

BC/35938

IB/80701



UNICAMP

T/UNICAMP

G336_a

Can

SÍLVIA RODRIGUES GEURAS

**ANÁLISE DO POLIMORFISMO DE POPULAÇÕES BRASILEIRAS DE *Dermatobia*
hominis (DIPTERA: CUTEREBRIDAE) ATRAVÉS DE RFLP DO DNA
MITOCONDRIAL**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo (a) candidato a
Sílvia Rodrigues Geurgas
e aprovada pela Comissão Julgadora.

8/10/98

Dissertação 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 - SP

-1998-

39 23 071

UNIV.	IB
N. OBRIG.	
V.	Ex
BC/	35938
P.	395/98
	012
PRE.	R\$ 41,00
DATA	19/11/98
N.º CPD	400084919

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

Geurgas, Sílvia Rodrigues

G336a Análise do polimorfismo de populações brasileiras de *Dermatobia hominis* (DIPTERA: CUTEREBRIDAE) através do RFLP do DNA mitocondrial/Sílvia, Rodrigues Geurgas. -- Campinas, SP: [s.n.], 1998. 90f.:ilus.

Orientador: Ana Maria Lima de Azeredo Espin

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas.

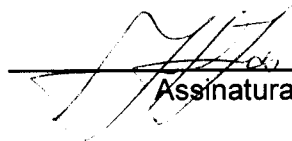
Instituto de Biologia.

1. DNA mitocondrial. 2. Polimorfismo (genética). 3. Genética de populações. I. Espin, Ana Maria Lima de Azeredo. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Campinas 7 de outubro de 1998.

Banca Examinadora

Dra. Ana Maria Lima de Azeredo Espin


Assinatura

Dra. Vera Nisaka Solferini


Assinatura

Dr. Sérgio Russo Matioli


Assinatura

Suplente

Dra. Cristina Yumi Miyaki

Assinatura

Dedico

A meus pais, pelo amor incondicional.

A Maria Elena, consultora intelectual,
conselheira espiritual, mas principalmente, amiga.

There are places I'll remember
All my life though some have changed
Some forever not for better
Some have gone and some remain
All these places have their moments
With lovers and friends I still can recall
Some are dead and some are living
In my life I've loved them all

(Lennon/ McCartney)

Agradeço

A minha família

Aos meus amigos

A todas as pessoas que fizeram minha
passagem por Campinas valer a pena.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	1
1. <i>Dermatobia hominis</i>	1
1.1. Biologia da espécie	1
1.2. Importância Econômica	3
1.3. Métodos de Tratamento	5
2. DNA Mitocondrial	6
2.1. Características	6
2.2. Utilização do DNAm como Marcador Genético	9
2.3. Detecção de Variabilidade Genética Através de RFLP	10
II. OBJETIVOS	15
III. MATERIAL	16
IV. MÉTODOS	18
4.1. Extração de DNA	18
4.2. Análise dos Dados	20
V. RESULTADOS	23
5.1. Padrões de Restrição	23
5.2. Caracterização dos Clados Mitocondriais e Relações Filogenéticas entre os Haplótipos	48
5.3. Variabilidade da Espécie e Estrutura de Populações	51
VI. DISCUSSÃO	60
VII. CONCLUSÕES	68
VIII. RESUMO	70
IX. ABSTRACT	72
X. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

FIGURAS**PÁGINA**

Figura 1	17
Figura 2	24
Figura 3	25
Figura 4	26
Figura 5	27
Figura 6	28
Figura 7	29
Figura 8	41
Figura 9	42
Figura 10	44
Figura 11	46
Figura 12	47
Figura 13	50
Figura 14	53
Figura 15	54

TABELAS**PÁGINA**

Tabela 1	30, 31, 32
Tabela 2	33, 34, 35
Tabela 3	37, 38, 39
Tabela 4	52
Tabela 5	56, 57
Tabela 6	58
Tabela 7	59

ABREVIações

Alf	Alfenas
Ar	Aragoiânia
Br	Brasópolis
C	citossina
Cp	Campinas
CICB	Centro de Indústrias de Curtume do Brasil
DNA	ácido desoxiribonucleico
DEPC	pirocarbonato de dietila
DNAmt	ácido desoxiribonucleico mitocondrial
EDTA	tetracetato de etileno diamina
g	unidade de aceleração gravitacional
G	guanina
GO	Goiás
G	Garça
Id	Indaiatuba
kb	quilobase
km	quilômetro
MG	Minas Gerais
Pb	Paraibuna
PCR	Polymerase Chain Reaction
	Reação em Cadeia da Polimerase
Pg	Ponta Grossa
Pj	Piracanjuba
Pp	Presidente Prudente
PR	Paraná
Pr	Piracaia
Ps	Pirassununga
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
	Polimorfismo de Tamanho de Fragmentos de Restrição
RNAm	ácido ribonucleico mensageiro
RNAr	ácido ribonucleico ribossômico

RNA ^t	ácido ribonucleico transportador
Sc	São Carlos
ScnDNA	DNA nuclear cópia única
SP	São Paulo
Ss	São Sebastião
T	timina
TE	tris EDTA
Tris	tris (hidroximetil) amino metano
UV	ultra violeta
V	volts

I. INTRODUÇÃO

1. *Dermatobia hominis*

1.1. Biologia da Espécie

Dermatobia hominis ou mosca do berne, como é popularmente conhecida no Brasil, pertence à família Cuterebridae que, juntamente com Calliphoridae e Sarcophagidae, são consideradas as principais famílias de moscas causadoras de miíases (Guimarães *et al*, 1983).

"Miíase é a infestação de vertebrados vivos por larvas de dípteros, as quais, pelo menos durante um certo período de seu desenvolvimento, se alimentam de tecidos vivos ou mortos do hospedeiro, de suas substâncias corporais líquidas ou alimento por ele ingerido" (Zumpt, 1965). Quando a infestação se dá em tecidos vivos, como por *D. hominis*, é denominada primária e quando ocorre em tecidos necrosados é considerada secundária.

D. hominis é um parasita obrigatório durante a fase larval, conforme a classificação parasitológica de Patton, 1922 (em Hall and Wall, 1995). Os adultos, cujo período de vida em laboratório varia de 2 a 11 dias (Ribeiro *et al*, 1993), possuem as peças bucais atrofiadas, e as necessidades nutricionais necessárias para esta fase são supridas pela energia armazenada durante o estágio larval (Hall and Wall, 1995).

Essa espécie possui uma distribuição neotropical, sendo encontrada em todos os países das Américas Central e do Sul, exceto Chile, e em algumas ilhas do Caribe (Roncalli and Usher, 1988; Uribe *et al*, 1989; Mateus, 1977). Ocorre em florestas, principalmente nas margens de matas primárias e secundárias, florestas galeria e plantações de *Eucaliptus* (Andrade, 1929, em Guimarães *et al*, 1983). No Brasil, é encontrada principalmente nos estados de São Paulo, Mato Grosso, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Espírito Santo e Bahia, em áreas com altitudes entre 400

a 1.500 metros, umidade relativa do ar alta e temperatura moderada (Neel *et al*, 1956; Moya-Borja, 1982; Roncalli and Usher, 1988).

A mosca do berne utiliza insetos vetores para a dispersão de seus ovos, principalmente moscas e mosquitos zoófilos, presentes nas proximidades da área de pasto ou nos currais (Guimarães *et al*, 1983; Ruíz-Martínez *et al*, 1996). Os insetos são capturados pelas fêmeas de *D. hominis* durante o voo e os ovos depositados na porção média ventral de um ou ambos os lados do abdômem do vetor (Artigas e Serras, 1965). Estes ficam dispostos na forma de cachos em número variável, com até 800 ovos, fortemente aderidos entre si e ao vetor por meio de uma substância adesiva (Cogley and Cogley, 1989). Devido a este comportamento, a identidade do adulto da mosca do berne é frequentemente ignorada, incriminando-se uma série de insetos como sendo os responsáveis pela miíase. Os vetores são numerosos e pertencem a várias famílias: Culicidae, Simuliidae, Tabanidae, Faniidae, Anthomyiidae, Muscidae, Sarcophagidae, Calliphoridae e Ixodidae, todas da ordem Diptera, com exceção da última, que pertence à ordem Acari (revisão em Guimarães *et al*, 1983).

O tempo de incubação dos ovos é de, em média, 5 dias (revisão em Ribeiro e Oliveira, 1987), mas as larvas podem eclodir depois de um período de tempo considerável, de 5 a 20 dias a 28°C (Mourier and Banegas, 1970, em Hall and Wall, 1995), o que pode ajudar no processo dispersivo da larva.

Quando o inseto vetor pousa no hospedeiro, a larva de primeiro instar eclode em resposta ao súbito aumento de calor (Mourier and Banegas, 1970, em Hall and Wall, 1995), penetrando na derme no primeiro local de contato ou andando por um certo tempo para então perfurar e invadir os tecidos subcutâneos do hospedeiro, onde irá permanecer até completar seu desenvolvimento (Guimarães *et al*, 1983). Poucos dias depois desenvolve-se um furúnculo no local da penetração; nos primeiros estágios do desenvolvimento larval origina-se um pequeno orifício respiratório no furúnculo que, posteriormente, fica parcialmente oculto por secreções purulentas e outros exudados (Guimarães *et al*, 1983). Não existem dados precisos

sobre a duração dos estádios larvais. Segundo Dunn (1930), em Guimarães *et al* (1983), o primeiro estadio é de 12 dias; o segundo estadio é de 18 dias e o terceiro, de 18 dias, num total de 48 dias. No gado, a duração do estágio larval é de 40-60 dias, dependendo da estação do ano; na estação seca pode durar até 120 dias.

Ao atingir a maturidade, a larva abandona o hospedeiro e cai no solo, onde penetra e ocorre a fase de pupa (Guimarães *et al*, 1983). A duração média da fase de pupa é de 26 dias e é dependente de condições ambientais (Ribeiro e Oliveira, 1987). Zeledon (1957), em Moya-Borja, 1982, observou que temperaturas baixas aumentam a duração do período de pupa e que em temperaturas altas (35°C) não ocorre emergência de adultos. Existe também uma relação positiva entre o grau de infestação do gado e temperatura e umidade relativa do ar; Bellato *et al*, (1986), e Magalhães e Lima (1988), concluíram que as infestações ocorrem durante o ano inteiro, aumentando após o início da estação de chuvas e atingindo o pico máximo em pleno verão. *D. hominis* pode ter 3 gerações por ano (Lombardero and Fontana, 1968, em Moya-Borja *et al*, 1993), com adultos, ovos, larvas e pupas sincrônicos (Andersen, 1902, em Moya-Borja *et al*, 1993).

Os dados disponíveis na literatura sobre a biologia e comportamento da espécie são relativamente escassos e, muitas vezes, contraditórios. As observações realizadas diretamente no campo por pesquisadores, como grau de resistência de diferentes raças de bovinos ao berne (Oliveira e Alencar, 1990; Thomas, 1988), não chegam a um consenso. Esta situação é compreensível, desde que a fase adulta da mosca é curta e não há um método eficiente de criação da espécie em laboratório (Zeledon e Silva, 1987).

1.2. Importância Econômica

D. hominis é a principal causadora de miíase primária no rebanho bovino brasileiro e uma das mais importantes pragas da pecuária nacional. Sua importância econômica é

evidenciada pelo retardo do crescimento do animal severamente parasitado, queda de produção de leite, desvalorização do couro devido às perfurações de caráter irreversível causadas pela larva (Moraes *et al*, 1986), altas despesas para aquisição de bernicidas e tempo dispendido para o combate às larvas (Costa e Freitas, 1961; Serra, 1963)

O Brasil possui um rebanho bovino estimado em cerca de 120 milhões de cabeças, que deveria produzir, aceitando-se uma taxa anual de abate de 12%, ao redor de 14,4 milhões de peças de couros por ano. Entretanto, segundo informações do Centro de Indústrias de Curtume do Brasil (CICB) apenas 15% deles (2,16 milhões) são classificados como de primeira qualidade, com o restante sendo designado como de segunda categoria ou refugo (Moraes *et al*, 1986); 30% desses estragos são causados pelo berne (Horn e Arteché, 1984). Horn e Arteché, 1985, informaram que o berne, a bicheira e o carrapato causam anualmente perdas de 727,6 mil toneladas de carne e 1,6 milhões de litros de leite, além de o país ter que importar, anualmente, 25 milhões de dólares em peles e gastar 50 milhões com medicamentos para o seu combate.

Além de bovinos, o berne parasita outros animais domésticos, tendo sido registrado inclusive casos de infestação de aves (tucano e peru; Sambon, 1922, em Cogley and Cogley, 1989). A infestação humana por *D. hominis* também é comum, e pode causar sérios danos, dependendo do local de instalação da larva. A grande maioria dos casos reportados na literatura são de miíases dérmicas, mas oftalmomiíases, rinomiíases, tumores ilíacos e miíases cerebrais, que são fatais nos casos em que a larva penetra na porção fibrosa da fontanela de crianças, também ocorrem (Rossi e Zucoloto, 1972, Guimarães *et al*, 1983).

Com o aumento de viagens aéreas intercontinentais nas últimas décadas, casos de infestação humana e de animais domésticos de pequeno porte, como cães (Roosje *et al*, 1992, em Leclercq, 1995), têm sido relatados em países onde esta espécie não ocorre naturalmente, como Austrália (Rubel *et al*, 1993), Bélgica (Leclercq, 1995), Canadá (Johnston and Dickinson, 1996), Espanha (Latorre *et al*, 1993, Arocha *et al*, 1996), Finlândia (Reunala *et al*, 1990), França

(Szczurko *et al*, 1994), Jamaica (Sue-Ho and Lindo, 1995), Nova Zelândia (Murdoch *et al*, 1996) e Reino Unido (Bowry and Cottingham, 1997).

Esse tipo de situação pode ser considerada de risco, já que existe a possibilidade de introdução da espécie em outros continentes por meio dos animais ou humanos infectados, onde poderia também se tornar uma praga da pecuária. Casos de introdução de *Cochliomya hominivorax* e *Chrysomya bezziana*, espécies causadoras de miíases primárias no Novo e Velho Mundo, respectivamente (revisão em Spradbery, 1994), mostram que é necessário se fazer um programa de combate ou, no mínimo, de controle dessas espécies nocivas em suas áreas de origem. Esse controle só será efetivo quando a biologia, comportamento, variabilidade genética e dinâmica das populações das espécies forem conhecidos em toda sua área de distribuição original.

1.3. Métodos de Tratamento

Atualmente, os métodos de tratamento incluem os chamados "caseiros", que se baseiam no asfixiamento da larva com substâncias como fumo, cinzas de cigarro e bacon, e o uso de inseticidas organofosforados, tais como Ivermectin, Doramectin, Abamectin e Closantel (Roncalli and Usher, 1988; Moya-Borja *et al*, 1993; Cruz *et al*, 1993). Embora estes inseticidas sejam eliminados dos tecidos rapidamente, não restringindo o consumo humano do leite e/ou carne do animal tratado (Graham *et al*, 1958, em Maia e Guimarães, 1986), seu período de eficácia na prevenção das miíases é curto (30 a 60 dias), tornando esta metodologia dispendiosa. Além disso, o uso contínuo de inseticidas pode propiciar o aparecimento de resistência a esses produtos em *D. hominis*.

Existem trabalhos voltados para o estudo da resposta imunológica do hospedeiro contra as diferentes fases larvais de *D. hominis*, sugerindo que a imunização do gado pode ter um papel importante no controle biológico da miíase (Lello and Peraçoli, 1993; Lello and Boulard,

1990). Para que um programa desse tipo seja implantado com sucesso, é fundamental que se tenha um conhecimento do nível de variabilidade intraespecífica e estrutura genética das populações da espécie.

2. DNA Mitochondrial

2.1. Características

O DNA mitocondrial (DNAm_t) animal é uma molécula circular de fita dupla, covalentemente fechada; a região codificadora, que abrange mais de 90% da molécula, é composta por 37 genes (2 RNAr, 22 RNAt e 13 RNAm). As sequências intergênicas, quando presentes, são pequenas, e não existem introns, transposons ou pseudogenes. A região não-codificadora, chamada "D-loop" em vertebrados e equinodermos e A+T em invertebrados, está relacionada com o início da replicação e transcrição (Brown, 1983; Avise *et al*, 1987).

O tamanho do genoma mitocondrial varia de 15,7 a 17,7 kb em vertebrados e de 15,6 a 36 kb em invertebrados (Avise and Lansman, 1983; Boyce *et al*, 1989). O tamanho do genoma parece ser estável dentro das espécies e, em muitos casos, dentro de grupos taxonômicos maiores. As pequenas variações de tamanho, de uma a cerca de 150 pares de bases, são resultado de pequenas adições ou deleções que podem ocorrer ao longo de toda a molécula. Já as grandes variações, de cerca de 9,0 kb, são resultado de grandes adições/deleções no genoma, e ocorrem exclusivamente nas regiões não codificadoras (Brown, 1983; Moritz *et al*, 1987).

O conteúdo gênico é relativamente conservado entre os animais multicelulares, mas a organização desses genes difere entre grupos taxonômicos maiores. A comparação entre os mapas gênicos de mamíferos e *Drosophila* sugere que devam ter acontecido múltiplos eventos de translocação e inversão, gerando as diferenças observadas na ordem gênica (Attardi, 1985).

Admite-se que não há recombinação no DNAm, mas foram encontradas evidências de sua ocorrência no nematóide *Meloidogyne javanica* (Lunt and Hyman, 1997).

A composição de bases do genoma mitocondrial, expressa em conteúdo de CG, tem uma grande variação dentro do reino animal. Esta varia de 21% em *Drosophila melanogaster* a 50% em pato doméstico e, no geral, o conteúdo total de CG nos invertebrados parece ser menor do que em vertebrados. Não se sabe a razão de existir tal tendência, mas, com exceção de *Drosophila*, não há uma grande distribuição de grupos G ou T no genoma mitocondrial dos organismos (Brown, 1983).

Os estudos comparativos do DNAm de várias espécies levaram à elucidação da dinâmica da evolução do genoma mitocondrial. Brown *et al* (1979), compararam o DNAm de uma variedade de espécies de mamíferos, relacionando-os com a estimativa de tempo de divergência entre as espécies, e concluíram que a taxa de evolução do DNAm é aproximadamente 10 vezes maior do que a taxa do DNA nuclear cópia única (scnDNA) para espécies que divergiram há menos de 15 milhões de anos. Essa taxa de evolução diminui, se tornando igual ou menor do que a do scnDNA, quando o tempo de divergência entre as espécies é maior. Em *Drosophila*, a taxa de evolução do DNAm e do scnDNA parecem ser semelhantes, mas quando são consideradas apenas as regiões codificadoras de proteínas, a taxa de evolução do DNAm é 2 a 4 vezes maior do que a do scnDNA. Comparações entre as taxas relativas de evolução entre os dois genomas mostram que estas variam de grupo para grupo, podendo haver diferença entre os dois subgêneros de *Drosophila* (Powell, 1997).

Brown *et al* (1982), comparando sequências homólogas do DNAm de primatas superiores, observaram que a taxa de evolução é diferente entre os genes. Foi verificado também que a evolução do DNA mitocondrial se dá principalmente por substituições nucleotídicas, e que essas substituições são predominantemente do tipo transições, onde uma base purica ou pirimídica é substituída por outra base do mesmo grupo. Desse modo, na fase em que a taxa de evolução do DNAm é rápida, muitas das substituições ocorrem nas

sequências intergênicas e em posições do códon que não causem trocas de aminoácidos nas proteínas. A diminuição da taxa começa quando as substituições nucleotídicas levam à substituições de aminoácidos nas proteínas.

A alta taxa evolutiva diferenciada entre os genes, mais o fato de que ao longo da molécula existe um número significativo de ribonucleotídeos incorporados (Attardi, 1985), pode ser um indicador de que o mecanismo de reparo do DNAm seja ineficiente (Cann and Wilson, 1983). Como existe um grande número de mitocôndrias funcionais na célula, o DNAm estaria livre das restrições funcionais que atuam no genoma nuclear (Brown, 1983).

