

JULIANA SILVEIRA DO VALLE

**“ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE *Cochliomyia macellaria*
(DIPTERA: CALLIPHORIDAE); AVALIAÇÃO ATRAVÉS DO DNA
MITOCONDRIAL E ANÁLISE CARIOTÍPICA.”**

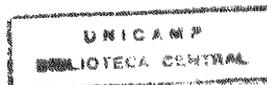
Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo (a) candidato a)
Juliana Silveira do Valle
[assinatura]
e aprovada pela Comissão Julgadora.

20/02/97

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

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

Campinas - SP
1997



FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

V242a

Valle, Juliana Silveira do

Análise da variabilidade genética de *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae) : avaliação através do DNA mitocondrial e análise cariotípica / Juliana Silveira do Valle. — Campinas, SP : [s.n.], 1997.

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

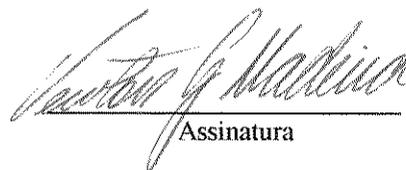
1. *Cochliomyia macellaria*. 2. DNA mitocondrial.
3. Genética de populações. I. Azeredo-Espin, Ana Maria Lima de. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

LOCAL E DATA: Campinas, 20 de fevereiro de 1997.

BANCA EXAMINADORA:

TITULARES:

Prof. Dr. Newton Goulart Madeira


Assinatura

Prof Dra. Vera Nisaka Solferini


Assinatura

Profa. Dra. Ana Maria Lima de Azeredo-Espin


Assinatura

SUPLENTE:

Profa. Dra. Maria Cristina Arias

Assinatura

Este trabalho foi realizado com auxílio financeiro sob forma de bolsa de Pós-Graduação em nível de Mestrado concedida pela CAPES e com Financiamentos de Projetos concedidos pela FAPESP, CNPq, PADCT-FINEP.

AGRADEÇO

Aos meus pais Gerson e Lourdes, pelo amor incondicional, pelo incentivo e pela confiança.

À Cristina, Paula e Flávia, minhas irmãs, pelo companheirismo, por incontáveis momentos felizes e por toda uma vida de amizade verdadeira.

Ao Rafael, que com sua vida iluminou a minha.

À Profa. Dra. Ana Maria L. de Azeredo-Espin, pela oportunidade única de trabalharmos juntas e pelo exemplo de profissional.

À Profa. Dra. Maria Cristina Arias, pela ótima convivência durante sua estada no nosso laboratório e por sua contribuição na discussão deste trabalho.

À Profa. Dra. Vera N. Solferini, pela discussão, tão enriquecedora, deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Newton G. Madeira, pela discussão da tese, pelos inúmeros esclarecimentos sobre califorídeos e pela disponibilidade em fornecer-me, incontáveis vezes, as tão importantes mosquinhas.

À Rosângela Ap. Rodrigues, por sua dedicação, amizade e auxílio desde os meus “primeiros passos” no laboratório.

À Nairlidia Salmi Hallais e Maria Salete do Couto Campos, pela convivência feliz e pelo auxílio durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Mário Constantino Filho por sua dedicação e fundamental ajuda durante as atividades de coleta.

Minhas amigas Ana Cláudia Lessinger e Maria Elena Infante Vargas, por tantos momentos agradáveis do dia-a-dia, pelo apoio nos momentos difíceis, pelo companheirismo, por estarem sempre presentes e principalmente pela amizade tão valiosa.

Ao meu melhor amigo, José Eduardo Pandossio, pela amizade, carinho e por sempre lembrar-se de mim.

Aos amigos Reinaldo e Rosilene, por estarem sempre presentes, por sua amizade e carinho.

À Inaiá, Manuela e Beatriz, por sua amizade e pela oportunidade de dividirmos as alegrias e tensões do dia-a-dia.

Aos amigos Eduardo (Pé), Paulinho e Bacu pelas boas lembranças da nossa convivência.

Aos amigos da Camerata Anima Antiqua e do Coral Coca, por tornarem meus dias musicais.

À Tereza por sua prestatividade e dedicação aos alunos da pós-graduação.

Ao companheiro de lab. Luciano C. Scarpelli (Luzinho), pela amizade e por compartilhar comigo o início do trabalho que resultou nesta tese.

Aos queridos amigos da turma 90, Giovanna, Paulão, Pam, Dante, Cláudio, Helô, Cibele, Alexandre, Maria Alessandra, Sibov, Ann, Lee, Valéria, Duzão, Lisandra, Luciana, Maria Amélia, Luciano, Renato, Marques, Rogério, Nonaka, Dani, Yuko, João, Cris e Hélio, por dias felizes e pelas boas lembranças que ficaram.

