. Ecol.* **5** (2): 295-300.
- Zhang, D. -X.; Hewitt, G. M. 1997.** Insect Mitochondrial Control Region: A Review of Its Structure, Evolution and Usefulness in Evolutionary Studies. *Biochem. System. Ecol.* **25** (2): 99-120.
- Zhang, D. -X.; Szymura, J. M.; Hewitt, G. M. 1995.** Evolution and Structural Conservation of the Control Region of Insect Mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol.* **40**: 382-391.
- Zuker, M. 1989.** Computer Prediction of RNA Structure. *Methods Enzymol.* **180**: 262-288.
- Zumpt, F. 1965.** Myiasis in Man and Animals in the Old World. Butterworths, London.
- Zumpt, F. 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 Washington.