O padrão de herança mitocondrial é predominantemente do tipo materno; a progênie de ambos os sexos recebe o genótipo materno, mas somente as filhas irão transmiti-lo às gerações futuras (Brown, 1983). Normalmente, os indivíduos possuem apenas um tipo de DNAm em suas células; existem casos, porém, de indivíduos heteroplásmicos, que apresentam dois ou mais tipos de DNAm (Brown, 1983; revisão em Avise *et al*, 1987). Existem duas hipóteses para explicar a heteroplasmia; uma delas é que ela apareça em função de mutações de uma linhagem celular (Avise *et al*, 1987). A outra hipótese é de que ocorra uma contribuição paterna de DNAm durante a fertilização. Evidências de contribuição paterna provêm de estudos de Kondo *et al* (1990). Foi estimado que a proporção de DNAm paterno por fertilização em *Drosophila* é de cerca de 0,1% por geração; de 4 linhagens originadas de cruzamentos interespecíficos, 3 apresentaram somente DNAm paterno e uma apresentou DNAm materno e paterno.

A predominância de herança materna do DNAm pode estar ligada a mecanismos ativos celulares, como degradação da mitocôndria do espermatozóide, ou vantagem replicativa do DNAm materno, como resultado de interações epistáticas entre o genoma nuclear e o citoplasma coevoluídos (Avise, 1991).

2.2. Utilização do DNAm como Marcador Genético

A partir da década de 80 o DNAm começou a ser amplamente utilizado em estudos evolutivos, principalmente nos níveis intra e interespecíficos (Wilson *et al*, 1985; Powell, 1994). Devido às suas características únicas (herança materna e alta taxa de evolução), os níveis de variação populacional detectados com essa molécula são maiores do que aqueles obtidos com o uso de isozimas, que eram, até então, os marcadores moleculares mais utilizados. O DNAm também é uma alternativa ao uso do DNA nuclear, pois a análise dos dados obtidos é mais simples do que a análise de dados nucleares, já que não existe recombinação no genoma mitocondrial (Wilson *et al*, 1985).

A detecção da variabilidade do DNAm pode ser feita com o uso de endonucleases de restrição (RFLP ou construção de mapas de restrição), ou pelo sequenciamento direto de regiões clonadas ou amplificadas por PCR (Polymerase Chain Reaction) (Wilson *et al*, 1985; Simon *et al*, 1994). Os dados obtidos são utilizados para a análise de variabilidade intra e interespecífica, identificação de espécies e populações, análise filogenética, estrutura de populações, fluxo gênico matrilineal, detecção de gargalos populacionais, efeitos de fundador e dinâmica de zonas híbridas (Avice *et al*, 1987; Moritz *et al*, 1987; Lambert and Millar, 1995).

A distribuição e estrutura de populações atuais de uma espécie refletem o padrão histórico de dispersão de seus indivíduos, assim como eventos de fragmentação de seu meio ambiente. Avice *et al* (1987), na tentativa de explicar o padrão de distribuição atual das espécies, propôs a existência de 4 grandes categorias filogeográficas no reino animal, baseando-se no grau de divergência entre os haplótipos mitocondriais e localização geográfica dos variantes.

A filogenia do DNAm pode se apresentar descontínua, ou seja, um conjunto de haplótipos intimamente relacionados difere de outro conjunto por muitos passos mutacionais.

Tais conjuntos ou clados podem estar localizados em regiões geográficas distintas (categoria I) ou ocorrer em simpatria (categoria II). Alternativamente, a filogenia pode se apresentar contínua, com haplótipos pouco divergentes entre si; também estes podem ocorrer tanto alopatricamente (categoria III) como simpatricamente (categoria IV).

2.3. Detecção de Variabilidade Genética Através de RFLP

A técnica de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) se baseia na digestão do DNAm com diferentes endonucleases de restrição, produzindo um número variável de fragmentos da molécula, que são posteriormente separados de acordo com seu tamanho por eletroforese. O grau de similaridade genética dos indivíduos é proporcional à quantidade de fragmentos de restrição compartilhados entre eles (Avice and Lansman, 1983; Nei and Li, 1979; Nei and Miller, 1990).

Em grupos de espécies que não apresentam diferenças morfológicas significativas, como *Anopheles*, a análise do DNAm tem contribuído para a detecção e diferenciação de espécies crípticas (Mitchell *et al*, 1992; Kambhampati *et al*, 1992; Conn *et al*, 1993; Narang *et al*, 1993), diferenciação entre algumas populações geográficas de espécies vetores da malária (Conn *et al*, 1993), e relações filogenéticas dentro e entre os subgrupos da espécie (Kambhampati and Rai, 1991).

Kambhampati and Rai (1992), analisaram o DNAm de populações de *Aedes albopictus*, e foi verificado que estas apresentaram baixo nível de polimorfismo, com alguns haplótipos sendo compartilhados pelas populações. Os dados sugerem que essa espécie sofreu uma expansão recente e que a mistura de haplótipos é resultado de um fluxo gênico causado por intervenção humana.

Szalanski *et al* (1996), não encontraram variação no DNAm de *Stomoxys calcitrans* entre populações do Canadá, Nebraska e Texas, o que é um indicativo de que existe um alto fluxo gênico entre elas.

Hale and Beckenback (1985), comprovaram que existe fluxo gênico entre o grupo de espécies crípticas formado por *Drosophila pseudoobscura*, *D. persimilis* e *D. miranda* do Pacífico Norte, com cada uma das espécies possuindo uma alta variabilidade no genoma mitocondrial.

Cariou *et al* (1990), observaram que existe baixo polimorfismo tanto de DNAm quanto de isozimas em *D. sechellia*, fato que é consistente com o pequeno tamanho populacional dessa espécie.

Latorre *et al* (1986), analisaram populações de *D. subobscura* nas Américas, encontrando somente 2 haplótipos mitocondriais, sendo que um deles foi encontrado em populações de ilhas do Atlântico, nenhum em populações africanas, e ambos na Europa. Afonso *et al* (1990), trabalhando com a mesma espécie no Velho Mundo, confirmaram que existe estruturação das populações naturais dessa espécie, tanto localmente como entre os continentes, de acordo com os dados de outros marcadores moleculares (revisão em Afonso *et al*, 1990). Latorre *et al* (1992), analisando o DNAm e isozimas de populações do Velho Mundo, encontraram que as populações eram estruturadas para o DNAm, mas panmítica para os genes nucleares.

Hale and Singh, (1986, 1987, 1991), analisando amostras *D. melanogaster* provenientes de vários continentes, encontraram uma grande variabilidade entre essas populações geográficas, causada tanto por variação em sítios de restrição como por heteroplasma. As populações do Novo e Velho Mundo eram diferenciadas com relação ao DNAm, diferentemente dos resultados obtidos com genes nucleares. As populações da América do Norte se mostraram pouco variáveis, sugerindo que a colonização do continente é recente.

De Salle *et al* (1987), detectaram variação temporal e espacial entre dois haplótipos mitocondriais de *D. mercatorum* em uma população no Havaí, em contraste com os dados obtidos com isozimas, que não revelaram nenhum padrão de diferenciação entre as populações. Os dados obtidos são consistentes com o comportamento de dispersão da espécie, onde machos e fêmeas exibem igual capacidade de migração. Dessa forma, existe um fluxo gênico suficiente para homogeneizar as populações em relação aos marcadores nucleares, embora este não seja tão intenso a ponto de impedir a estruturação do DNAm.

Os dados morfológicos de populações de *D. silvestris* no Havaí indicam que existem duas linhagens diferentes na ilha, apesar de as análises cromossômicas e de isozimas não detectarem diferenças genéticas fixadas entre as populações do leste e do oeste da ilha (revisão em De Salle e Templeton, 1992). A análise do DNAm confirmou a existência dessas duas linhagens, havendo evidências também de que a colonização da parte leste da ilha ocorreu de norte para sul, baseado nas relações entre os haplótipos encontrados (De Salle and Templeton, 1992)

Diferentes linhagens mitocondriais, geograficamente separadas, foram observadas por Baba-Aïssa *et al* (1988), em *D. simulans*. Uma delas é amplamente distribuída mundialmente, sugerindo que todas essas populações tenham a mesma origem. Dentro de cada linhagem, há pouca variabilidade mitocondrial, fato também observado por Nigro (1988).

Halliburton and Baker (1993), analisaram o DNAm de populações de *D. buzzatti* na Austrália, espécie nativa do Brasil e Argentina, e não detectaram nenhuma variabilidade mitocondrial, sugerindo um afunilamento populacional no processo de colonização do continente. Rossi *et al* (1996), analisando populações dessa espécie provenientes da Argentina e Península Ibérica, encontraram uma baixa variabilidade entre as populações argentinas, e monomorfismo nas populações européias, o que sugere que ocorreu também um afunilamento populacional recente dessa espécie na Europa.

Tamura *et al* (1991), analisando a variabilidade de *D. sulfurigaster albostrigata*, de distribuição continental no Sudeste Asiático, e *D. s. bilimbata*, de distribuição em algumas ilhas do Oceano Pacífico, observaram que a divergência entre as duas subespécies era alta; a diversidade de haplótipos era maior na subespécie de distribuição insular, indicando que a subdivisão espacial das populações é o fator principal na determinação do polimorfismo do DNAm de dessa espécie.

Chang *et al* (1994), analisaram populações de *D. immigrans* provenientes de Taiwan e encontraram baixa variabilidade entre as populações; esse nível de variabilidade também foi encontrado para *D. formosana* no mesmo estudo, e pode estar indicando que ocorreu um afunilamento populacional durante a recente introdução das espécies na região.

A análise de populações de *Cochliomyia hominivorax*, importante califorídeo causador de miíase, provenientes do continente americano revelou um grande polimorfismo no DNAm desta espécie. Roehrdanz and Johnson (1988), analisando populações originárias do México, Jamaica e Estados Unidos observaram alta variabilidade nas amostras provenientes da Jamaica, sugerindo que esta população poderia ter se originado a partir de indivíduos da América do Sul, tendo se separado das populações continentais há milhões de anos. Roehrdanz (1989), encontrou 16 haplótipos mitocondriais em 30 populações de *C. hominivorax* da América do Norte e Central. Dois desses haplótipos estavam amplamente distribuídos entre as populações (Sul e costa oeste do México) e 14 deles eram exclusivos de algumas localidades, indicando um pequeno fluxo gênico interpopulacional, principalmente entre México e Guatemala. Esses resultados estão em desacordo com outros marcadores moleculares (revisão em Roehrdanz, 1989).

Taylor *et al* (1996), analisaram populações de *C. hominivorax* e *C. macellaria* provenientes do Caribe, América do Norte e América do Sul. Enquanto as populações de *C. macellaria* não apresentaram variabilidade, os haplótipos encontrados para *C. hominivorax* foram divididos em três grupos representativos de cada grande área analisada, sem, no

entanto, haver uma distribuição geográfica definida, indicando que ocorre fluxo gênico entre as áreas.

Narang and Degrugillier (1995), através dos padrões do DNAm_t já conhecidos para *C. hominivorax* em sua área original de distribuição, puderam confirmar que indivíduos coletados na Líbia, durante a fase final do programa de erradicação da espécie no país, eram provavelmente provenientes da América do Sul, e não do México, América do Norte ou Costa Rica.

No Brasil, a análise do DNAm_t de populações de *C. hominivorax* realizadas por Azeredo-Espin (1993), Infante (1994) e Infante e Azeredo-Espin (1995), revelou uma alta variabilidade intra e interpopulacional de genótipos mitocondriais, sugerindo que existem diferentes linhagens maternas contribuindo para a manutenção das populações. Assim como os resultados obtidos para as populações norte-americanas, observou-se um pequeno número de haplótipos distribuídos entre as populações e um grande número de haplótipos locais, evidenciando um reduzido fluxo gênico entre algumas das populações, provavelmente associado com a distância entre as localidades.

Valle and Azeredo-Espin (1995), detectaram variabilidade no genoma mitocondrial entre duas populações de *C. macellaria* do sudeste brasileiro. Foram observados 7 haplótipos; sendo alguns deles exclusivos de certas populações, comprovando que diferentes linhagens maternas são responsáveis pela manutenção das populações nas diferentes localidades.

Uma vez que não existem estudos referentes à variabilidade genética em populações naturais de *Dermatobia hominis*, neste trabalho foi analisado o DNA mitocondrial para caracterizar o polimorfismo genético, estrutura de populações e alguns aspectos evolutivos desta importante praga da pecuária nacional.

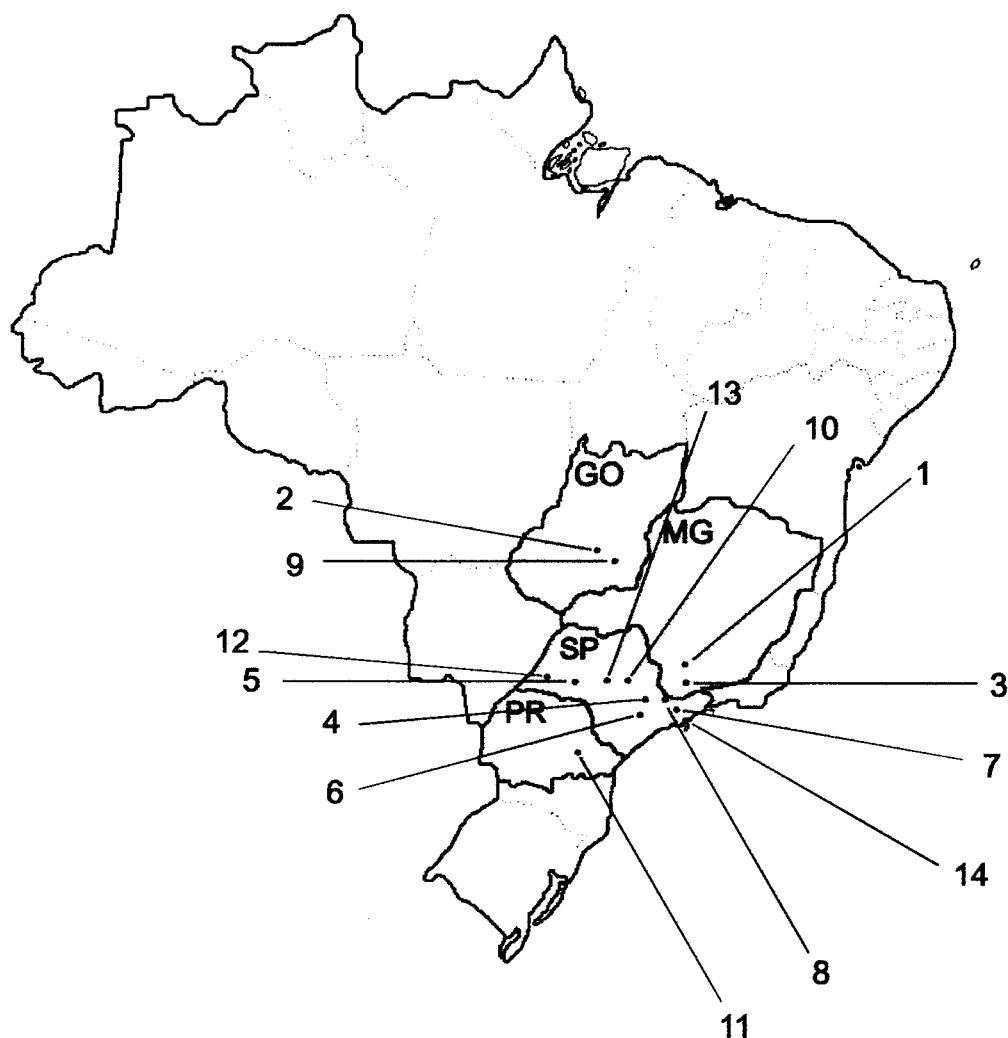
II. OBJETIVOS

Caracterizar a variabilidade genética e estrutura de populações brasileiras de *Dermatobia hominis*, através da técnica de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) do DNA mitocondrial.

III. MATERIAL

Os materiais utilizados foram larvas e pupas de *Dermatobia hominis*, coletados diretamente em bovinos parasitados. Os espécimes foram colocados em potes contendo serragem e mantidos em estufa (27°C, umidade: 90%) por aproximadamente 20 dias, sendo então congelados a -70°C até sua utilização. Algumas larvas foram mantidas em conservantes químicos (etanol absoluto, 95% e 70%; solução de Carnoy (etanol: ácido acético, 3:1); metanol) à temperatura ambiente logo após a coleta, até sua utilização.

As coletas foram realizadas nos municípios de Aragoiânia (n=13) e Piracanjuba (n=5) no estado de Goiás, Alfenas (n=37) e Brasópolis (n=22) no estado de Minas Gerais, Ponta Grossa (n=20) no estado do Paraná, e nos municípios de Campinas (n=8), Garça (n=19), Indaiatuba (n=11), Paraibuna (n=23), Piracaia (n=13), Pirassununga (n=21), Presidente Prudente (n=15), São Carlos (n=13) e São Sebastião (n=7), no estado de São Paulo (figura 1).



Localidade	Latitude G M S	Longitude G M S	Altitude (m)	Localidade	Latitude G M S	Longitude G M S	Altitude (m)
1. Alfenas	-2 25 45	45 56 50	881	8. Piracaia	-23 03 14	46 21 29	792
2. Aragoiânia	-16 54 43	49 27 05	859	9. Piracanjuba	-17 18 10	49 01 00	742
3. Brasópolis	-22 28 25	45 36 27	922	10. Pirassununga	-21 59 46	47 25 33	627
4. Campinas	-22 54 20	47 03 39	854	11. Ponta Grossa	-25 05 42	50 09 43	969
5. Garça	-22 12 38	49 39 22	683	12. Pres. Prudente	-22 07 32	51 23 20	475
6. Indaiatuba	-23 05 25	47 13 05	624	13. São Carlos	-22 01 03	47 53 27	854
7. Paraibuna	-23 23 10	45 39 44	635	14. São Sebastião	-23 45 36	45 24 35	1

Figura 1. Localização dos municípios onde foram realizadas as coletas de *Dermotobia hominis*. Os municípios estão numerados no mapa de acordo com a tabela. GO = Goiás; MG = Minas Gerais; PR = Paraná; SP = São Paulo.

IV. MÉTODOS

4.1. Extração do DNA

Foi feita a extração de ácido nucleico total de cada indivíduo separadamente. O intestino das larvas foi retirado antes do início da extração do DNA, evitando-se assim uma possível contaminação do DNA de *D. hominis* por parte de eventual material biológico do animal parasitado presente no aparelho digestivo da larva. Cada indivíduo foi colocado em um tubo Corex contendo 1ml de solução tampão de homogenização (2M Tris, 5M NaCl, 50% sacarose, 0,5M EDTA, pH 7,5), e homogeneizado com a ajuda de um macerador. Adicionou-se então 1 ml de solução de lise (2M Tris, SDS 10%, 0,5M EDTA, DEPC). Após incubação em gelo por 3 minutos, adicionou-se 2 ml de fenol e em seguida, os tubos foram centrifugados por 10 minutos à 3.000 g (4°C). Os indivíduos preservados em conservantes foram incubados em banho-maria (56°C) por 3 horas, com diferentes concentrações de proteinase K, após a adição da solução de lise.

Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para outro tubo Corex, adicionando-se 1ml de fenol e 1 ml de clorofórmio/ álcool isoamílico 24:1, com posterior incubação em gelo por 2 minutos, seguido de centrifugação por 10 minutos à 3.000 g (4°C). O sobrenadante foi transferido para outro tubo Corex, acrescentando-se 2 ml de clorofórmio/ álcool isoamílico 24:1. Adicionou-se então 1,5 ml de 1×TE, 150 µl de acetato de sódio 3M e 9 ml de etanol absoluto gelado. Incubou-se à -20°C por 1 a 2 horas, centrifugando-se depois a 11.000 g por 45 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em 1 ml de 1×TE.

Adicionou-se 50 µl de acetato de sódio 3M e 2,75 ml de etanol absoluto gelado. Incubou-se à -70°C por 30 minutos e centrifugou-se à 11.000 g por 45 minutos. O sobrenadante foi

descartado, o precipitado seco e ressuspenso em 300 µl de 1×TE. Esta solução foi armazenada em microtubos à -20°C.

O DNA de cada indivíduo foi digerido separadamente, usando-se 13 endonucleases de restrição que reconhecem de 4 ou 6 pares de bases. As enzimas, com os respectivos sítios de clivagem, que foram utilizadas são: *Bam*HI (G/GATCC), *Cl*al (AT/CGAT), *Eco*RI (G/AATTC), *Eco*RV (GAT/ATC), *Hae*III (GG/CC), *Hind*III (A/AGCTT), *Kpn*I (GGTAC/C), *Msp*I (C/CGG), *Pst*I (CTGCA/G), *Pvu*II (CAG/CTG), *Sst*I (GAGCT/C), *Xba*I (T/CTAGA) e *Xho*I (C/TCGAG). As condições de digestão foram as recomendadas pelos fornecedores Gibco-Brl, Pharmacia e New England Biolabs.