ÍNDICE

I. Introdução	1
1.1- Sobre a Espécie <i>Cochliomyia macellaria</i> (Diptera: Calliphoridae)	1
1.2- Variabilidade Genética de <i>Cochliomyia macellaria</i>	6
II. Objetivos	15
III. Material e Métodos	16
3.1- Material	16
3.2- Métodos	17
3.2.1- Método de Coleta e Criação de <i>Cochliomyia macellaria</i>	17
3.2.2- Experimento de Cruzamento	19
3.2.3- Análise do DNA mitocondrial	20
3.2.3.1-Extração de Ácido Nucleico Total de <i>Cochliomyia macellaria</i>	20
3.2.3.2- Método para Isolamento Mitocondrial	21
3.2.3.3- Purificação do DNA mitocondrial	22
3.2.3.3.1- Gradiente de Cloreto de Césio	22
3.2.3.3.2- Diálise do DNA mitocondrial	23
3.2.3.4- Produção de Sondas de DNA mitocondrial	24
3.2.3.4.1- Marcação com Digoxigenina por “Random Primed” (Sonda Fria)	24
3.2.3.4.2- Marcação com $\alpha^{32}\text{P}$ através de Kit de “Nick Translation” (BRL)	26
3.2.3.5-Análise do DNA mitocondrial com Endonucleases de Restrição	27
3.2.3.6- “Southern Blot”	28
3.2.3.7- Hibridação	29
3.2.3.8- Detecção da Hibridação	29
3.2.4- Análise da Divergência de Sequência do DNA mitocondrial Interpopulações	30
3.2.5- Análise Cariotípica	31
3.2.5.1- Preparações Citológicas	31
3.2.5.2- Análise das Lâminas	32
3.2.5.3- Análise Morfométrica dos Cromossomos	32

IV. Resultados	34
4.1- Método de Coleta e Criação de <i>Cochliomyia macellaria</i>	34
4.2-Construção de Sondas de DNA mitocondrial de <i>Cochliomyia hominivorax</i>	34
4.2.1- DNA mitocondrial para Produção e Marcação de Sondas	34
4.3- Análise do DNA mitocondrial com Endonucleases de Restrição	35
4.4- Experimento de Cruzamento	48
4.5- Cariótipo de <i>Cochliomyia macellaria</i>	54
4.5.1- Autossomos	54
4.5.2- Cromossomos Sexuais	57
V. Discussão	58
VI. Resumo	79
VII. Abstract	82
VIII. Referências Bibliográficas	84

ABREVIACÕES

A	Adenina
ATP	Adenosina trifosfato
BET	Brometo de Etídio
Bo	Botucatu
C	Citosina
Ca	Caraguatatuba
Cp	Campinas
CsCl	Cloreto de Césio
dATP	desoxiadenosina- 5' - trifosfato
α dCTP ³²	α - desoxicitidina- 5' - trifosfato (isótopo radioativo de fósforo)
DEPC	Dietil pirocarbonato
dGTP	desoxiguanosina - 5' - trifosfato
Dig	digoxigenina
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DNAmt	Ácido desoxiribonucleico mitocondrial
DNase I	Desoxiribonuclease I
DNApol I	DNA polimerase I
dTTP	desoxitimidina - 5' - trifosfato
dUTP	desoxiuridina - 5' - trifosfato
EDTA	Etileno diamina tetraacetato
EGTA	Etileno glicol (b-aminoetil eter)
g	unidade de aceleração gravitacional
G	Guanina
Hepes	N- (2-hidroxiethyl) piperazina - N' - 2 (ácido etano sulfúrico)
Kpb	kilo pares de base
LiCl	cloreto de lítio
Ma	Manaus
MIM	Método de isolamento mitocondrial
MLB	Mitochondrial Lysis Buffer
NaCl	cloreto de sódio
NaOAc	acetato de sódio
NaOH	hidróxido de sódio
ng	nano grama
α^{32} P	fósforo (isótopo radioativo)
pb	pares de base
PU	Porto Urucu
RJ	Itaboraí - Rio de Janeiro
RNA	Ácido ribonucleico
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
SDS	Sodium Dodesyl Sulfate
SSC	Standar Sodium Citrate
T	Timina
TAE	Tris acetato EDTA

TE	Tris EDTA
Tris	Tris (hydroxymetil) amino metano
U	unidade internacional
U.V.	Ultra Violeta

I. INTRODUÇÃO

1.1 - Sobre a espécie *Cochliomyia macellaria* (Diptera:Calliphoridae)

Os dípteros muscóideos são de ampla distribuição geográfica e ocorrem tanto em áreas florestadas quanto em ambientes urbanos. Várias espécies deste tipo de inseto, devido ao seu comportamento alimentar e reprodutivo, possuem estreito relacionamento com matéria orgânica em decomposição. Com a crescente multiplicação e desenvolvimento dos centros urbanos e conseqüentemente, o aumento de lixo e dejetos orgânicos produzidos por eles, é esperada uma proliferação natural deste tipo de inseto, principalmente nos locais onde há deficiência de saneamento básico, muito comum nos países em desenvolvimento.