Foram feitos géis de agarose a 0,8% e 1% utilizando-se de 14 a 56 amostras de DNA por gel, dependendo do tamanho da cuba de eletroforese utilizada, com λDNA/*Hae*III e *Hind*III/φX147 como marcadores de tamanho molecular. A eletroforese foi conduzida sob uma voltagem de 20 a 25 V, à temperatura ambiente, por 15 horas.

A transferência do DNA para membranas de nylon foi realizada através da técnica de Southern blot (Southern, 1975). Desnaturou-se o DNA em 250 ml de solução de desnaturação (50% 0,5M NaOH, 50% 1,5M NaCl) por 1 hora, seguido de 2 horas em 250 ml de solução de neutralização (50% 1,5M NaCl, 50% 1M Tris pH 7,4). A transferência do DNA para Nylon Hybond-N (Amersham) foi feita em 10 × SSC (75mM NaCl, 7,5mM Na citrato, pH 7,0) durante a noite. O filtro foi lavado em 6 × SSC por 5 minutos à temperatura ambiente, antes da fixação dos fragmentos de DNA na membrana, feita em estufa a 80°C por duas horas, ou em UV Stratalinker 2400 (Stratagene), conforme recomendação do fabricante. O gel foi corado com brometo de etídio e visualizado em um transiluminador UV para confirmar a transferência do DNA.

Hibridou-se o DNAm_t com sonda heteróloga de DNAm_t de *Cochliomyia hominivorax* marcada com ATP ou CTP α ³²P por “nick translation”. Os filtros foram incubados em solução

de pré-hibridização (20× SSC, formamida deioizada, SDS 10%, 50× Denhardt's e DNA de esperma de salmão desnaturado) por duas horas a 37°C, e a sonda incorporada a essa solução, depois de desnaturada. A hibridização foi feita durante a noite a 37°C. Em seguida, o filtro foi lavado em solução 2 × SSC + 0,5% SDS à temperatura ambiente e posteriormente a 50°C em solução 0,1× SSC + 0,1% SDS.

Para a detecção dos fragmentos de DNA o filtro foi exposto em filme de raio X Kodak XAR-5 em um cassete provido de intensificador de fluorescência a -70°C. O tempo de exposição médio foi de 12 horas.

4. 2. Análise dos dados

A análise dos dados foi feita baseando-se nos haplótipos mitocondriais obtidos a partir dos padrões produzidos pelas endonucleases de restrição. A variabilidade haplotípica e nucleotídica da espécie foram calculadas utilizando-se as opções Generate, D e DA do programa REAP, versão 4.0 (The Restriction Enzyme Analysis Package; Mc Elroy *et al*, 1992) e a análise de estrutura de populações foi feita pela opção AMOVA (Analysis of MOlecular VAriance) do programa Arlequin, versão 1.0 (Schneider *et al*, 1997).

A diversidade haplotípica (h) representa a probabilidade de que dois haplótipos sejam diferentes na amostra; este índice é considerado equivalente à heterozigose para uma população diplóide.

$$h = 2n (1 - \sum x_i^2) / (2n - 1) \quad (\text{eq. 8.4, Nei, 1987})$$

onde

x_i = frequência do haplótipo x na amostra

n = tamanho da amostra

A variabilidade nucleotídica (π) é a estimativa do número médio de diferenças nucleotídicas entre os haplótipos, baseado nos valores de distância genética (d) entre eles.

$$\pi = 2 \sum d_{ij} / [n(n-1)] \quad (\text{eq. 1; Nei and Miller, 1990})$$

onde

n = número de haplótipos

$$d_{ij} = \sum_{(k)} m_k r_k d_{ij}(k) / \sum_{(k)} m_k r_k \quad (\text{eq. 4; Nei and Miller, 1990})$$

k = número de classes de endonucleases de restrição

m = número de sítios de restrição produzidos por uma dada endonuclease

r = número de bases de reconhecimento de sítio da endonuclease

$$d_{ij} = (-\log_e S_{ij}) / r \quad (\text{eq. 3; Nei and Miller, 1990})$$

$$S_{ij} = 2m_{ij} / m_i + m_j \quad (\text{eq. 2; Nei and Miller, 1990})$$

m_{ij} = número de sítios de restrição compartilhados entre os haplótipos i e j

m_i = número de sítios de restrição do haplótipo i

m_j = número de sítios de restrição do haplótipo j

Para a estimativa da diversidade interpopulacional ou divergência nucleotídica (σ) deve-se subtrair o efeito do polimorfismo intrapopulacional:

$$\sigma = \pi_{xy} - (\pi_x + \pi_y) / 2 \quad (\text{eq. 10.21; Nei, 1987})$$

A análise da distribuição dos componentes da variabilidade da espécie pelo método AMOVA se baseia no número de diferenças nucleotídicas observadas entre os haplótipos mitocondriais (Excoffier *et al*, 1992). São produzidas estimativas dos componentes de variância e índices análogos ao Fst de Wright (1951), que refletem a correlação de diversidade haplotípica em diferentes níveis de subdivisão hierárquica (intra e interpopulacional, intra e inter grupos de populações).

O grau de diferenciação entre um grupo de populações pode ser estimado pelo índice Fst de Wright (1951) modificado para dados haplóides:

$$F_{st} = 1 / (1 - 2Nm) \quad (\text{Weir and Cockerham, 1984})$$

onde:

N = tamanho efetivo da população

m = taxa de migração

$$0 \leq F_{st} \leq 1$$

V. RESULTADOS

5.1. Padrões de Restrição

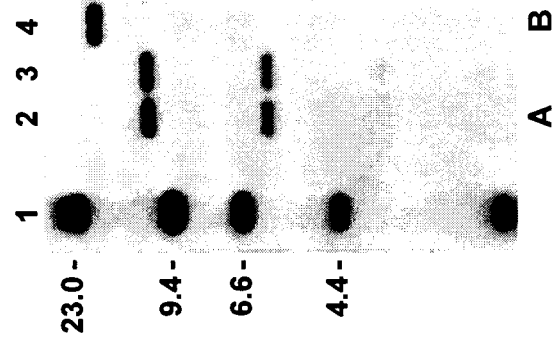
Das 13 endonucleases de restrição utilizadas para a análise de *D. hominis*, 5 não reconheceram sequências específicas no genoma mitocondrial das amostras (*KpnI*, *PstI*, *PvuII*, *XbaI*, *XhoI*); as 8 endonucleases restantes foram eficientes para revelar e caracterizar a variabilidade da espécie, ou seja, clivaram o DNAm e apresentaram variação nos padrões de bandas gerados: *BamHI* produziu 2 padrões; *ClaI*, 4 padrões; *EcoRI*, 4 padrões, *EcoRV*, 6 padrões, *HaeIII*, 13 padrões; *HindIII*, 3 padrões; *MspI*, 13 padrões e *SstI*, 6 padrões (figuras 2 a 9), obtendo-se, no total, 54 sítios de restrição, 39 deles polimórficos. O número e tamanho dos fragmentos de cada padrão estão sumarizados na tabela 1; os padrões foram designados por letras em ordem alfabética à medida que foram sendo encontrados. Com os resultados obtidos, estimou-se o tamanho do DNAm de *D. hominis* em 17 kb.

Combinando-se os padrões produzidos pelas endonucleases de restrição marcadoras, encontrou-se 48 haplótipos mitocondriais nos 227 indivíduos analisados (tabela 2). Os haplótipos foram divididos em três grupos ou clados mitocondriais distintos, com base no padrão de restrição apresentado para a enzima *EcoRI*: enquadram-se no clado I os haplótipos que possuem o padrão A, no clado II os haplótipos que apresentam padrão C, e no clado III os haplótipos que apresentam padrão B. O compartilhamento do padrão de *EcoRI* por um subconjunto de haplótipos dentro da amostra total, associado com padrões específicos para as outras enzimas, é um indício de ancestralidade comum exclusiva dessas linhagens.

1) BamHI

2) Clal

a.



b.



Figura 2. Autoradiograma de Southern blot indicando os padrões de fragmentos de restrição do DNAm_t de *Dermatobia hominis* para as endonucleases BamHI (1) e Clal (2a, 2b); as letras indicam os padrões obtidos. 1) coluna 1, λ HindIII e ϕ X174; colunas 2 e 3, padrão A; coluna 4, padrão B. 2a) coluna 1, λ HindIII e ϕ X174; colunas 2 a 7, padrão A; coluna 8, padrão B; coluna 9, padrão C. 2b) coluna 1, λ HindIII e ϕ X174; coluna 2, padrão D; colunas 3 e 4, padrão A. O tamanho dos fragmentos de restrição dos marcadores de tamanho molecular estão indicados à esquerda (kb).

1) EcoRI

2) EcoRV

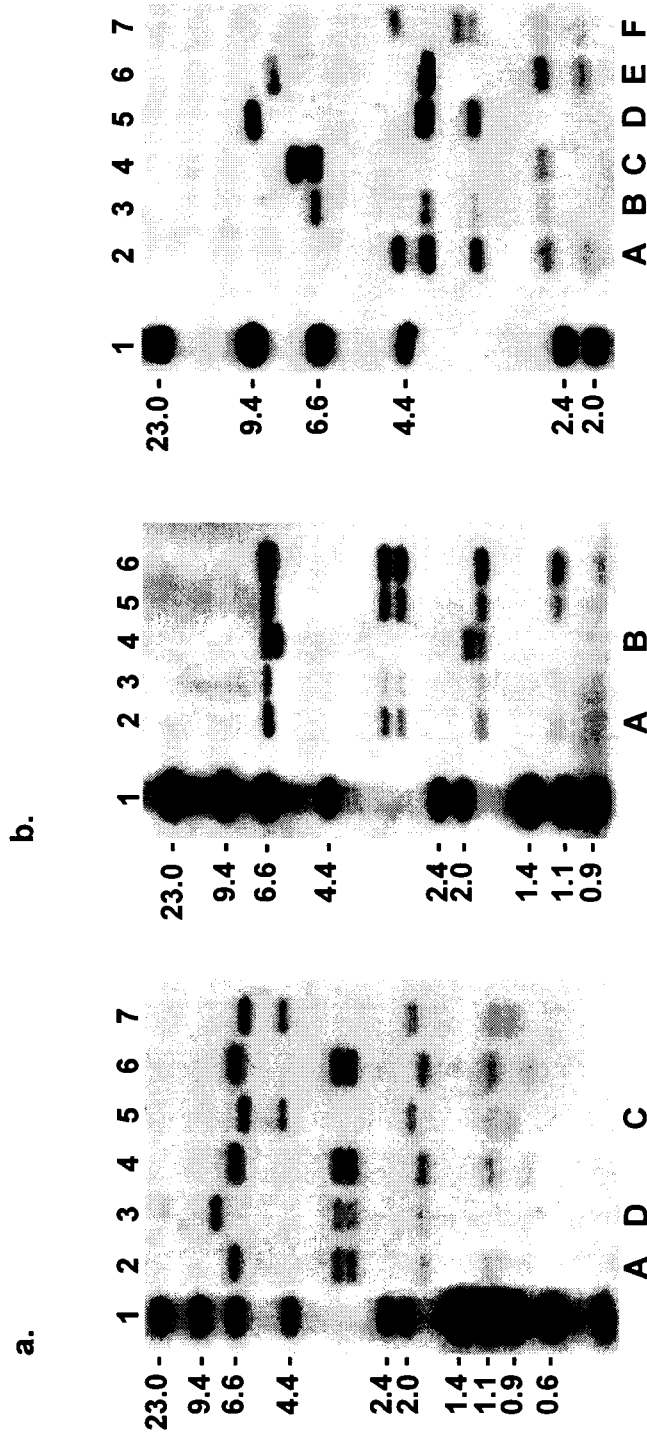


Figura 3. Autorradiograma de Southern blot indicando os padrões de fragmentos de restrição do DNAm de *Dermatobia hominis* para as endonucleases EcoRI (1a, 1b) e EcoRV (2); as letras indicam os padrões obtidos.

1a) coluna 1, λ HindIII e ϕ X174; colunas 2, 4 e 6, padrão A; coluna 3, padrão D; colunas 5 e 7, padrão C. 1b) coluna 1, λ HindIII e ϕ X174; colunas 2, 3, 5 e 6, padrão A; coluna 4, padrão B. 2) coluna 1, λ HindIII e ϕ X174; coluna 2, padrão A; coluna 3, padrão B; coluna 4, padrão C; coluna 5, padrão D; coluna 6, padrão E; coluna 7, padrão F. O tamanho dos fragmentos de restrição dos marcadores de tamanho molecular estão indicados à esquerda (kb).

1) *HaeIII*

2) *HindIII*

a.

b.

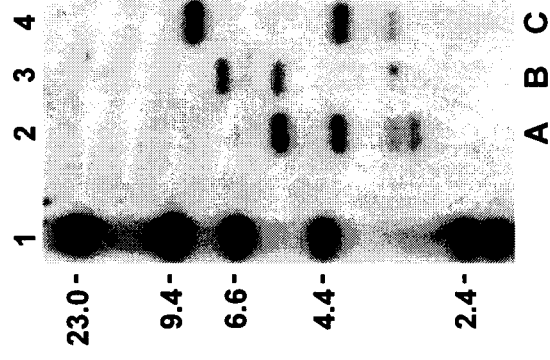
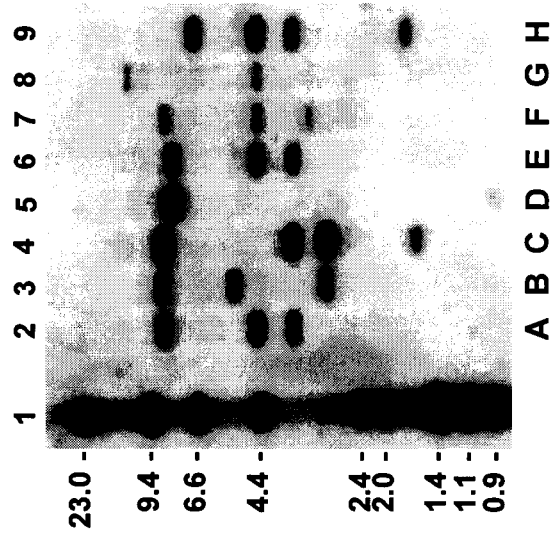


Figura 4. Autoradiograma de Southern blot indicando os padrões de fragmentos de restrição do DNAm_t de *Dermatobia hominis* para as endonucleases *HaeIII* (1a, 1b) e *HindIII* (2); as letras indicam os padrões obtidos. 1a) coluna 1, λ HindIII e ϕ X174; coluna 2, padrão A; coluna 3, padrão B; coluna 4, padrão C; coluna 5, padrão D; coluna 6, padrão E; coluna 7, padrão F; coluna 8, padrão G; coluna 9, padrão H. 1b) coluna 1, λ HindIII e ϕ X174; colunas 2 e 3, padrão A; coluna 4, padrão J. 2) coluna 1, λ HindIII e ϕ X174; coluna 2, padrão A; coluna 3, padrão B; coluna 4, padrão C. O tamanho dos fragmentos de restrição dos marcadores de tamanho molecular estão indicados à esquerda (kb).

HaeIII

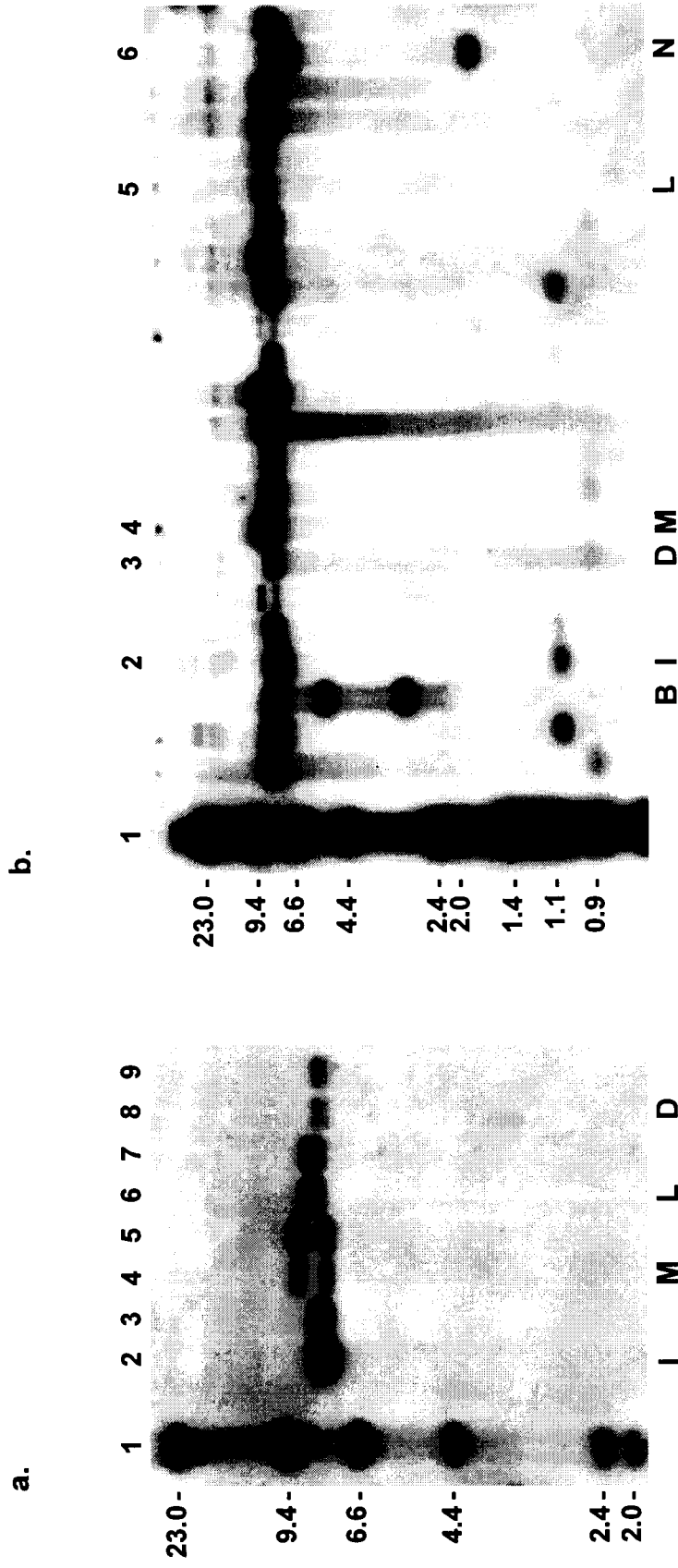


Figura 5. Autoradiograma de Southern blot indicando os padrões D, I, L, M e N produzidos pela endonuclease HaeIII no DNAm^t de *Dermatitis hominis*. A figura a mostra os fragmentos maiores em detalhe, enquanto que na figura b pode-se observar os fragmentos menores que 1,0 kb. a) coluna 1, λ HindIII e ϕ X174; colunas 2 e 3, padrão I; colunas 4 e 5, padrão M; colunas 6 e 7, padrão L; colunas 8 e 9, padrão D. b) coluna 1, λ HindIII e ϕ X174; coluna 2, padrão I; coluna 3, padrão D; coluna 4, padrão M; coluna 5, padrão L; coluna 6, padrão N. O tamanho dos fragmentos de restrição dos marcadores de tamanho molecular estão indicados à esquerda (kb).

MspI

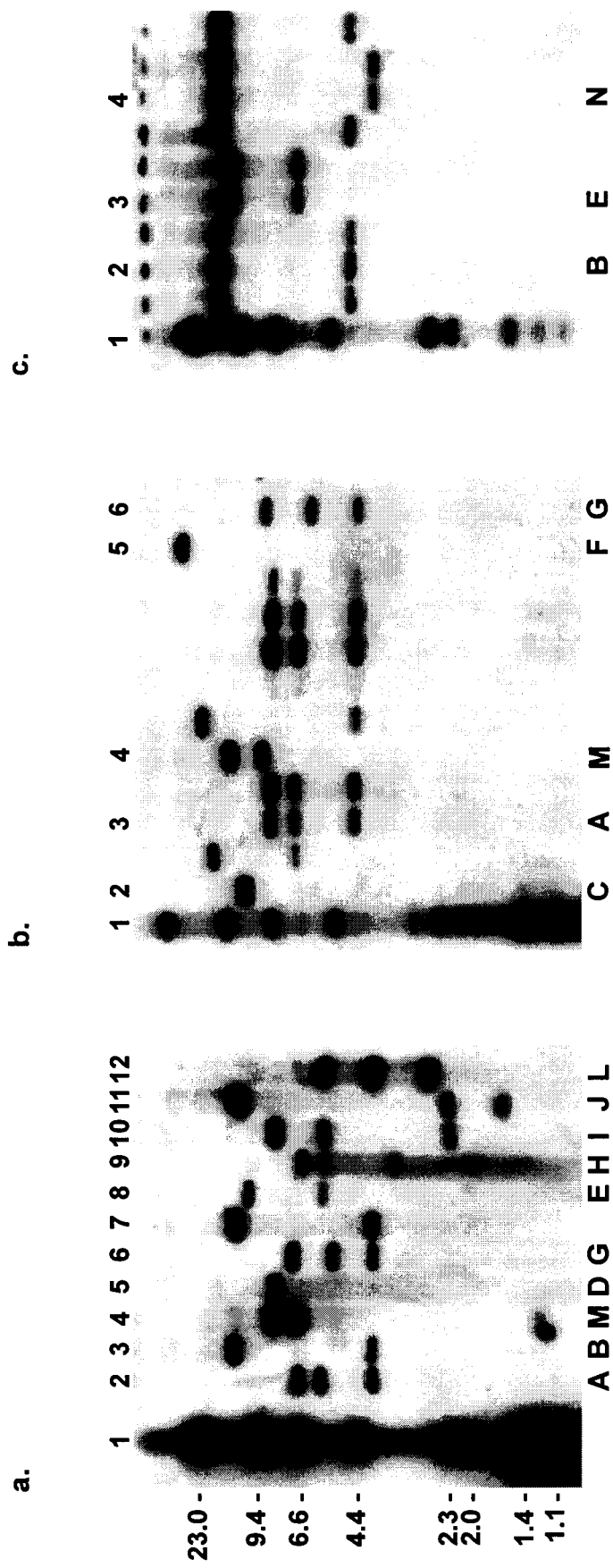


Figura 6. Autoradiograma de Southern blot indicando os padrões de fragmentos de restrição do DNAMt de *Dermatobia hominis* para a endonuclease *MspI*; as letras indicam os padrões obtidos. a) coluna 1, λ HindIII e ϕ X174; coluna 2, padrão A; colunas 3 e 7, padrão B; coluna 4, padrão M; coluna 5, padrão D; coluna 6, padrão G; coluna 8, padrão E; coluna 9, padrão H; coluna 10, padrão I; coluna 11, padrão J; coluna 12, padrão L. b) coluna 1, λ HindIII e ϕ X174; coluna 2, padrão C; coluna 3, padrão A; coluna 4, padrão M; coluna 5, padrão F; coluna 6, padrão G. c) coluna 1, λ HindIII e ϕ X174; coluna 2, padrão B; coluna 3, padrão E; coluna 4, padrão N. O tamanho dos fragmentos de restrição dos marcadores de tamanho molecular estão indicados à esquerda (kb).

*Sst*I

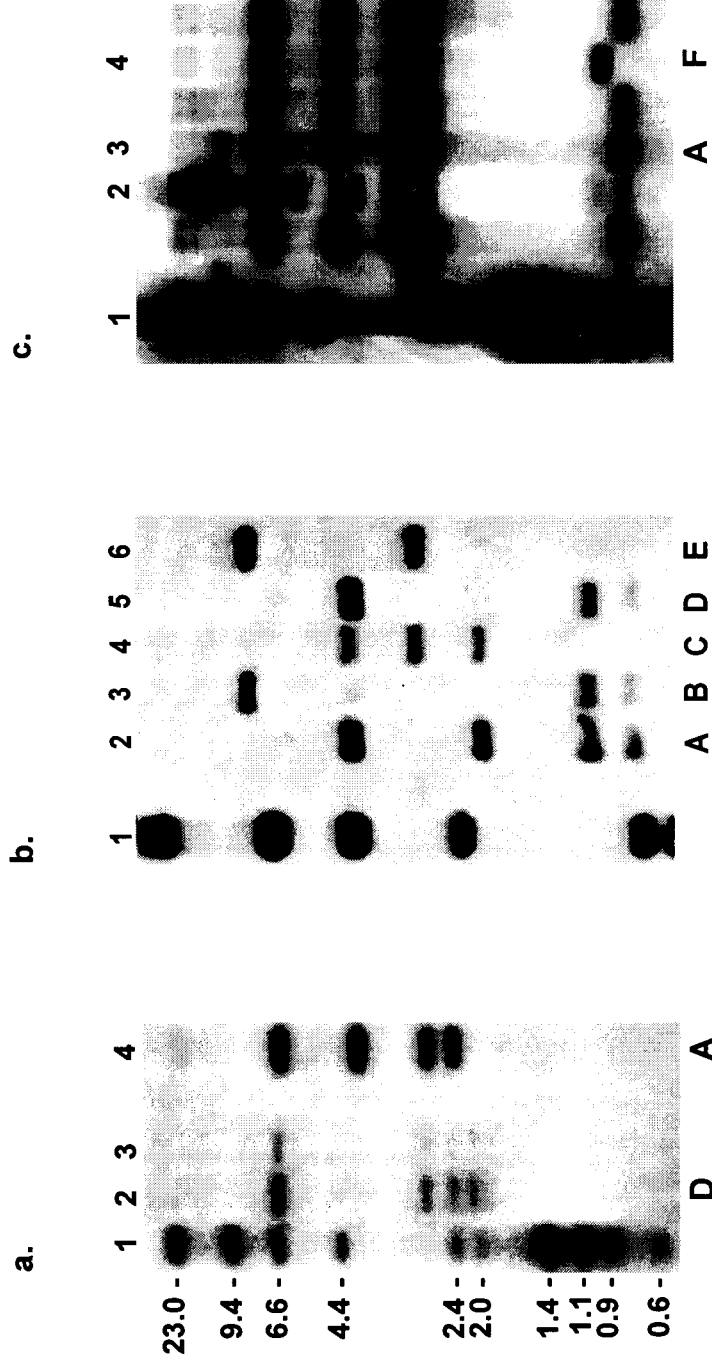


Figura 7. Autoradiograma de Southern blot indicando os padrões de fragmentos de restrição do DNAm de *Dermatobia hominis* para a endonuclease *Sst*I; as letras indicam os padrões obtidos. A figura 1c mostra os fragmentos menores que 1,0 kb. a) coluna 1, λ HindIII e ϕ X174; colunas 2 e 3, padrão D; coluna 4, padrão A. b) coluna 1, λ HindIII e ϕ X174; coluna 2, padrão A; coluna 3, padrão B; coluna 4, padrão C; coluna 5, padrão D; coluna 6, padrão E. c) coluna 1, λ HindIII e ϕ X174; coluna 2, digestão parcial do padrão A; coluna 3, padrão A; coluna 4, padrão F. O tamanho dos fragmentos de restrição dos marcadores de tamanho molecular estão indicados à esquerda (kb).

Tabela 1- Tamanho (kb) dos fragmentos obtidos para o DNAmf de *Dermatobia hominis* com o uso de 8 endonucleases de restrição.

Enzima e Padrão	Sítio de clivagem	Tamanho dos fragmentos
<i>Bam</i>HI	G/GATCC	
A		10,0; 5,7
B		16,4
<i>Cla</i>I	AT/CGAT	
A		5,3; 5,3; 4,7; 1,6
B		5,3; 4,7; 3,5; 1,9; 1,6
C		5,3; 4,0; 2,6; 2,2; 1,6; 1,4
D		5,3; 4,7; 4,0; 1,6
<i>Eco</i>RI	G/AATTC	
A		6,7; 3,5; 3,2; 1,9; 1,2; 0,9
B		6,7; 6,3; 2,0; 1,9
C		6,3; 4,7; 2,0; 1,6; 1,2; 1,1
D		8,2; 3,5; 3,2; 1,9; 0,9
<i>Eco</i>RV	GAT/ATC	
A		4,6; 4,1; 3,5; 2,6; 2,1
B		6,6; 4,1; 3,5; 2,6
C		7,5; 6,6; 2,6
D		9,2; 4,1; 3,5
E		8,1; 4,1; 2,6; 2,1
F		4,6; 3,7; 3,5; 2,6; 2,1

Tabela 1- Tamanho (kb) dos fragmentos obtidos para o DNAmf de *Dermatobia hominis* com o uso de 8 endonucleases de restrição (continuação).

Enzima e Padrão	Sítio de clivagem	Tamanho dos fragmentos
<i>HaeIII</i>	GG/CC	
A		8,7; 4,5; 3,8
B		8,7; 5,3; 3,2
C		8,7; 3,8; 3,2; 1,7
D		8,3; 7,9; 0,6
E		8,2; 4,5; 3,8
F		8,7; 4,5; 3,4
G		14,5; 4,5
H		6,8; 4,5; 3,8; 1,8
I		8,3; 7,9; 0,9
J		11,2; 3,8
L		8,7; 8,3
M		9,1; 7,9
N		7,9; 6,5; 1,7
<i>HindIII</i>	A/AGCT	
A		5,5; 4,2; 3,4; 3,1
B		7,3; 5,5; 3,4
C		8,5; 4,2; 3,4

Tabela 1- Tamanho (kb) dos fragmentos obtidos para o DNAm^t de *Dermatobia hominis* com o uso de 8 endonucleases de restrição (continuação).

Enzima e Padrão	Sítio de clivagem	Tamanho dos fragmentos
<i>MspI</i>	C/CGG	
A		6,8; 5,8; 4,1
B		15,3; 4,1
C		9,4; 6,8
D		8,6; 8,1
E		12,4; 5,8
F		20,0
G		7,3; 5,4; 4,1
H		6,8; 5,8; 3,7
I		8,6; 5,8; 2,6
J		15,3; 2,6; 1,7
L		5,8; 4,1; 4,1; 3,0
M		8,6; 6,8; 1,3
N		15,3; 3,6
<i>SstI</i>	GAGCT/C	
A		6,6; 4,1; 2,9; 2,4; 0,9; 0,1
B		11,9; 2,9; 2,4; 0,9; 0,1
C		6,6; 5,1; 4,1; 0,9; 0,1
D		6,6; 2,9; 2,4; 2,2; 2,0; 0,9; 0,1
E		11,9; 5,1; 0,9; 0,1
F		6,6; 4,1; 2,9; 2,4; 1,0

Tabela 2 – Haplótipos mitocondriais de *Dermatobia hominis*. A primeira letra do haplótipo corresponde ao padrão de *Bam*HI, a segunda ao de *Cl*al, a terceira ao de *Eco*RI, a quarta ao de *Eco*RV, a quinta ao de *Hae*III, a sexta ao de *Hind*III, a sétima ao de *Msp*I, a oitava ao de *Sst*I.

Clado I- azul; clado II- vermelho;

Haplótipos	
1	AAAAAAAA
2	AADAAAAA
3	AAAAAABA
4	AAAAAFA
5	AAAAAAGA
6	AAAALAEA
9	BBCBDADA
10	BBCBIAEA
11	AAAAFAHA
12	BBCBDAAA
13	AAAAAABB
14	AAAAEAAA
15	AAAAAADA
16	BBCDMACA

Tabela 2 – Haplótipos mitocondriais de *Dermatobia hominis*. A primeira letra do haplótipo corresponde ao padrão de *Bam*HI, a segunda ao de *Cl*al, a terceira ao de *Eco*RI, a quarta ao de *Eco*RV, a quinta ao de *Hae*III, a sexta ao de *Hind*III, a sétima ao de *Msp*I, a oitava ao de *Ssf*I (continuação).

Clado I- azul; clado II- vermelho;

Haplótipos	
17	AAAAAAAC
18	AAAAAAEA
20	AAABAAAA
22	BBCCNAFA
23	AAAEAABA
24	AAAAAACA
25	AAAAABBA
26	AAAAACAA
27	AAAAGABA
28	BACBDADA
29	BBCAMAEA
30	BBCBIAIA
31	BAAAAAAD
32	AAAFAAAA

Tabela 2 – Haplótipos mitocondriais de *Dermatobia hominis*. A primeira letra do haplótipo corresponde ao padrão de *Bam*HI, a segunda ao de *Cl*al, a terceira ao de *Eco*RI, a quarta ao de *Eco*RV, a quinta ao de *Hae*III, a sexta ao de *Hind*III, a sétima ao de *Msp*I, a oitava ao de *Sst*I (continuação).

Clado I- azul; clado II- vermelho;

Haplótipos	
33	AAAEAAAA
34	AAAFABA
36	BBCBIAGA
37	ACAAAAAA
38	AAAACALA
39	ADAAAAAA
40	AAAAAAJA
41	AAAAJAAA
42	BBCBIADA
44	BBCDIAGA
45	BBCBMACA
46	AAAAAABC
47	AAAAAANA
48	AAAAAAEF

A partir do tamanho dos fragmentos de restrição dos padrões (tabela 1) e sua distribuição e frequência entre os clados mitocondriais (tabela 3), elaborou-se um diagrama de interconversão entre eles, inferindo-se os prováveis eventos mutacionais que ocorreram no DNAm de dessa espécie durante sua história evolutiva recente (figuras 8 a 12). Utilizou-se critérios de parcimônia, considerando-se que eventos de perda de sítios de restrição são mais frequentes do que os eventos de ganho de sítio (Templeton, 1983), sem, no entanto, descartar essa ocorrência.

Cada sítio de restrição foi nomeado com uma letra e número; os sítios de *Bam*HI foram designados B1 e B2, os de *Cl*al, C1 a C7, os de *Eco*RI, E1 a E10, os de *Eco*RV, V1 a V6, os de *Hae*III, A1 a A9, os de *Hind*III, H1 a H4, os de *Msp*I, M1 a M9 e os de *Sst*I, S1 a S7. A posição dos sítios de restrição no genoma mitocondrial foi definida arbitrariamente.

Tabela 3 - Frequência (%) e distribuição dos padrões de restrição nos clados mitocondriais encontrados em populações brasileiras de *Dermatobia hominis*. Os padrões exclusivos estão indicados nas cores dos respectivos clados.

Enzima	Clado I	Clado II	
<i>Bam</i>HI			
A	98,4		100
B	1,6	100	
<i>Cla</i>I			
A	98,4	5,3	100
B		94,7	
C	1,1		
D	0,5		
<i>Eco</i>RI			
A	95,2		100
C		100	
D	4,8		
<i>Eco</i>RV			
A	93,6	5,3	100
B	1,1	68,4	
C		5,3	
D		21,0	
E	4,2		
F	1,1		

Tabela 3 - Frequência (%) e distribuição dos padrões de restrição nos clados mitocondriais encontrados em populações brasileiras de *Dermatobia hominis*. Os padrões exclusivos estão indicados nas cores dos respectivos clados (continuação).

Enzima	Clado I	Clado II	
<i>HaeIII</i>			
A	94,2		
B			52,6
C	0,5		
		31,6	
E	0,5		
F	1,5		
G	0,5		
I		36,8	
J	0,5		
L	2,1		47,4
M		26,3	
N		5,3	
<i>HindIII</i>			
A	98,4	100	89,5
B	0,5		10,5
C	1,1		

Tabela 3 - Frequência (%) e distribuição dos padrões de restrição nos clados mitocondriais encontrados em populações brasileiras de *Dermatobia hominis*. Os padrões exclusivos estão indicados nas cores dos respectivos clados (continuação).

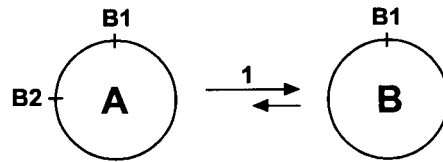
Enzima	Clado I	Clado II	
MspI			
A	45,5	5,3	
B	31,2		
C	0,5	21,0	
D	0,5	31,6	89,5
E	10,0		
F	7,4	5,3	
G	0,5	21,0	
H	1,6		
I		5,3	
J	1,1		
L	0,5		
			10,5
N	1,1		
SstI			
A	88,4	100	
B	7,9		94,7
C	1,6		
D	1,6		
			5,3
F	0,5		

O padrão B de *Bam*HI representa a molécula de DNAm linearizada, e difere do padrão A por apenas um sítio de restrição (figura 8a). O padrão A de *Eco*RV provavelmente gerou os padrões E pela perda de V3, B a partir da perda de V4 e F pelo ganho de V6. O padrão B pode ter gerado C pela perda de V2 e D pela perda de V4 (figura 8b).

Em *Cla*I o padrão B pode ter originado A pela perda de C5; o padrão A, por sua vez, provavelmente originou D pelo ganho de C6; o padrão C possivelmente foi gerado por D por ganho do sítio C7 (figura 9a).

Os padrões gerados por *Eco*RI, enzima diagnóstica dos clados, se relacionam por mais de um evento evolutivo, com exceção de A e D (figura 9b). O padrão C pode ter originado B pela perda de três sítios de restrição (E8, E9 e E10). O padrão B provavelmente originou A pelo ganho de E3 e E6 e pela perda de E7. O padrão A possivelmente originou D pela perda de um sítio de restrição (E1).

a) *Bam*HI



b) *Eco*RV

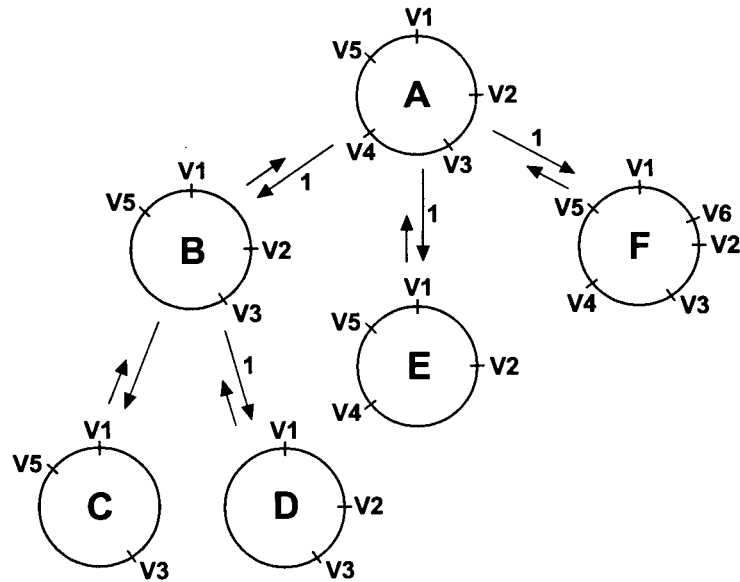
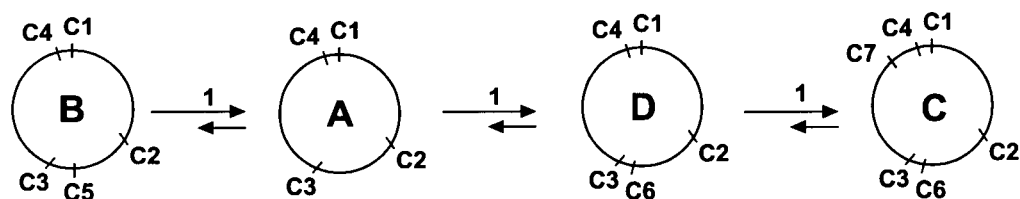


Figura 8. Diagrama de interconversão entre os padrões de restrição obtidos para o DNA mitocondrial de *Dermatobia hominis* com as enzimas *Bam*HI (a) e *Eco*RV (b). As setas indicam a provável direção de evolução. O número de perdas ou ganhos de sítios de restrição está indicado. B1, B2, V1 a V6 - sítios de restrição.

a) *Clal*



b) *EcoRI*

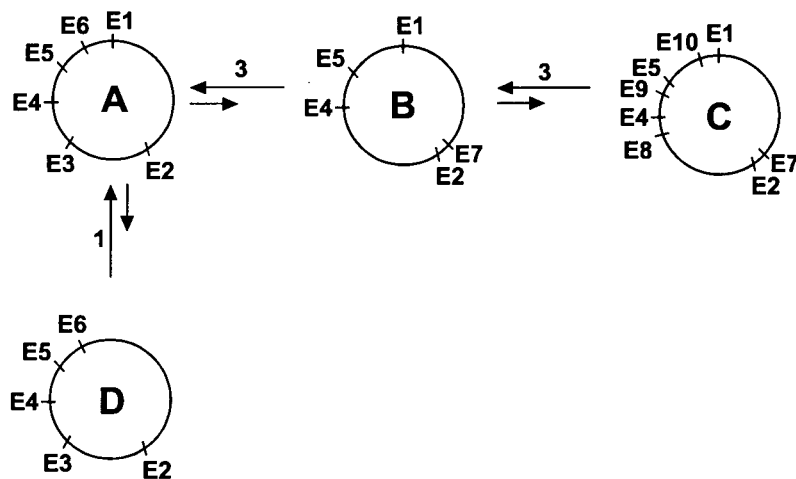


Figura 9. Diagrama de interconversão entre os padrões de restrição obtidos para o DNA mitocondrial de *Dermatobia hominis* com as enzimas *Clal* (a) e *EcoRI* (b). As setas indicam a provável direção de evolução. O número de perdas ou ganhos de sítios de restrição está indicado. C1 a C7; E1 a E10 - sítios de restrição.