Entre os dípteros muscóideos relacionados a estes ambientes destacam-se as espécies de moscas da família Calliphoridae, conhecidas como varejeiras, por serem importantes disseminadores mecânicos de agentes enteropatogênicos e principalmente, por causarem miíases em animais e no homem.

O termo miíase foi definido por Zumpt (1965) como sendo “a infestação em vertebrados por larvas de dípteros que pelo menos por um certo período, se alimentam de tecidos vivos ou mortos do hospedeiro, de seus líquidos corporais ou de alimentos por ele ingeridos”. A importância destes dípteros causadores de miíases reside no fato das larvas dependerem do corpo do hospedeiro vivo ou morto para completarem o seu desenvolvimento normal. Tais larvas pertencem a dois grupos biologicamente distintos: os

parasitas obrigatórios (primários) e os facultativos (secundários) de vertebrados.

São considerados parasitas obrigatórios, aqueles que normalmente se desenvolvem exclusivamente em vertebrados vivos. Pertencem a este grupo, por exemplo, larvas que vivem em cavidades nasofaríngeas e outros sistemas internos de certos grupos de mamíferos herbívoros (família Oestridae), e as que vivem em tecidos dérmicos e subdérmicos de vários mamíferos, como é o caso da espécie *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel) da família Calliphoridae.

As espécies consideradas parasitas facultativos são aquelas cujas larvas normalmente se desenvolvem em matéria orgânica em decomposição, como carcaças de animais, fezes humanas e de animais, lixo urbano e hospitalar, etc. Ocasionalmente estas larvas podem ter acesso ao corpo de animais vivos, mas desenvolvem-se preferencialmente sobre tecidos necrosados, atuando como parasitas durante certo período ou completando seu desenvolvimento no novo ambiente.

Neste segundo grupo destaca-se *Cochliomyia macellaria* caracterizada por ser uma espécie exclusivamente saprófaga, podendo causar miíases apenas em infestações secundárias de feridas. Esta espécie é, talvez, o califorídeo mais amplamente distribuído nas Américas (Hall, 1948) e, por ser considerada sinantrópica, isto é, estar intimamente associada ao ambiente humano, tem grande importância como vetor mecânico de microorganismos patogênicos, sendo por isso de especial interesse para a saúde pública (Ferreira, 1983; Baumgartner & Greenberg, 1985; Paraluppi, 1992).

Esta espécie ocorre em toda a América desde o Sul do Canadá até a Argentina, sendo especialmente abundante nas regiões tropicais (Ferreira, 1983; Baumgartner &

Greenberg, 1985; Dear, 1985).

O ciclo de vida de *C. macellaria* na natureza pode variar de 9 até 39 dias dependendo, principalmente, das condições de temperatura e umidade (Guimarães *et al.*, 1979). A fase de pré-oviposição pode durar de 3 a 18 dias e, após esse período, são depositadas massas de 40 a 250 ovos, principalmente sobre matéria orgânica em decomposição. Frequentemente várias fêmeas se reúnem para a postura formando massas de milhares de ovos. Após um período embrionário de aproximadamente 4 horas, em temperatura e umidade favoráveis, as larvas eclodem e se alimentam do substrato durante 6 a 20 dias. Após completarem seu desenvolvimento, as larvas abandonam o substrato de alimentação enterrando-se no solo onde ocorre a fase de pupa que dura 3 dias ou mais (Guimarães *et al.*, 1979). Os adultos de *C. macellaria* vivem de 2 a 6 semanas alimentando-se de várias substâncias como os líquidos presentes na matéria orgânica em decomposição, também utilizado para oviposição (Guimarães *et al.*, 1983).