O padrão A de *HaeIII* pode ter dado origem a 6 padrões (C, E, F, G, H, J), sendo que um deles (F) foi considerado polimorfismo de tamanho, a partir da análise de digestão parcial do padrão A (figura 10). Os padrões G e J foram originados pela perda dos sítios A1 e A2, respectivamente; os padrões E e H foram originados pelo ganho de um sítio de restrição cada (A4 e A9). O padrão C se originou pelo ganho de um sítio (A5), e pode ter originado o padrão B pela perda de A3. O padrão L pode ter se originado de B pela perda de A5. O padrão I provavelmente foi originado de L pelo ganho de A6, e pode ter dado origem aos padrões D e N pelo ganho de A7 e A8, respectivamente; o padrão M possivelmente foi originado por I pela perda de A2. Por problemas metodológicos, a amostra de DNA do indivíduo que apresentou padrão H de *HaeIII* não foi suficiente para a digestão com as 8 endonucleases, não sendo considerado na análise.

HaeIII

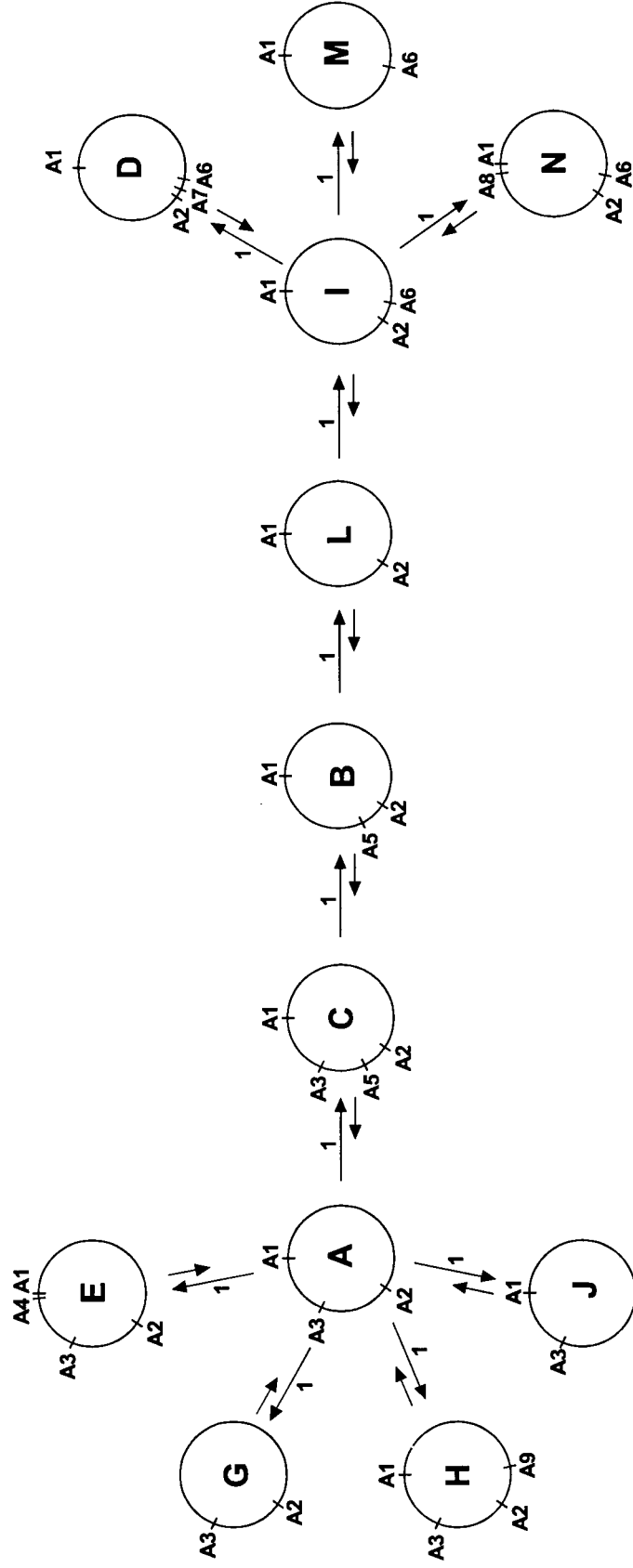
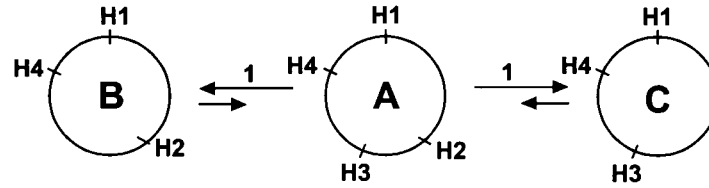


Figura 10. Diagrama de interconversão entre os padrões de restrição obtidos para o DNA mitocondrial de *Dermatobia hominis* com a enzima HaeIII. As setas indicam a provável direção de evolução. O número de perdas ou ganhos de sítios de restrição está indicado. A1 a A9 - sítios de restrição.

O padrão A de *HindIII* pode ter originado os padrões B e C pela perda de H3 e H2, respectivamente (figura 11a). O padrão A de *SstI* pode ter dado origem aos padrões B e C pela perda de S2 e S4, respectivamente; o padrão D provavelmente se originou de A pelo ganho de S5. O padrão F pode ter se originado de A, pela perda de S7. O padrão B possivelmente originou E pela perda de S4 (figura 11b).

Em *MspI* o padrão A provavelmente originou 4 padrões: B, pela perda de M2; E, pela perda de M1; L, pelo ganho de M4 e H, que foi considerado um polimorfismo de tamanho, a partir da análise de uma digestão parcial do padrão A. O padrão B, por sua vez, pode ter gerado três outros padrões, todos pelo ganho de um sítio de restrição (G-M7; J-M8; N-M9). O padrão G possivelmente originou C pela perda de M3. O padrão E pode ter originado I pelo ganho de M5, que por sua vez pode ter dado origem ao padrão D pela perda de M3; o padrão M pode ter se originado de D pelo ganho de M6. O padrão F é representado pela molécula linearizada, não se podendo afirmar qual padrão, dentro os cinco possíveis (B, C, D, E e N), teria dado origem a ele (figura 12).

a) *Hind*III



b) *Sst*I

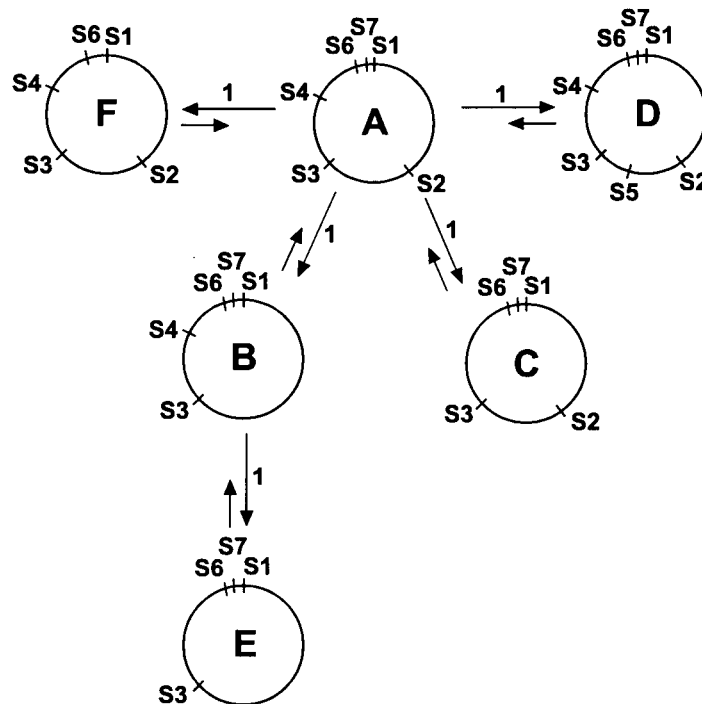


Figura 11. Diagrama de interconversão entre os padrões de restrição obtidos para o DNA mitocondrial de *Dermatobia hominis* com as enzimas *Hind*III (a) e *Sst*I (b). As setas indicam a provável direção de evolução. O número de perdas ou ganhos de sítios de restrição está indicado. H1 a H4, S1 a S7 - sítios de restrição.

MspI

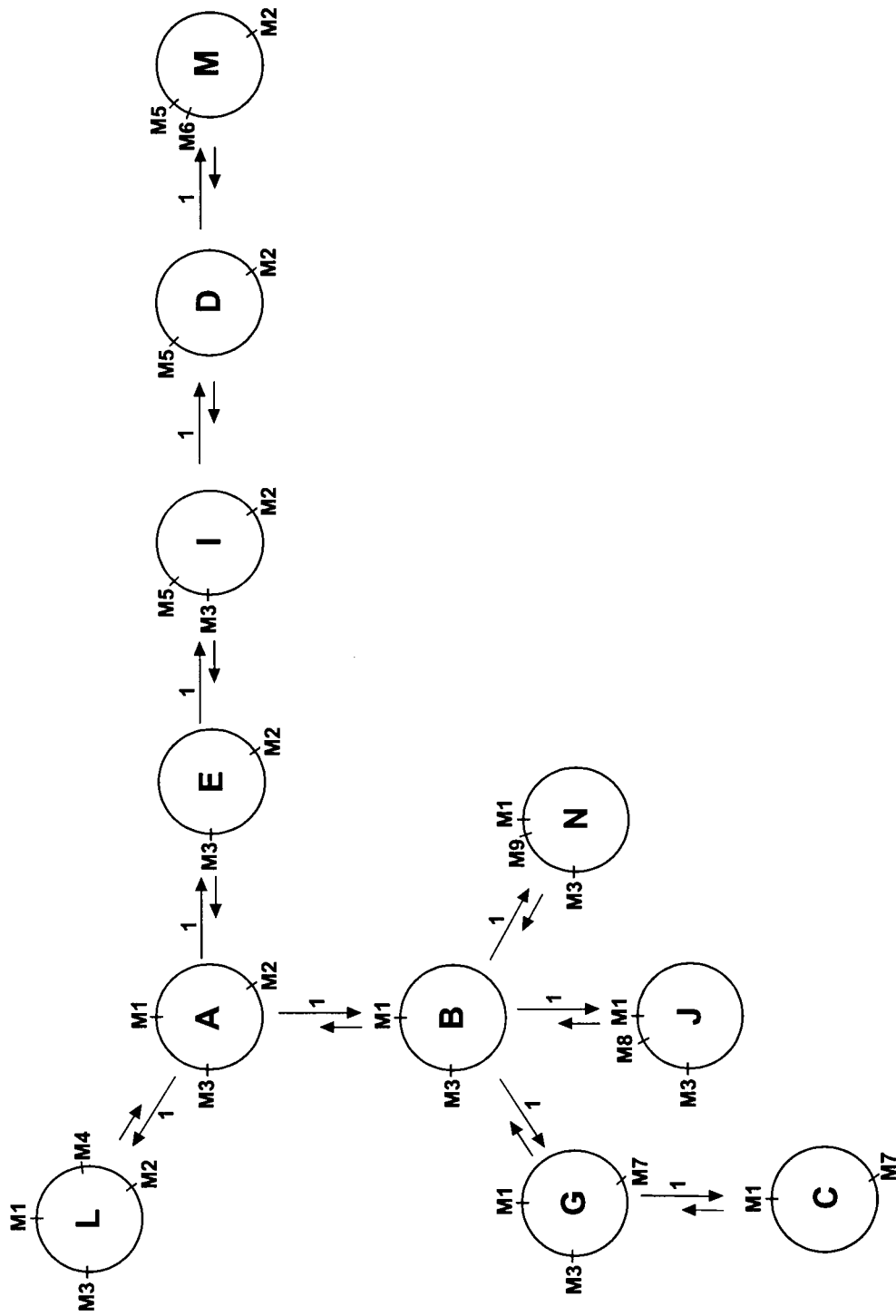


Figura 12. Diagrama de interconversão entre os padrões de restrição obtidos para o DNA mitocondrial de *Dermatobia hominis* com a enzima *MspI*. As setas indicam a provável direção de evolução. O número de perdas ou ganhos de sítios de restrição está indicado. M1 a M9 - sítios de restrição.

5.2. Caracterização dos Clados Mitocondriais e Relações Filogenéticas entre os Haplótipos

Como mencionado anteriormente, os 48 haplótipos mitocondriais foram divididos em três clados mitocondriais distintos, baseado na suposição de ancestralidade comum exclusiva entre eles.

O clado I está composto por 30 haplótipos, representados por 189 indivíduos (tabelas 2 e 5). Além do padrão A para *EcoRI*, os haplótipos desse grupo se caracterizam por possuir a maioria de padrões do tipo A para as outras endonucleases de restrição. Com exceção do padrão L, todos os padrões de *HaeIII* apresentados são exclusivos do grupo (tabela 3). O haplótipo 1 aparece como o mais frequente no grupo (33,3%), seguido do haplótipo 3 (19,6%). Os haplótipos 4, 13 e 18 ocorrem em significativa representatividade (7,4%, 7,9% e 7,4%, respectivamente) e 24,4% da amostra é constituída por haplótipos de baixa frequência.

O clado II constitui-se de 12 haplótipos e 19 indivíduos, representando 8,4% da amostra analisada. O grupo se caracteriza por apresentar os padrões B para *BamHI* e *ClaI*, associados com o padrão C de *EcoRI*. Neste grupo, os padrões de *HaeIII* são exclusivos. O haplótipo 9 é o mais frequente da amostra (21,0%); os haplótipos 16 e 36 representam 15,8% da amostra cada um. Os 9 haplótipos restantes (47,4%) tiveram ocorrência única.

O clado III está representado por 19 indivíduos e apenas 6 haplótipos, todos apresentando padrão B para *EcoRI*. Neste grupo ocorrem apenas dois padrões de *HaeIII*, sendo um deles exclusivo (B). Os haplótipos 7 e 8 representam 47,4% e 26,3% do clado, respectivamente. Os 4 haplótipos restantes foram detectados em baixa frequência.

Elaborou-se, manualmente, um diagrama de interconversão entre os haplótipos mitocondriais, baseando-se na presença/ausência de sítios de restrição (figura 13). O haplótipo 1 ocupa uma posição central na árvore, se relacionando com a maioria dos outros haplótipos do seu grupo por um ou dois passos evolutivos. Os haplótipos do clado II se relacionam por, no máximo, três eventos evolutivos. No clado III, o haplótipo 8 se relaciona com a maioria dos haplótipos do grupo, e em todos os casos, por apenas um passo evolutivo. A ligação entre os grupos I e III poderia ser feita pelos haplótipos 5 e 8, distanciados por 5 passos evolutivos; os grupos II e II poderiam se ligar pelos haplótipos 8 e 42, distantes por 8 passos evolutivos.

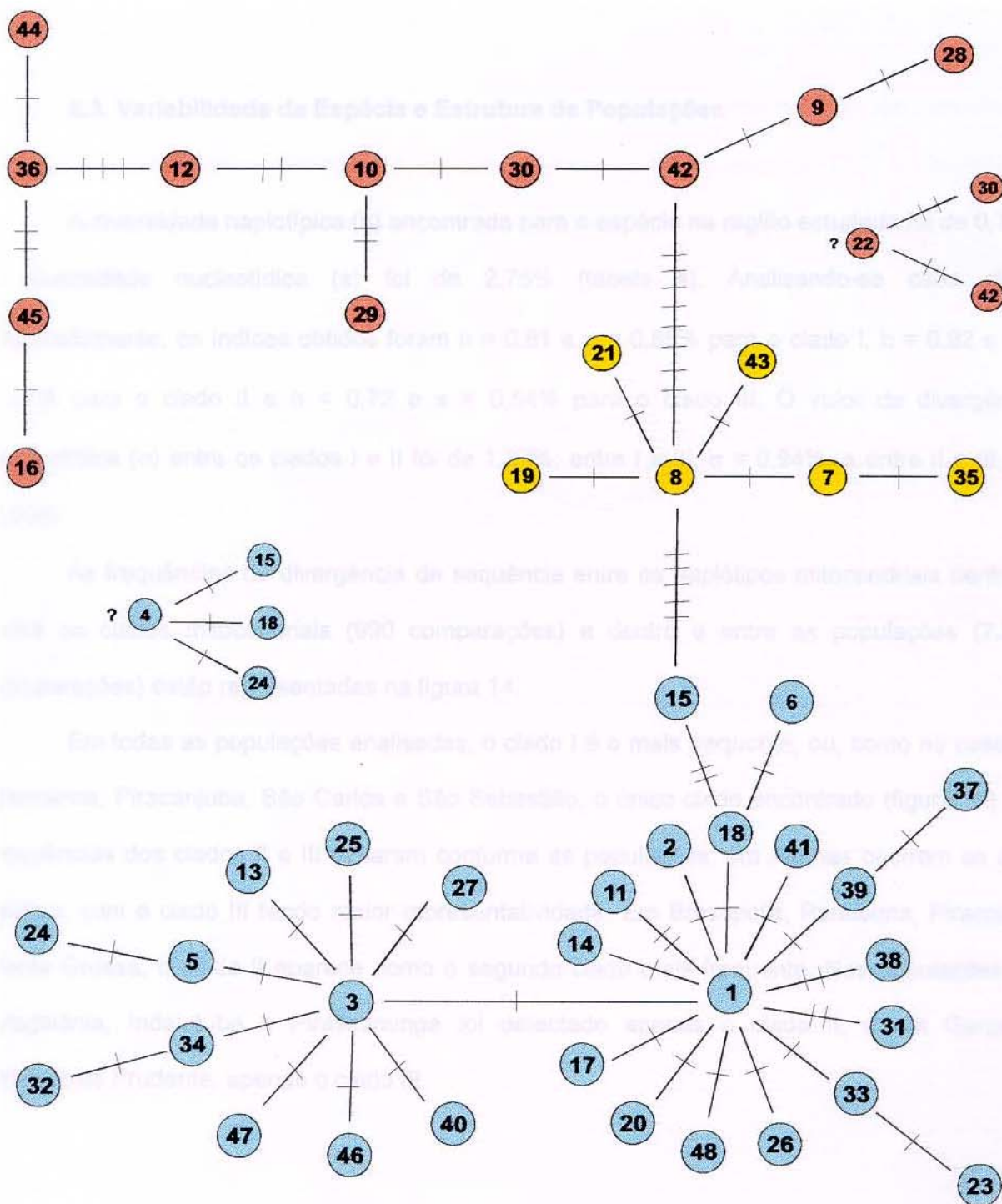


Figura 13. Diagrama de interconversão entre os haplótipos mitocondriais de *D. hominis*. As barras menores entre os haplótipos representam o número de diferenças de sítios de restrição entre eles. Os haplótipos do grupo I estão representados em azul, os do grupo II em vermelho e os do grupo III em amarelo. As possíveis origens dos haplótipos 4 e 22 estão indicadas em separado.

5.3. Variabilidade da Espécie e Estrutura de Populações

A diversidade haplotípica (h) encontrada para a espécie na região estudada foi de 0,76 e a diversidade nucleotídica (π) foi de 2,75% (tabela 4). Analisando-se cada clado separadamente, os índices obtidos foram $h = 0,81$ e $\pi = 0,85\%$ para o clado I, $h = 0,92$ e $\pi = 1,41\%$ para o clado II e $h = 0,72$ e $\pi = 0,54\%$ para o clado III. O valor de divergência nucleotídica (σ) entre os clados I e II foi de 1,37%; entre I e III, $\sigma = 0,94\%$, e entre II e III, $\sigma = 2,00\%$.

As frequências de divergência de sequência entre os haplótipos mitocondriais dentro e entre os clados mitocondriais (990 comparações) e dentro e entre as populações (7.381 comparações) estão representadas na figura 14.

Em todas as populações analisadas, o clado I é o mais frequente, ou, como no caso de Campinas, Piracanjuba, São Carlos e São Sebastião, o único clado encontrado (figura 15). As frequências dos clados II e III variaram conforme as populações; em Alfenas ocorrem os dois grupos, com o clado III tendo maior representatividade. Em Brasópolis, Paraibuna, Piracaia e Ponta Grossa, o clado II aparece como o segundo clado mais frequente. Nas populações de Aragoiânia, Indaiatuba e Pirassununga foi detectado apenas o clado II, e em Garça e Presidente Prudente, apenas o clado III.

Tabela 4 – Índices de variabilidade da espécie e dos clados mitocondriais de *Dermatobia hominis*. A variabilidade nucleotídica (π) está representada na diagonal (%); a divergência nucleotídica (σ) entre os clados está abaixo da diagonal (%); h= diversidade haplotípica.

	espécie	Clado I	Clado II	Clado III	h
espécie	2,75				0,76
Clado I		0,85			0,81
Clado II		1,37	1,41		0,92
Clado III		0,94	2,00	0,54	0,72

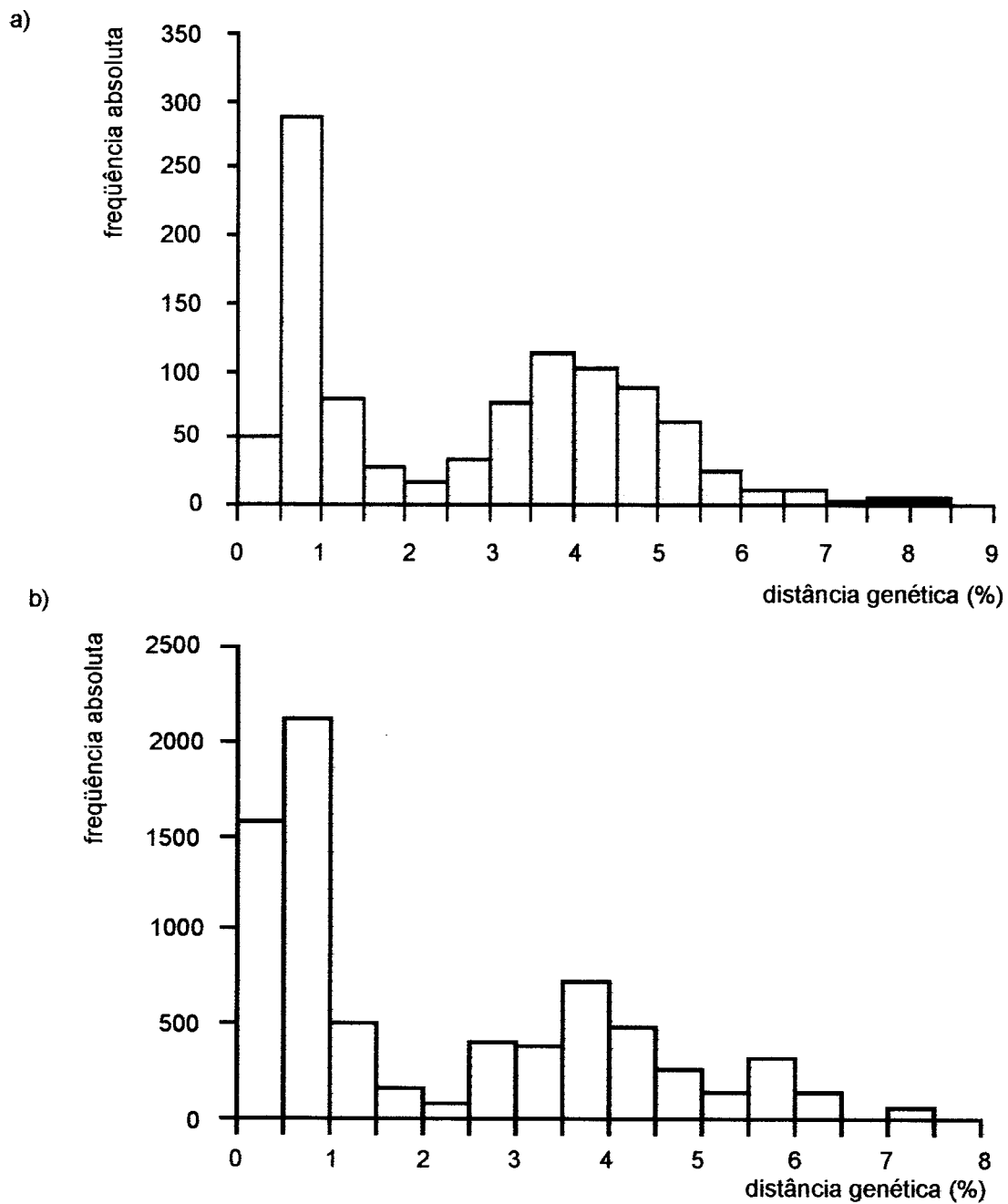


Figura 14. Histogramas de freqüência das divergências de seqüência entre os haplótipos mitocondriais (a) intra e interclados e (b) intra e interpopulacionais de *Dermatobia hominis*.

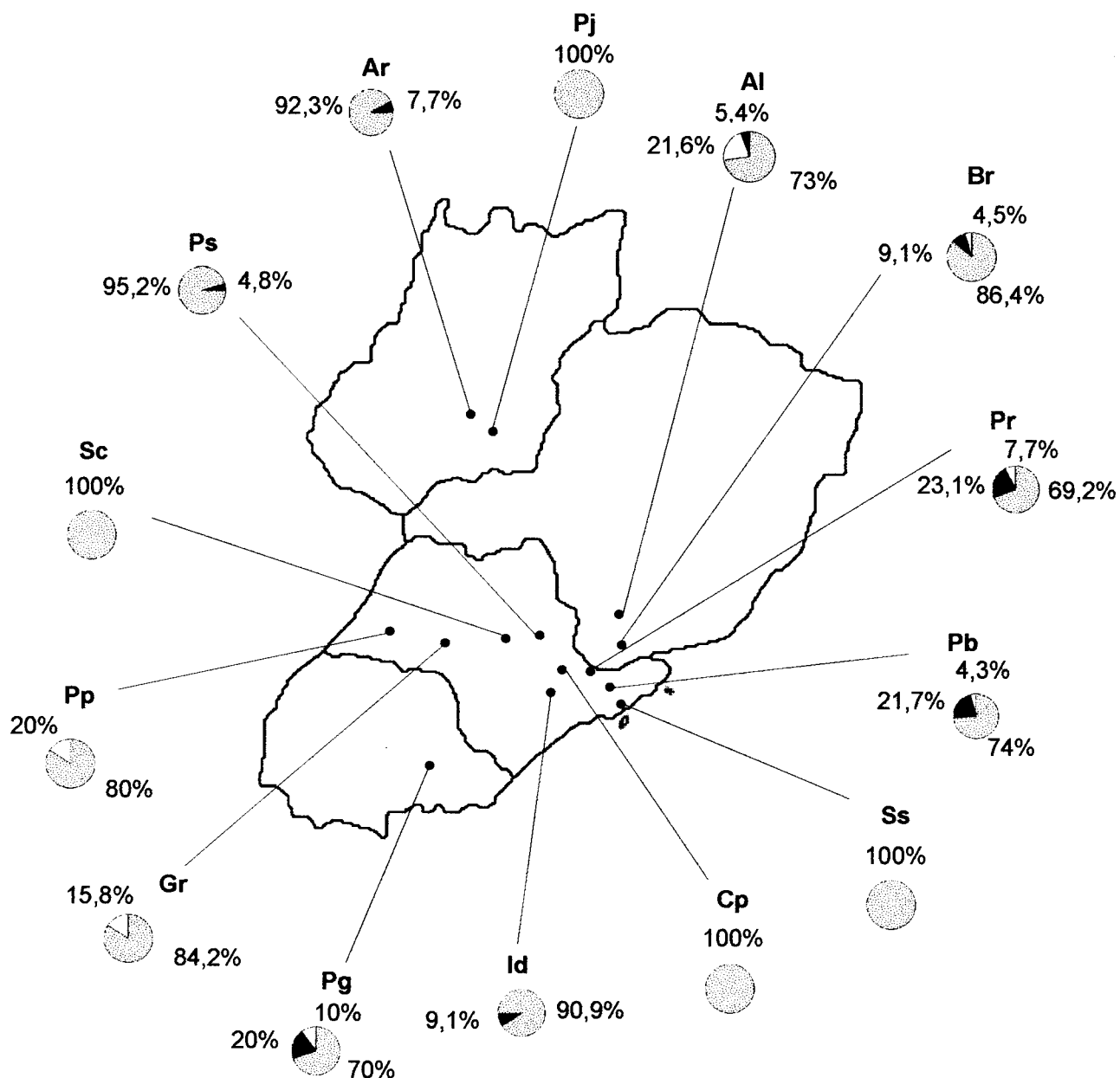


Figura 15. Frequência dos clados mitocondriais de *Dermatobia hominis* nas populações analisadas. O clado I está representado em azul, o clado II em vermelho e o clado III em amarelo. Al= Alfenas; Ar= Aragoiânia; Br= Brasópolis; Gr= Garça; Cp= Campinas; Id= Indaiatuba; Pb= Paraibuna; Pr= Piracaia; Pj= Piracanjuba; Ps= Pirassununga; Pp= Presidente Prudente; Pg= Ponta Grossa; Sc= São Carlos; Sb= São Sebastião.

A distribuição dos haplótipos nas populações está indicada na tabela 5. A diversidade haplotípica das populações variou de 0 (Piracanjuba) a 0,91 (Aragoiânia), com média de 0,76, e a diversidade nucleotídica variou de 0 (Piracanjuba) a 2,88% (Ponta Grossa e São Sebastião), com média de 1,57% (tabela 6). Os índices de divergência nucleotídica entre as populações apresentaram valores positivos e negativos, com média -0,01%. Os valores positivos variaram de 0,01%, entre Campinas/Alfenas e Campinas/Aragoiânia, a 0,55%, entre Campinas e Garça. O F_{st} encontrado para a espécie foi 0,07, com 92,91% da variabilidade da espécie concentrada dentro das populações (tabela 7).

Tabela 5 – Número absoluto dos haplótipos mitocondriais de *Dermatobia hominis* nas populações brasileiras analisadas. Al=Alfenas, Ar=Aragoiânia, Br=Brasópolis, Cp=Campinas, Gr=Garça, Id=Indaiatuba, Pb=Paraibuna, Pr=Piracaia, Pj=Piracanjuba, Ps=Pirassununga, Pg=Ponta Grossa, Pp=Presidente Prudente, Sc=São Carlos, Ss=São Sebastião.

clado I - azul; clado II - vermelho;

Haplótipos	Localidades													
	Al	Ar	Br	Cp	Gr	Id	Pb	Pr	Pj	Ps	Pg	Pp	Sc	Ss
1	11	4	8	1	9	2	5	6	5	7	2	1	1	1
2	4					1				1				
3	6	1	2		3	3		2		7	5	6	3	
4	1	1		1	1		1				4	5		
5	1													
6	1				2		1							
	3						1	1			1	3		
	1		1		3									
9	1						3							
10						1								
11						3								
12							1							
13		1		4		1	5						1	
14							1							
15								1						
16							1	2						
17			1											
18	1	1	4				3				1		4	
	1													
20	1			1										
	2													
22	1													
23														2
24							1							
25										1				

Tabela 5 – Frequência dos haplótipos mitocondriais de *Dermatobia hominis* nas populações brasileiras analisadas. Al=Alfenas, Ar=Aragoiânia, Br=Brasópolis, Cp=Campinas, Gr=Garça, Id=Indaiatuba, Pb=Paraibuna, Pr=Piracaia, Pj=Piracanjuba, Ps=Pirassununga, Pg=Ponta Grossa, Pp=Presidente Prudente, Sc=São Carlos, Ss=São Sebastião (continuação).

clado I - azul; clado II - vermelho;

Haplótipos	Localidades													
	Al	Ar	Br	Cp	Gr	Id	Pb	Pr	Pj	Ps	Pg	Pp	Sc	Ss
26		1								1				
27			1											
28										1				
29								1						
30			1											
31				1						2				
32														1
33		1												2
34														1
	1													
36											3			
37											2			
38	1													
39										1				
40					2									
41		1												
42		1												
											1			
44											1			
45			1											
46													2	
47													2	
48		1												
Total	37	13	22	8	19	11	23	13	5	21	20	15	13	7

Tabela 6 – Índices de variabilidade de populações brasileiras de *Dermatobia hominis*, baseados nos haplótipos mitocondriais. A variabilidade nucleotídica intrapopulacional (π) está representada na diagonal (%); a divergência nucleotídica (σ) entre as populações está abaixo da diagonal; h= diversidade haplotípica.

	Al	Ar	Br	Cp	Gr	Id	Pb	Pr	Pj	Ps	Pg	Pp	Sc	Ss	h
Al	1,43														0,86
Ar	-0,0003	1,00													0,91
Br	0,0005	0,0001	1,23												0,83
Cp	0,0051	0,0021	0,0028	0,79											0,71
Gr	-0,0005	-0,0013	0,0014	0,0055	0,94										0,72
Id	0,0007	-0,0003	-0,0005	0,0019	0,0012	1,23									0,86
Pb	0	0	0,0002	0,0030	0,0006	0,0003	2,42								0,89
Pr	-0,0011	-0,0041	0,0004	0,0023	0,0005	-0,0001	-0,0021	2,64							0,78
Pj	0,0002	-0,0009	0,0006	0,0049	0,0013	0,0004	0,0024	0,0022	0						0
Ps	0,0009	-0,0004	0,0006	0,0038	0,0010	-0,0003	-0,0004	-0,0012	0,0006	1,15					0,79
Pg	0,0010	0,0005	0,0008	0,0051	0,0042	0,0017	-0,0015	0,0005	0,0049	0,0015	2,88				0,87
Pp	-0,0004	-0,0043	0	0,0046	-0,0006	0,0003	0,0005	0,0006	0,0021	-0,0005	0,0028	1,75			0,60
Sc	-0,0029	0,0016	0	0,0033	0,0021	0,0012	0,0007	-0,0012	0,0028	0,0011	0,0012	0,0004	1,61		0,86
Ss	-0,0065	-0,0053	-0,0034	-0,0008	-0,0075	-0,0054	-0,0048	-0,0143	-0,0011	-0,0073	-0,0078	-0,0151	-0,0063	2,88	0,90

Al = Alfenas; Ar = Aragoiânia; Br = Brasópolis; Cp = Campinas; Gr = Garça; Id = Indaiatuba; Pb = Paraibuna; Pr = Piracaia;

Pj = Piracanjuba; Ps = Pirassununga; Pg = Ponta Grossa; Pp = Presidente Prudente; Sc = São Carlos; Ss = São Sebastião

Tabela 7. Análise da estrutura de populações brasileiras de *Dermatobia hominis* pelo método AMOVA. As localidades que pertencem ao mesmo ecossistema foram consideradas pertencentes a um único deme.

Fonte de Variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Componentes da Variância	% de Variação
Entre grupos	9	7,712	-0,01443 Va	-3,31
Entre populações dentro dos grupos	4	3,484	0,04529 Vb	10,40
Intrapopulacional	195	78,890	0,40456 Vc	92,91

Índices de fixação: **FST** : 0,07

FSC : 0,10

FCT : -0,03

Teste de significância (992 permutações):

Vc e FST: $P = 0,00 \pm 0,00$

Vb e FSC: $P = 0,05 \pm 0,01$

Va e FCT: $P = 0,45 \pm 0,02$

Grupos =

- 1) Alfenas
- 2) Brasópolis
- 3) Indaiatuba e Campinas
- 4) Piracaia
- 5) Garça
- 6) Presidente Prudente
- 7) Paraibuna e São Sebastião
- 8) Piracanjuba e Aragoiânia
- 9) Ponta Grossa
- 10) São Carlos e Pirassununga

VI. DISCUSSÃO

O tamanho do DNAm de *Dermatobia hominis* foi estimado em 17 kb, valor próximo ao obtido para alguns califorídeos causadores de miíases, como *Cochliomyia hominivorax*, 16,3 kb (Roehrdanz and Johnson, 1988; Roehrdanz, 1989; Infante and Azeredo-Espin, 1995), *Cochliomyia macellaria*, 16,5 kb (Valle and Azeredo-Espin, 1995), *Phaenicia eximia*, 16,4 kb (Azeredo-Espin and Madeira, 1995) e *Phormia regina*, 17,5 kb (Goldenthal *et al*, 1991).

A molécula do DNAm da espécie apresenta uma variação de comprimento quando se compara a soma dos fragmentos dos 51 padrões gerados pelas 8 endonucleases de restrição. Essa discrepância de valores deve ser resultado da existência de fragmentos de restrição muito pequenos e/ou muito grandes na maioria dos padrões. A estimativa de tamanho de fragmentos maiores do que 7 kb não é precisa com a concentração utilizada no gel de agarose (1%), e os fragmentos menores do que aproximadamente 0,5 kb são de difícil visualização no autoradiograma, devido à sua baixa eficiência de ligação com a membrana durante a transferência por Southern-blot (Sambrook *et al*, 1989).

O genoma mitocondrial de *D. hominis* se mostrou altamente polimórfico. A diversidade haplotípica foi estimada em 0,86, e a variabilidade nucleotídica foi de 2,75%. Os clados mitocondriais, nos quais os haplótipos foram agrupados, se mostraram igualmente polimórficos (tabela 4). As diversidades nucleotídicas dos clados I e II foram equivalentes à encontrada para *C. hominivorax* na América do Norte ($\pi = 1,1\%$; Roehrdanz and Johnson, 1988) e para populações brasileiras do estado de São Paulo ($\pi = 0,92\%$; Infante e Azeredo-Espin, 1995). A diversidade do clado III foi equivalente à estimada para *C. macellaria* no Brasil ($\pi = 0,5\%$; Valle, 1997).

Os clados mitocondriais puderam ser definidos primariamente pelo padrão de *EcoRI* apresentado pelos haplótipos. Os padrões são exclusivos para cada grupo, e são os únicos, dentre os obtidos, que se relacionam por três eventos de perda ou ganho de sítio de restrição, diminuindo a probabilidade de que ocorram padrões homoplásticos desta enzima entre os clados.

As homoplasias são definidas como estados de caracteres similares que se originam por mudanças evolutivas independentes em diferentes organismos; tais semelhanças podem surgir por convergência, paralelismo ou reversão do caráter (Amorim, 1997). A alta taxa de mutação do DNAm, associada com a independência dos eventos mutacionais para os nucleotídeos, fazem com que aumente a probabilidade de que ocorram homoplasias entre linhagens mitocondriais distintas, proporcionalmente ao tempo de separação entre elas (Avice *et al*, 1987).

Possíveis homoplasias entre os clados mitocondriais foram inferidas por evidências indiretas. O padrão B de *BamHI* apresenta apenas um fragmento de restrição e pode se originar, a partir do padrão A, tanto pela perda de B1 como pela perda de B2 (figura 8a). Considerando-se o diagrama de interconversão (figura 13), é razoável supor que o padrão B presente no haplótipo 31 do clado I tenha se originado por um evento mutacional distinto daquele que originou o padrão B característico dos haplótipos pertencentes ao clado II.

Da mesma forma, o padrão L de *HaeIII* foi considerado uma homoplasia entre os clados I e III. Os padrões dessa enzima são exclusivos para os clados, com exceção do padrão L, presente em haplótipos dos clados I e III (tabela 3). Enquanto que quase a metade dos haplótipos do clado III apresenta esse padrão, apenas um haplótipo do clado I (6) o possui. Esse padrão pode ser gerado pela perda de apenas um sítio de restrição tanto pelo padrão B (A5), que representa aproximadamente 52,6% do clado III, como pelo padrão A (A3), que representa 94,2% do clado I (figura 10; tabela 3). O padrão F de *MspI* também foi considerado uma homoplasia entre os clados I e II, apesar de não ter sido possível definir sua origem dentro de cada clado mitocondrial.

Na tentativa de minimizar os erros de inferências filogenéticas, os padrões que foram considerados homoplásticos foram utilizados na interconversão entre os haplótipos dentro dos grupos, mas não como caracteres para estabelecer as relações entre os clados no diagrama de interconversão da figura 13. No mesmo diagrama, pode-se observar que apesar do grande número de padrões encontrados dentro de cada clado, os haplótipos se relacionam por no máximo três eventos evolutivos.

No clado I, pôde-se inferir que o haplótipo 1 é o provável ancestral do grupo, por ocupar uma posição central na árvore, conectando-se diretamente com a maioria dos outros haplótipos. Para os clados II e III, devido provavelmente à baixa amostragem, tal inferência não foi possível. Apenas os dois haplótipos que apresentaram o padrão F de *MspI* (4 e 22) não puderam ser posicionados no diagrama de interconversão entre os haplótipos, pois não foi possível definir a origem de tal padrão.