Na década de 70, foi detectada pela primeira vez a presença de 4 espécies de moscas do gênero *Chrysomya* Robineau-Desvoidy nas Américas. Até então, estas espécies de califorídeos estavam confinadas ao Velho Mundo e foram introduzidas no Continente Americano através de intervenção humana. Diversas atividades, especialmente movimento migratório além da exportação de animais vivos, podem facilitar a dispersão de muitos parasitas e seus vetores e também alterar profundamente a distribuição geográfica e epidemiológica de espécies particulares (Prado & Guimarães, 1982; Laurence, 1986). Em 1975, um grande número de indivíduos adultos da espécie *Chrysomya putoria* Wiedmann foram encontrados em Curitiba, Paraná, a aproximadamente 110km do litoral (Imbiriba *et*

al., 1977). Pouco tempo depois, Guimarães *et al.* (1978) reportaram a presença de *C. putoria*, *C. albiceps* Wiedmann e *C. megacephala* Fabricius no Estado de São Paulo em Campinas e Santos. Guimarães *et al.* (1979) e Laurence (1981) sugerem que as três espécies foram introduzidas no Brasil provavelmente, por volta de 1975 quando cerca de 600.000 refugiados de Moçambique e Angola, aportaram no Brasil em embarcações onde traziam também animais domésticos. Estas espécies se dispersaram rapidamente no Brasil após esta introdução. Baumgartner & Greenberg (1984) sugerem que provavelmente, antes desse evento, muitas introduções de moscas do gênero *Chrysomya* no Novo Mundo fracassaram e obviamente as condições para colonização não foram encontradas até meados dos anos 70. A quarta espécie, *Chrysomya rufifacies* Macquart, foi coletada em um cadáver humano em 1978 na Costa Rica (Jirón, 1979) e, desde esta época, sua presença tem sido reportada no México (Gagné, 1981), Arizona e Texas (Gagné *et al.*, 1982; Richard & Ahrens, 1983). Segundo Baumgartner & Greenberg (1984) a espécie *C. rufifacies* foi introduzida separadamente pois sua distribuição original compreende o Oriente e Austrália.

O estabelecimento de espécies de *Chrysomya* no Novo Mundo afetou diretamente a distribuição local de moscas varejeiras por competição (Baumgartner & Greenberg, 1984). Hanski (1977) sugere, por exemplo, que *Lucilia caesar* Linneu foi extinta nas Ilhas Canárias devido à competição com a espécie exótica *C. albiceps*. Em Campinas - SP e Goiânia - GO (Guimarães *et al.*, 1979) e nas localidades de Nova Odessa - SP e Ouro Fino - MG (Azeredo-Espin & Pavan, 1983) foi relatada a substituição de *C. macellaria* por *C. putoria*. Baumgartner & Greenberg (1984) também reportam o deslocamento de *C.*

macellaria em Santa Maria - RS por *C. albiceps*, *C. putoria* e *C. megacephala*. No Peru, os trabalhos realizados por Baumgartner & Greenberg (1984) comprovaram que entre 1980 e 1981, as populações de *C. albiceps* e *C. putoria* aumentaram e as populações de *C. macellaria* declinaram de uma frequência inicial de 89% para 0.19% nas regiões de floresta superior e de 45.5% para 11.3% nas regiões de floresta inferior.

De acordo com Baumgartner & Greenberg (1984), as espécies nativas do Novo Mundo do gênero *Cochliomyia* são consideradas equivalentes ecológicos das espécies de *Chrysomya*, ocupando o mesmo nicho, reforçando a observação de que a introdução e estabelecimento deste gênero tem claramente alterado a distribuição e a frequência de *C. macellaria* no Brasil

Na maioria dos países em desenvolvimento, é bastante comum a deficiência de infraestrutura básica de saneamento. Nestas condições, onde não raro encontra-se grandes quantidades expostas de lixo, esgoto a céu aberto ou até mesmo a utilização de fossas, a reprodução de moscas como as varejeiras é facilitada encontrando-se em muitos locais uma alta densidade populacional. Tal situação é preocupante, especialmente pelo comportamento sinantrópico da maioria destas moscas que, visitando os ambientes nas condições descritas acima e entrando em contato direto com o homem (alimentos expostos, carne e peixe em feiras livres e mercados, etc.), acabam por atuar como vetores mecânicos de inúmeros microorganismos patogênicos. Baumgartner & Greenberg (1984) descrevem a potencialidade dos califorídeos como vetores de *Salmonella* sp e poliovírus. Paraluppi (1992) constatou que a análise bacteriológica de moscas coletadas nas feiras livres de Manaus - AM, apresentou resultados positivos para vários tipos de bactérias

como: *Escherichia coli*, *Citrobacter* sp e *Klebsiella* sp.

Baseado nestes fatos, estudos da biologia e genética de populações de *C. macellaria* tornam-se de fundamental importância para o acompanhamento do evento recente de introdução de espécies exóticas e deslocamento de uma espécie nativa, para estudo de processos ecológicos decorrentes dessa interferência e principalmente pelo papel que *C. macellaria* desempenha no âmbito da saúde pública.