A presença de clados mitocondriais, com índices de divergência variáveis entre eles, foi descrita para várias espécies animais (Avise *et al*, 1987). Observa-se que clados que possuem aproximadamente 1% de divergência normalmente apresentam distribuição alopátrica, sugerindo que seu aparecimento se deu na ausência de fluxo gênico entre populações isoladas geograficamente (categoria filogeográfica I de Avise *et al*, 1987). Esse é o caso do cervo americano *Odocoileus virginianus*, que, apesar do grande potencial de vagilidade e ausência de impedimentos geográficos contemporâneos para a dispersão, mantém o padrão histórico de distribuição alopátrica dos três clados mitocondriais observados, divergentes entre si por 2,2% (Ellsworth *et al*, 1994).

A distribuição simpátrica de clados mitocondriais com tal magnitude de divergência pode ser explicada como contato secundário entre populações evoluídas alopatricamente (categoria filogeográfica II de Avise *et al*, 1987). Tal contato pode ser natural, como por exemplo, pela eliminação de barreiras anteriormente existentes à migração, ou pode ser artificial, mediada pelo homem. A migração e fluxo gênico recente entre populações com linhagens maternas

distintas, resultando em simpatria de clados mitocondriais foram observados no ganso *Chen careulescens* nos Estados Unidos, com 1,1% de divergência entre os clados (Avise *et al*, 1992), e no chacal *Canis mesomelas elongae* na África, com 8% de divergência entre os dois clados mitocondriais encontrados (Wayne *et al*, 1990).

Um exemplo de intervenção humana levando à simpatria é dado pelo estudo de Baba-Aïssa *et al* (1988). Na espécie cosmopolita *Drosophila simulans*, os indivíduos amostrados na África, Europa, Américas, Austrália e Japão apresentaram o tipo mitocondrial *sII*. O tipo *sI* foi encontrado em apenas algumas ilhas do Pacífico, e o tipo *sIII* nas ilhas de Madagascar e Reunión, em simpatria com *sII*, que foi explicada como efeito de introdução de *sII* nesses locais através de transporte humano (David and Tsacas, 1981; Parsons, 1983; Lachaise *et al*, 1988, em Baba-Aïssa *et al*, 1988).

A divisão entre as categorias filogeográficas propostas por Avise *et al* (1987) não é rígida. Existem zonas de transição entre elas, devido tanto ao grau de divergência entre os clados como a forma de distribuição apresentada por eles. Assim, podem existir espécies que se enquadrem nessas zonas de transição, e esse parece ser o caso de *D. hominis*.

Considerando-se o grau de divergência entre os clados mitocondriais encontrados, sua evolução ocorreu, provavelmente, em populações alopátricas. As frequências desiguais dos clados nas populações (figura 15) poderiam ser então explicadas por um contato secundário recente entre essas populações. Dessa forma, a espécie estaria passando por um período de transição entre a categoria filogeográfica I e a categoria filogeográfica II.

Se a divergência entre os clados ocorreu em linhagens maternas alopátricas, isto implica na existência de, no mínimo, 3 populações inicialmente isoladas de *D. hominis*. Assumindo-se que a taxa de substituição nucleotídica do DNAmt dessa espécie é constante através do tempo e equivalente a 2% por milhão de anos, taxa estimada para invertebrados por Powell (1986), e levando-se em conta os índices de divergência estimados, a divergência entre o clados I e II teria se dado há 685.000 anos aproximadamente, e entre os clados I e III, há 470.000 anos.

Embora a taxa de mutação de *D. hominis* possa não corresponder à utilizada no cálculo, o tempo de divergência estimado é um indicativo de que os clados mitocondriais da espécie datam do Pleistoceno.

Os ciclos de glaciação ocorridos durante esse período levaram a importantes mudanças na distribuição da vegetação na América do Sul (Salgado-Labouriou, 1994), e podem ter ocasionado a fragmentação do habitat dos animais originalmente hospedeiros de *D. hominis*. Desse modo, a espécie também poderia ter tido seu padrão de distribuição alterado, originando a alopatria das populações. Com o fim dos eventos de glaciação, estas populações podem ter entrado novamente em contato, levando à ocorrência simpátrica atual observada entre os clados mitocondriais. A predominância do clado I nas populações poderia ser um indicativo de que esse clado se diferenciou na região analisada, com as outras linhagens de *D. hominis*, pertencentes aos clados II e III, sendo migrantes.

A distribuição de frequência das distâncias genéticas entre os haplótipos mitocondriais de *D. hominis* dentro e entre as populações e clados mitocondriais se apresenta bimodal (figura 14), semelhante às encontradas em espécies pertencentes às categorias filogeográficas I e II. No caso de espécies pertencentes à categoria I, a primeira curva corresponde às distâncias entre os haplótipos encontrados em uma mesma região geográfica, e a segunda curva corresponde às distâncias entre os haplótipos de diferentes regiões. Em espécies que se enquadram na categoria II, as duas curvas estão associadas às distâncias intra e entre regiões geográficas (Avice *et al*, 1984a, 1990, 1992, Wayne *et al*, 1990), como a encontrada para *D. hominis*. A diferença de tamanho observada entre as curvas da figura 14 pode ser explicada pela frequência desigual dos três clados nas amostras; assim, o maior número de distâncias genéticas computadas é aquele proveniente de comparações entre os haplótipos do clado I, o que eleva a frequência das distâncias entre 0,5 a 1%.

Não se pode excluir a possibilidade de que as diferentes linhagens mitocondriais de *D. hominis* tenham se originado em populações simpátricas, na ausência de impedimentos

geográficos históricos ao fluxo gênico. A retenção de linhagens mitocondriais com 1% ou mais de divergência dentro de uma mesma população é teoricamente possível, desde que o tamanho efetivo da população tenha permanecido grande através de sua história evolutiva (Avise *et al*, 1987). Não existem dados na literatura sobre o tamanho populacional da espécie para tal inferência.

A partir dos índices de variabilidade nucleotídica e haplotípica apresentados pelos clados, pode-se assumir que os clados mitocondriais I e II possuíam densidades populacionais aproximadamente equivalentes. A probabilidade de introdução de cada um deles no novo hospedeiro seria aproximadamente a mesma, se não houvesse seleção de haplótipos mitocondriais. Nesse caso, a proporção de representantes dos diferentes clados dentro das populações deveria ser semelhante, independente da quantidade de fluxo gênico existente entre elas, o que não foi observado nesse estudo.

Uma alternativa para explicar a frequência desigual dos clados mitocondriais nas populações, assumindo-se simpatria e probabilidade semelhantes de introdução, seria a possível utilização de vetores específicos para cada clado. Como a dispersão de *D. hominis* é determinada pelo comportamento do vetor, sua introdução no novo hospedeiro seria dependente da preferência dessas espécies pelo rebanho bovino. Não há registro na literatura de que haja alguma utilização diferencial de vetores por *D. hominis*, dentre as mais de 40 espécies por ela utilizadas (revisão em Guimarães *et al*, 1983). Esta questão poderia ser respondida com estudos de animais silvestres parasitados, já que a evolução da espécie ocorreu nessas populações.

Para a análise das populações não mais em termos de frequência de clados mitocondriais, mas sim em composição e distribuição de haplótipos, considerou-se que as populações que fazem parte do mesmo ecossistema formam um deme (tabela 7). A maior parte da variabilidade da espécie, 92,91%, está concentrada dentro das populações. Essa variabilidade se apresenta homogeneamente distribuída entre os diferentes demes, com a

variabilidade entre os grupos se apresentando negativa, indicando que não há estruturação genética da espécie na região estudada ($F_{st} = 0,07$). A homogeneidade genética é evidenciada pelos baixos valores positivos e os negativos de divergência estimados para as populações (tabela 6).

Várias espécies de invertebrados e vertebrados apresentam ausência de estruturação genética em relação ao DNAm, sempre, porém, associada a um baixo polimorfismo genético, com valores de divergência de sequência entre os haplótipos em geral muito menores que 1% (Avise *et al*, 1987; Rogers and Harpending, 1992). Um fluxo gênico histórico acentuado e/ou uma expansão recente da população, após gargalo populacional, são considerados como as causas prováveis do baixo polimorfismo observado no DNAm dessas espécies (referências em Roehrdanz *et al*, 1994). Assim, as baixas diversidades haplotípica e nucleotídica ($h = 0,13$ e $\pi = 0,016\%$) encontradas em populações da borboleta *Danaus plexippus* nos Estados Unidos, México e Trinidad-Tobago são, segundo Brower and Boyce (1991), indicativos da ocorrência de uma explosão populacional.

No entanto, apesar de *D. hominis* não apresentar estruturação genética, o alto índice de variabilidade nucleotídica encontrado não corrobora as hipóteses de que o fluxo gênico tenha sido intenso no passado ou que tenha ocorrido uma expansão populacional recente. A ausência de estruturação genética provavelmente é resultado de migração recente entre as populações, possivelmente iniciada após o fim dos eventos de glaciação do Pleistoceno. A presença de haplótipos raros compartilhados por algumas populações sugere que a migração está sendo reforçada nos últimos séculos pelo movimento do rebanho bovino na região (tabela 5). Acredita-se que a movimentação dos rebanhos domésticos introduzidos no continente há aproximadamente 500 anos tenha alterado também os padrões de fluxo gênico e isolamento entre populações de calliforídeos causadores de miíases, como *C. hominivorax* (Roehrdanz and Johnson, 1988; Infante and Azeredo-Espin, 1995; Taylor *et al*, 1996), *Lucilia cuprina* e *L. sericata* (Stevens and Wall, 1996). O curto período de vida e a ausência de alimentação do

adulto de *D. hominis* torna a migração passiva, ou por meio do animal infestado com a larva ou por meio dos insetos vetores, como a hipótese mais provável de dispersão da espécie.

D. hominis é uma espécie de interesse tanto econômico, por ser uma praga da pecuária brasileira, como biológico, devido à sua estratégia de dispersão através de insetos vetores, única entre as moscas causadoras de miíases conhecidas. Esse estudo, pioneiro na análise do polimorfismo genético de *D. hominis*, demonstrou que a espécie é altamente variável. Os índices de divergência obtidos sugerem que se trata de uma espécie antiga, cuja provável distribuição alopátrica pode ter levado à diferenciação dos clados mitocondriais. A ausência de estruturação da espécie em relação ao DNAm_t provavelmente é resultado de contato secundário entre populações anteriormente isoladas, iniciado possivelmente após o fim do Pleistoceno, e reforçado pelo movimento recente do rebanho bovino na região.

VII. CONCLUSÕES

1. Das 12 endonucleases de restrição utilizadas para a análise do DNAm de *Dermatobia hominis* de 14 populações do sudeste brasileiro, oito foram eficientes para detectar a variabilidade da espécie: *Bam*HI, *Cla*I, *Eco*RI, *Eco*RV, *Hae*III, *Hind*III, *Msp*I e *Sst*I.

2. Foram caracterizados 48 haplótipos mitocondriais, que puderam ser agrupados em 3 clados distintos, baseado primariamente no padrão de restrição apresentado para *Eco*RI. Pode-se dizer, então, que a introdução da espécie a um novo hospedeiro se deu em pelo menos 3 linhagens maternas distintas.

3. A espécie se apresentou altamente polimórfica, com uma variabilidade nucleotídica estimada em 2,75%. Os clados mitocondriais também apresentaram uma grande variabilidade, com o clado I apresentando $\pi = 0,85\%$, o clado II, $\pi = 1,41\%$ e o clado III, $\pi = 0,54\%$.

4. Os índices de divergência sugerem que a separação entre as linhagens mitocondriais e provavelmente o isolamento entre populações de *D. hominis* se deu no Pleistoceno, devido às alterações climáticas ocorridas no período, e que a atual distribuição seja decorrente de contatos secundários posteriores entre populações evoluídas alopaticamente.

5. A distribuição simpátrica dos 3 clados mitocondriais claramente divergentes entre si, ainda que em proporções desiguais nas populações, sugere que *Dermatobia hominis* esteja passando por um período de transição entre as categorias filogeográficas I e II propostas por *Avise et al*, 1987.

6. A espécie não apresenta estruturação das populações em relação ao DNAm (Fst = 0,07), com as populações das diferentes localidades podendo ser consideradas homogêneas geneticamente.

7. A presença de haplótipos raros compartilhados entre as localidades sugere que a introdução e movimentação dos rebanhos domésticos no continente há aproximadamente 500 anos esteja reforçando o contato entre as populações, iniciado provavelmente com o fim dos eventos de glaciação.

VIII. RESUMO

Dermatobia hominis (Linnaeus Jr., 1781) (Diptera, Cuterebridae), popularmente conhecida no Brasil como mosca do berne, é a principal causadora de miíase primária no rebanho bovino brasileiro. É considerada uma importante praga da pecuária por provocar grandes prejuízos econômicos, além de infestar o homem e animais silvestres.

Esta espécie é endêmica dos países das Américas Central e do Sul, exceto Chile (Roncalli and Usher, 1988), sendo encontrada também em algumas ilhas do Caribe (Mateus, 1977). Ocorre em florestas, principalmente nas margens de matas primárias e secundárias, florestas galeria e plantações de *Eucaliptus* (Andrade, 1929, em Guimarães *et al*, 1983), com maior incidência nos estados de São Paulo, Mato Grosso, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Espírito Santo e Bahia (Roncalli and Usher, 1988).

A estimativa da quantidade de variação genética presente em uma população é fundamental para a realização de estudos evolutivos das espécies. A herança materna, a evolução rápida e o alto polimorfismo encontrado em populações geográficas fazem do DNA mitocondrial (DNAm_t) um marcador genético ideal para estudos de estrutura de populações e quantificação do nível de variação intra e interpopulacional das espécies.

No presente trabalho analisou-se, através de RFLP, o DNAm_t de populações de *D. hominis* provenientes de 14 localidades dos estados de Goiás, Minas Gerais, Paraná e São Paulo. Dentre as 13 endonucleases de restrição utilizadas, oito (*Bam*HI, *Cl*al, *Eco*RI, *Eco*RV, *Hae*III, *Hind*III, *Msp*I e *Sst*I) foram eficientes para detectar e caracterizar a variabilidade genética da espécie.

Baseado nos padrões obtidos com as endonucleases, foram definidos 48 haplótipos mitocondriais, agrupados em 3 clados distintos. A variabilidade nucleotídica da espécie foi estimada em 2,75%; nos clados, a estimativa variou de 0,54% para o clado III a 1,41%, para o

clado II. A existência de diferentes clados mitocondriais nas populações analisadas é resultado, provavelmente, da introdução de pelo menos três linhagens maternas distintas no rebanho bovino.

O grau de divergência estimado entre os clados sugere que a evolução das linhagens ocorreu alopatriicamente, e que a simpatria atual é resultado de contato secundário entre as populações. Pelo fato dos clados mitocondriais apresentarem uma proporção desigual nas populações, propõe-se que *D. hominis* está passando por uma fase de transição entre as categorias filogeográficas I e II propostas por Avise *et al*, (1987).

A ausência de estruturação da espécie em relação ao DNAm_t e a presença de haplótipos raros compartilhados entre as localidades sugerem que o contato secundário entre as populações deve ter se iniciado com o término dos eventos de glaciação, e ter sido reforçado nos últimos séculos pela introdução e movimentação dos rebanhos domésticos no continente.

IX. ABSTRACT

Dermatobia hominis (Linnaeus Jr., 1781) (Diptera, Cuterebridae), the human botfly, is the most important fly that causes primary miasias in Brazilian livestock. Due to its great economic impact, and to its capacity of infections of both human and animals, this fly has been considered as an important plague.

This specie is endemic in all Central and South America countries, except Chile (Roncalli and Usher, 1988), and can also be found in some Caribbean Islands (Mateus, 1977). In Brazil, the fly can be found in forests and *Eucaliptus* sp. crops (Andrade, 1929, in Guimarães *et al.*, 1983). The major spread occurs at the States of São Paulo, Mato Grosso, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Espírito Santo and Bahia (Roncalli and Usher, 1988).

The estimates of genetic variation in a given population are of fundamental importance on the study of species evolution. An important tool for the evaluation of this variability is the analysis of mitochondrial DNA (mtDNA). Factors such as maternal inheritance, rapid evolution and high polymorphism observed on geographic populations make the mtDNA an ideal genetic marker for studies of population structure and assessment of variation levels on species and populations.

In this work, mtDNA from populations of *D. hominis* were analyzed through RFLP. Samples were collected at 14 different sites at Minas Gerais, Goiás, Paraná and São Paulo. For the analysis, 13 restriction endonucleases were tested, and six out of these (*Bam*HI, *Cl*al, *Eco*RI, *Eco*RV, *Hae*III, *Hind*III, *Msp*I and *Sst*I) were effective in the detection and characterization of the species genetic variability.

Based on the different patterns resulting from endonuclease restriction, 48 mitochondrial haplotypes were defined, and grouped into three distinct clades. The species nucleotide variability was estimated in 2.75%. Mitochondrial clades were also variable, the estimate ranged

from 0.54% for clade III to 1.41% for clade II. The occurrence of different mitochondrial clades in the populations analyzed may be the result of the introduction of at least three distinct maternal lines in cattle.

The estimated divergence degree among clades suggests that the differentiation of the lineages took place allopatrically, and the contemporary sympatry is the result of secondary contact between populations. Also, due to the fact that the mitochondrial clades display an unbalanced proportion in the studied populations, it can be proposed that *D. hominis* is undergoing a transitional phase between the previously proposed phylogeographic categories I and II (Avice *et al*, 1987).

The idea of a recent gene flow between the populations can be strengthened by the occurrence of a great number of haplotypes that are common to them. In addition, the lack of correlation between migration rate and geographic distance between the sites could indicate that the infected hosts accomplish the dispersion of *D. hominis*.

X. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Afonso, J. M., Volz, A., Hernandez, M., Ruttkay, H., Gonzalez, M., Larruga, J. M., Cabrera, V. M., Sperlich, D., 1990. Mitochondrial DNA Variation and Genetic Structure in Old-World Populations of *Drosophila subobscura*. **Molecular Biology and Evolution** 7 (2): 123-142.
- Amorin, D. S., 1997. **Elementos Básicos de Sistemática Filogenética**, 2º ed. Holos, Ed. e Sociedade Brasileira de Entomologia.
- Arocha, J., Moreno, A., Díaz, J., Valladares, B., Batista, N., González, A., 1996. Myiasis caused by *Dermatobia hominis*. **Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.** 14 (7): 453.
- Artigas, P. T., Serra, R. G., 1965. Portadores de ovos de *Dermatobia hominis* (L. Jr., 1781). Atualização da lista de foréticos, com a enumeração de novos agentes transmissores de "berne". **Ciência e Cultura** 17 (1): 21-29.
- Attardi, G., 1985. Animal mtDNA: an Extreme Example of Genetic Economy. **International Review of Cytology** 93: 93-145.
- Awise, J. C., Lansman, R. A., 1983. Polymorphism of mitochondrial DNA in populations of higher animals. In: **Evolution of genes and proteins**. M. Nei and R. Koehn (eds). Sinauer, Sunderland, MA; pp 147-164.
- Awise, J. C., Arnold, J., Ball, R. M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J. E., Reeb, C. A., Saunders, N. C., 1987. Intraspecific Phylogeography: The Mitochondrial DNA Bridge Between Population Genetics and Systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics** 18: 489-522.
- Awise, J. C., 1989. Gene Trees and Organismal Histories: A Phylogenetic Approach to Population Biology. **Evolution** 43 (6): 1192-1208.

- Awise, J. C., Ankey, C. D., Nelson, W. S., 1990. Mitochondrial Gene Trees and the Evolutionary Relationship of Mallard and Black Ducks. **Evolution** **44** (4): 1109-1119.
- Awise, J. C., 1991. Ten Unorthodox Perspectives on Evolution Prompted by Comparative Population Genetic Findings on Mitochondrial DNA. **Annual Review of Genetics**. **25**: 45-69.
- Awise, J. C., Alisauskas, R. T., Nelson, W. S., Ankney, C. D., 1992. Matriarchal Population Genetic Structure in an Avian Species with Female Natal Philopatry. **Evolution** **46** (4): 1084-1096.
- Azeredo Espin, A. M. L., 1993. Mitochondrial DNA Variability in Geographical Populations of the Brazilian Screwworm Fly. **International Atomic Energy Agency**: 161-165.
- Baba-Aïssa, F., Solignac, M., Dennebouy, N., David, J. R., 1988. Mitochondrial DNA variability in *Drosophila simulans*: quasi absence of polymorphism within each of the three cytoplasmic races. **Heredity** **61**: 419-426.
- Bellato, V., Paloschi, C. G., Souza, A. P., Ramos, C. I., Sartor, A. A., 1986. Variação sazonal das larvas da mosca do berne em bovinos do planalto catarinense. **Com. Téc. EMPASC** (101): 1-7.
- Bowry, R., Cottingham, R. L., 1997. Use of ultrasound to aid management of late presentation of *Dermatobia hominis* larva infestation. **Journal of Accidental and Emergency Medicine** **14** (3): 177-178.
- Boyce, T. M., Zwick, M. E., Aquadro, C. F., 1989. Mitochondrial DNA in the bark weevils: Size, structure and heteroplasmy. **Genetics** **123** (4): 825-836.
- Brower, A. V. Z., Boyce, T. M., 1991. Mitochondrial DNA Variation in Monarch Butterflies. **Evolution** **45** (5): 1281-1286.

- Brown, W. M., George, M., Wilson, A., 1979. Rapid Evolution of Animal Mitochondrial DNA. **Proceedings of National Academy of Science USA** **76** (4): 1967-1971.
- Brown, W. M., Prager, E. M., Wang, A., Wilson, A. C., 1982. Mitochondrial DNA. sequences of primates: tempo and mode of evolution. **Journal of Molecular Evolution** **18**: 225-239.
- Brown, W. M., 1983. Evolution of Animal Mitochondrial DNA. *In*: **Evolution of genes and proteins**. M. Nei and R. Koehn (eds). Sinauer, Sunderland, MA. pp 62-88.
- Cann, R. L., Wilson, A. C., 1983. Length mutations in human mitochondrial DNA. **Genetics** **104**: 699-711.
- Cariou, M. L., Solignac, M., Monnerot, T., David, J. R., 1990. Low allozyme and mitochondrial DNA variability in the island endemic species *Drosophila sechellia* (*Drosophila melanogaster* complex). **Experientia (Basel)** **46** (1): 101-104.
- Chang, H. Y., Ting, C. T., Lin, F. J., 1994. On the low genetic variability in *Drosophila immigrans* and *D. formosana*. **Zoological Studies** **33** (4): 287-295.
- Cogley, T. P., Cogley, M. C., 1989. Morphology of the Eggs of the Human Bot Fly, *Dermatobia hominis* (L. Jr.) (Diptera: Cuterebridae) and their Adherence to the Transport Carrier. **International Journal of Insect Morphologie & Embryologie** **18** (5/6): 239-248.
- Conn, J., Cockburn, A. F., Mitchell, S. E., 1993. Population differentiation of the malaria vector *Anopheles aquasalis* using mitochondrial DNA. **The Journal of Heredity**: 248-253.
- Costa, H. M. A., Freitas, M. G., 1961. Efeito do composto fosforado " Dowco- 109 " (NARLENE) administrado pela via oral, sobre a frequência de berne em bovinos. **Arq. Esc. Sup. Vet.** **13**: 145-156.

- Cruz, J. B., Benitez-Usher, C., Cramer, L. G., Gross, S. J., Kohn, A. B., 1993. Efficacy of Abamectin Injection against *Dermatobia hominis* in Cattle. **Parasitology Research** **79**: 183-185.
- DeSalle, R., Templeton, A., Mori, I., Pletscher, S., Johnston, J. S., 1987. Temporal and spatial heterogeneity of mitochondrial DNA polymorphism in natural populations of *Drosophila mercatorum*. **Genetics** **116** (2): 215-224.
- DeSalle, R., Templeton, A., 1992. The mtDNA genealogy of closely related *Drosophila silvestris*. **Journal of Heredity** **83**: 211-216.
- Ellsworth, D. L., Honeycutt, R. L., Silvy, N. J., Bickham, J. W., Klimstra, W. D., 1994. Historical Biogeography and Contemporary Patterns of Mitochondrial DNA Variation in White-Tailed Deer From the Southeastern United States. **Evolution** **48** (1): 122-136.
- Excoffier, L., Smouse, P. E., Quattro, J. M., 1992. Analysis of Molecular Variance Inferred from Metric Distances Among DNA Haplotypes: Application to Human Mitochondrial DNA Restriction Data. **Genetics** **131**: 479-491.
- Goldenthal, M. J., McKenna, K. A., Joslyn, D. J., 1991. Mitochondrial DNA of the Blowfly *Phormia regina*: Restriction Analysis and Gene Location. **Biochemical Genetics** **29** (1/2): 1-11.
- Guimarães, J. H., Papavero, N., Prado, A. P., 1983. As míases na Região Neotropical (identificação, biologia, bibliografia). **Revista Brasileira de Zoologia** **1** (4): 239-416.
- Hale, L. R., Beckenbach, A. T., 1985. Mitochondrial DNA variation in *Drosophila pseudoobscura* and related species in Pacific Northwest populations. **Canadian Journal of Genetics and Cytology** **27** (3): 357-364.

- Hale, L. R., Singh, R. S., 1986. Extensive variation and heteroplasmy in size of mitochondrial DNA among geographic populations of *Drosophila melanogaster*. **Proceedings of National Academy of Science USA** **83 (22)**: 8813-8817.
- Hale, L. R., Singh, R. S., 1987. Mitochondrial DNA variation and genetic structure in populations of *Drosophila melanogaster*. **Molecular Biology and Evolution** **4 (6)**: 622-637.
- Hale, L. R., Singh, R. S., 1991. A comprehensive study of genic variation of natural populations of *Drosophila melanogaster*. IV Mitochondrial DNA variation and the role of history v/s selection in the genetic structure of geographic populations. **Genetics** **129**: 103-117.
- Hall, M., Wall, R., 1995. Myiasis of Human and Domestic Animals. **Advances in Parasitology** **35**: 257-334.
- Halliburton, R., Barker, J. S. F., 1993. Lack of mitochondrial DNA variation in Australian *Drosophila buzzatti*. **Molecular Biology and Evolution** **10 (2)**: 484-487.
- Horn, S. C., Arteché, C. C. P., 1984. Carrapato, berne e bicheira no Brasil. **Boletim de Defesa Sanitária Animal do Ministério da Agricultura**.
- Horn, S. C., Arteché, C. C. P., 1985. Situação Parasitária da Pecuária no Brasil. **A Hora Veterinária** **23**: 12-32.
- Infante-Vargas, M. E., Azeredo-Espin, A. M. L., 1995. Genetic Variability in Mitochondrial DNA of the Screwworm, *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae), from Brazil. **Biochemical Genetics** **33 (7/8)**: 237-255.
- Infante, M. E., 1994. Análise do DNA mitocondrial em populações de *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae) do Estado de São Paulo. **Tese de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas**, Campinas, S. P.

- Johnston, M., Dickinson, G., 1996. An unexpected surprise in a common boil. **Journal of Emergency Medicine** **14 (6)**: 779-781.
- Kambhampati, S., Rai, K., 1991. Variation in mitochondrial DNA of *Aedes* species (Diptera: Culicidae). **Evolution** **45 (1)**: 120-129.
- Kambhampati, S., Rai, K. S., Verleye, D. M., 1992. Frequencies of mitochondrial DNA haplotypes in laboratory cage populations of the mosquito, *Aedes albopictus*. **Genetics** **132**: 205-209.
- Kondo, R., Satta, Y., Matsuma, E. T., Ishiwa, H., Takahata, N., Chigusa, S. I., 1990. Incomplete Maternal Transmission of mtDNA in *Drosophila*. **Genetics** **126**: 657-663.
- Lambert, D. M., Millar, C. D., 1995. DNA Science and Conservation. **Pacific Conservation Biology** **2**: 21-38.
- Latorre, A., Moya, A., Ayala, F. J., 1986. Evolution of mitochondrial DNA in *Drosophila subobscura*. **Proceedings of National Academy of Science USA** **83**: 8649-8653.
- Latorre, A., Hernández, C., Martínez, D., Castro, J. A., Ramón, M., Moya, A., 1992. Population structure and mitochondrial DNA gene flow in Old-World populations of *Drosophila subobscura*. **Heredity** **68**: 15-24.
- Latorre, M., Ullate, J. V., Sanchez, J., Calvo, F., Cisterna, R., 1993. A case of myiasis due *Dermatobia hominis*. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases** **12 (12)**: 968-969.
- Leclercq, M., 1995. Myiase cutannée furonculoïde humaine par *Dermatobia hominis* (Linnaeus Jr., 1781) (Diptera: Cuterebridae) Une observation en Belgique. **Bull. Annals Soc. r. belge Ent.** **131**: 327-334

- Lello, E., Boulard, C., 1990. Rabbit antibody responses to experimental infestation with *Dermatobia hominis*. **Medical and Veterinary Entomology** **4**: 303-309.
- Lello, E., Peraçoli, M. T. S., 1993. Cell- mediated and humoral responses in immunized and/ or *Dermatobia hominis* infested rabbits. **Veterinary Parasitology** **47**: 129-138.
- Lunt, D. H., Hyman, B. C., 1997. Animal Mitochondrial Recombination. **Nature** **387**: 247.
- Magalhães, F. E. P., Lima, J. D., 1988. Frequência de Larvas de *Dermatobia hominis* (Linnaeus, Jr. 1781), em Bovinos de Pedro Leopoldo, Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** **40 (5)**: 361-367.
- Maia, A. A. M., Guimarães, M. P., 1986. Uso da Ivermectina no Controle de Larvas de *Dermatobia hominis* (Linnaeus, 1781) (Diptera: Cuterebridae) em Bovinos de Corte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** **37**: 461-467
- McElroy, D., Moran, P., Bermingham, E., Kornfield, I., 1992. REAP: an integrated environment for the manipulation and phylogenetic analysis of restriction data. **Journal of Heredity** **83**: 157-158.
- Mitchell, S. E., Narang, S. K., Cockburn, A. F., Seawright, J. A., Goldenthal, 1992. Mitochondrial and ribosomal DNA variation among members of the *Anopheles quadrimaculatus* (Diptera: Culicidae) species complex. **Genome** **35**: 939-950.
- Moraes, F. R., Costa, A. J., Vasconcelos, O. T., Rocha, U. F., 1986. Ensaio Comparativo de Susceptibilidade Natural de Zebuínos e Taurinos à Larva de *Dermatobia hominis* (Lineu Jr, 1781). **Ars Veterinaria** **2 (2)**: 247-253.
- Moritz, C., Dowling, T. E., Brown, W. M., 1987. Evolution of Animal Mitochondrial DNA: Relevance for Population Biology and Systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics** **18**: 269-292.

- Moya- Borja, G. E., 1982. O berne: biologia, comportamento e controle. **Agroquímica CIBA-GEIGY 17**: 19-26.
- Moya- Borja, G. E., Muniz, R. A., Sanavria, A., Gonçalves, L. C. B., Rew, R. S., 1993. Therapeutic and persistent efficacy of doramectin against *Dermatobia hominis* in cattle. **Veterinary Parasitology**, **49**: 85-93.
- Murdoch, D. R., Pilgrim, R. L., Paltridge, G. P., 1993. Cutaneous myiasis due to *Dermatobia hominis*: case report. **New Zealand Medical Journal 109 (1035)**: 465-466.
- Narang, S. K, Klein, T. A., Perera, O. P., Lima, J. B., Tang, A. T., 1993. Genetic Evidence for the Existence of Cryptic Species in the *Anopheles albitarsis* Complex in Brazil: Allozymes and Mitochondrial DNA Restriction Fragment Length Polymorphisms. **Biochemical Genetics 31 (1/2)**: 97-112.
- Narang, S. K., Degrugillier, M. E., 1995. Genetic Fingerprinting of the Screwworm (Diptera: Calliphoridae) Infestation in North Africa by Mitochondrial DNA Markers. **Florida Entomologist 78 (2)**: 294-304.
- Neel, N. W., Urbina, O., Viale, E., Alba, J., 1956. Ciclo biológico del tórsalo (*Dermatobia hominis*, L. Jr.) em Turrialba, Costa Rica. **Turrialba 5 (3)**: 91-104.
- Nei, M., 1987. DNA Polymorphism Within and Between Populations. *In*: **Molecular Evolutionary Genetics**. Columbia University Press. pp 254-286.
- Nei, M., Li, W. H., 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. **Proceedings of National Academy of Science USA 76 (10)**: 5269-5273.
- Nei, M., Miller, J. C., 1990. A Simple Method for Estimating Average Number of Nucleotide Substitutions Within and Between Populations From Restriction Data. **Genetics 125**: 873-879.

- Nigro, L., 1988. Natural populations of *Drosophila simulans* show great uniformity of the mitochondrial DNA restriction map. **Genetica (Dordrecht) 77 (2)**: 133-136.
- Oliveira, G. P., Alencar, M. M., 1990. Resistência de Bovinos de Seis Graus de Sangue Holandês-Guzerá ao Carrapato (*Boophilus microplus*) e ao Berne (*Dermatobia hominis*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, 42 (2)**: 127-135.
- Powell, J. R., Caccone, A., Amato, G. D., Yoon, C., 1986. Rates of nucleotide substitution in *Drosophila* mitochondrial DNA and nuclear DNA are similar. **Proceedings of National Academy of Science USA 83**: 9090-9093.
- Powell, J. R., 1994. Molecular Techniques in Population Genetics: A Brief History. *In* **Molecular Ecology and Evolution: Approaches and Applications**. B. Shierwater, B. Streit, G. Wagner, R. DeSalle (eds), Birkhause Verlag, Basel. pp 131-156.
- Powell, J. R., 1997. Molecular Evolution. *In*: **Progress and Prospects in Evolutionary Biology: The Drosophila Model**. Oxford University Press. pp 381-395.
- Reunala, T., Laine, L. J., Saksela, O., Pitkänen, T., Lounatmaa, K., 1990. Furuncular Miyasis. **Acta Dermato- Venereologica 70 (2)**: 167-170.
- Ribeiro, P. B., Oliveira, C. M. B., 1987. Fases de vida Livre da *Dermatobia hominis* (L. Jr., 1781) (Diptera: Cuterebridae). **Arquivo Brasileiro de Merdicina Veterinária e Zootecnia 39 (6)**: 881-890.
- Ribeiro, P. B., Brum, J. G. W., Costa, P. R. P., Batista, Z. R., 1989. Flutuação Populacional de *Dermatobia hominis* (L. Jr., 1781) sobre Bovinos no Município de Pelotas, RS. **Arquivo Brasileiro de Merdicina Veterinária e Zootecnia 41 (3)**: 223-231.

- Ribeiro, P. B., Vianna, E. E. S., Costa, P. R. P., Scholl, P. J., 1993. Período de vida e Capacidade de Postura da *Dermatobia hominis*, em laboratório. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária** 2 (1): 29-31.
- Roehrdanz, R. L., 1989. Intraspecific genetic variability in mitochondrial DNA of the screwworm fly (*Cochliomyia hominivorax*). **Biochemical Genetics** 27: 551-569.
- Roehrdanz, R. L., Johnson, D. A., 1988. Mitochondrial DNA variation among geographical populations of the screwworm fly *Cochliomyia hominivorax*. **Journal of Medical Entomology** 25: 136-141.
- Roehrdanz, R. L., Lopez, J. D., Loera, J., Hendricks, D. E., 1994. Limited Mitochondrial DNA Polymorphism in North American Populations of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). **Annals of the Entomological Society of America** 87 (6): 856-866.
- Rogers, A. R., Harpending, H. C., 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. **Molecular Biology and Evolution** 9: 552-569.
- Roncagli, R. A., Usher, C., 1988. Efficacy of Ivermectin Against *Dermatobia hominis* in Cattle. **Veterinary Parasitology** 28: 343-346.
- Rossi, M. A., Zucoloto, S., 1972. Fatal cerebral myiasis caused by the tropical warble fly, *Dermatobia hominis*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 22: 267-269.
- Rossi, M. S., Barrio, E., Latorre, A., Quezada-Díaz, J. E., Hasson, E., Moya, A., Fontdevila, A., 1996. The Evolutionary History of *Drosophila buzzatii*. XXX. Mitochondrial DNA Polymorphism in Original and Colonizing Populations. **Molecular Biology and Evolution** 13 (2): 314-323.
- Rubel, D. M., Walder, B. K., Jopp-McKay, A., Rosen, R., 1993. Dermal myiasis in an Australian traveller. **Australasian Journal of Dermatology** 34 (2): 45-47.

- Ruíz-Martínez, I., Gómez, F., Pérez, J. M., Poudevigne, F. A., 1996. The Role of Botfly Myiasis due to *Dermatobia hominis* L. Jr. (Diptera: Cuterebridae) as a Predisposing Factor to New World Screwworm Myiasis (*Cochliomyia hominivorax* Coquerel) (Diptera: Calliphoridae). **Annals NY Academy of Sciences** 791 (23): 434-442.
- Salgado-Labouriau, M. L., 1994. **História Ecológica da Terra**, 2° ed. Ed. Edgard Blücher Ltda.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., 1989. **Molecular Cloning. A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, NY.
- Serra, R. G., 1963. Contribuição à biologia de *Dermatobia hominis* (L. Jr., 1781). Capacidade ovígera e oviposição. **Revista da Faculdade de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo** 1 (2): 119-124.
- 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. **Annals of Entomological Society Am.** 87 (6): 651-701.
- Southern, E. M., 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by electrophoresis. **Journal of Molecular Biology** 98: 503.
- Spradbery, J. P., 1994. Screw-worm Fly: a Tale of Two Species. **Agricultural Zoology Reviews** 6. Evans, K. (ed) 62pp.
- Stevens, J., Wall, R., 1996. Species, sub-species and hybrid populations of the blowflies *Lucilia cuprina* and *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). **Proceedings of Royal Society of London, serie B: Biological Science** 263: 1335-1341.
- Sue-Ho, R. W., Lindo, J. F., 1995. Cutaneous Furuncular Myiasis in a Jamaican Resident. **W. I. Medical Journal** 44: 106.

- Szalanski, A. L., Taylor, D. B., Peterson, R. D. II, 1996. Population Genetics and Gene Variation of Stable Fly Populations (Diptera: Muscidae) in Nebraska. **Journal of Medical Entomology** **33** (3): 413-420.
- Szczurko, C., Domp martin, A., Moreau, A., Belloy, F., Remond, B., Leroy, D., 1994. Ultrasonography of Furuncular Cutaneous Myiasis: Detection of *Dermatobia hominis* Larvae and Treatment. **International Journal of Dermatology** **33** (4): 282-283.
- Tamura, K., Aotsuka, T., Kitagawa, O., 1991. Mitochondrial DNA polymorphism in two subspecies of *Drosophila sulfurigaster*: Relationship between geographic structure of population and nucleotide diversity. **Molecular Biology and Evolution** **8**: 104-114.
- Taylor, D. B., Szalanski, A. L., Peterson, R. D., 1996. Mitochondrial DNA variation in screwworm. **Medical and Veterinary Entomology** **10**: 161-169.
- Thomas, D. B., 1988. The Pattern of *Dermatobia* (Diptera: Cuterebridae) Myiasis in Cattle in Tropical Mexico. **Journal of Medical Entomology** **25** (2): 131-135.
- Uribe, L. F., McMullin, P. F., Cramer, L. G., Amaral, N. K., 1989. Topically Applied Ivermectin: Efficacy Against Torsalo (Diptera: Cuterebridae). **Entomological Society of America** **82** (3): 847-849.
- Valle, J. S., 1997. Análise da variabilidade genética de *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae); Avaliação através do DNA mitocondrial e análise cariotípica. **Tese de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, S. P.**
- Valle, J. S., Azeredo Espin, A. M. L., 1995. Mitochondrial DNA variation in two Brazilian populations of *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae). **Revista Brasileira de Genética** **18** (4): 521-526.

- Wayne, R. K., Meyer, A., Lehman, N., Van Valkenburgh, B., Kat, P. W., Fuller, T. K., Girman, D., O'Brien, S. J., 1990. Large sequence divergence among mitochondrial genotypes within populations of eastern African black-backed jackals. **Proceedings of National Academy of Science USA** **87**: 1772-1776.
- Weir, B. S., Cockerham, C. C., 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution** **38**: 1358-1370.
- Wilson, A. C., Cann, R., Carr, S. M., George, M., Gyllenstein, U. B., Helm-Bychowski, K. M., Higuchi, G., Palumbi, S. R., Prager, E. M., Sage, R. D., Stoneking, M., 1985. Mitochondrial DNA and Two Perspectives on Evolutionary Genetics. **Biological Journal of the Linnean Society** **26**: 375-400.
- Wright, S., 1951. The genetical structure of populations. **Ann. Eugen.** **15**: 323-354.
- Zeledon, R., Silva, S., 1987. Attempts to culture the parasitic stage of *Dermatobia hominis* (L. Jr.) in vitro (Diptera: Cuterebridae). **Journal of Parasitology** **73**: 907-909.
- Zumpt, F. 1965. Myiasis in Man and Animals in the Old World. **London, Butterworths, 267 pp.**