1.2 - Variabilidade Genética de *Cochliomyia macellaria*

A nível genético, investigações de populações naturais de *C. macellaria* têm se limitado basicamente à caracterização cariotípica da espécie. O número cromossômico de *C. macellaria* é $2n = 12$, sendo a fêmea XX e o macho XY, característica marcante da família Calliphoridae que possui número cromossômico uniforme (Boyes, 1961). As variações no tamanho e forma dos cromossomos são comuns, principalmente no par sexual.

Boyes (1961), descreveu e construiu um ideograma dos 6 pares do complemento cromossômico de *C. macellaria*. Boyes & VanBrink (1965) caracterizaram o complemento cromossômico de células de gânglio nervoso de *C. macellaria* encontrando cromossomos sexuais X e Y menores que os autossomos. As características cariotípicas de duas amostras de indivíduos coletados no México e em Porto Rico, foram analisados por Boyes & Shewell (1975) que não encontraram variação morfológica entre as duas. No Brasil, Azeredo-Espin (1982) e Azeredo-Espin & Pavan (1983) descreveram o

cariótipo de *C. macellaria* coletada em Caraguatatuba - SP. Na amostra analisada os pares de autossomos 2, 3, 4 e 5 foram descritos como metacêntricos, o par 6 sendo o único submetacêntrico e os cromossomos X e Y foram caracterizados pelo pequeno tamanho sendo o X metacêntrico e o Y um acrocêntrico muito pequeno. O complemento cromossômico como um todo, caracterizou-se pelo grande número de constrições secundárias observadas em um dos braços nos pares de autossomos 2, 3, 4 e 6.

Embora em um cromossomo o mais importante atualmente seja o seu conteúdo gênico, características cariotípicas têm demonstrado ser de grande valia como base de comparações a nível intra e interespecífico (Stebbins, 1950).

Com relação à análise da variabilidade genética de *C. macellaria* poucos trabalhos têm sido realizados utilizando-se marcadores moleculares. Taylor & Peterson II (1994) detectaram variabilidade em 12 dos 13 loci enzimáticos analisados em *C. macellaria* da Costa Rica. Nestes loci a frequência do alelo mais comum foi $<0,95$ para seis loci e a heterozigosidade encontrada foi de 0,160. Os resultados obtidos foram interpretados como indicativo de que, na Costa Rica, *C. macellaria* é panmítica sem evidência de subestruturação populacional.

Valle & Azeredo-Espin (1995), realizaram a análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição do DNA mitocondrial (DNAMt) técnica denominada RFLP (do inglês, Restriction Fragment Length Polymorphism), de duas populações brasileiras de *C. macellaria*. Das 12 endonucleases de restrição testadas, duas (*EcoRV* e *HindIII*), revelaram polimorfismo e foram consideradas marcadoras para o DNAMt, gerando sete haplótipos mitocondriais diferentes.

Roehrdanz & Johnson (1996) descrevem os padrões de restrição de DNAm obtidos, utilizando-se 15 endonucleases para uma única população de *C. macellaria* de Chiapas, México. Doze destas enzimas foram utilizadas para a construção de um mapa de restrição desta população. Embora, os autores acima utilizaram nove endonucleases que também foram empregadas por Valle & Azeredo-Espin (1995), porém não detectaram variabilidade na população analisada. Dos padrões obtidos para estas nove enzimas, foram encontrados os mesmos padrões para sete enzimas. Com as enzimas marcadoras para populações brasileiras foram encontrados quatro padrões para *EcoRV* e três para *HindIII*, enquanto que em Chiapas foram observados apenas um padrão para *EcoRV* (B) e *HindIII* (A).

De maneira geral, quando se trabalha com populações de organismos de qualquer espécie, uma das questões principais a ser analisada é a distribuição e a quantificação da variabilidade genética. O conhecimento, a nível molecular, de características como o modo de transmissão genética e a natureza das diferenças mutacionais que caracterizam determinado polimorfismo, é fundamental para a elaboração de interpretações sobre marcadores genéticos num contexto populacional. Além disso, padrões de variação e divergência em marcadores genéticos podem ser altamente informativos no que diz respeito aos processos de evolução molecular.

Com o avanço das técnicas de biologia molecular nos últimos 20 anos, passou-se a utilizar as informações genéticas obtidas de macromoléculas (proteínas, DNA, RNA), na abordagem de muitos aspectos relacionados aos padrões históricos de dispersão e colonização e para o estabelecimento de relações filogenéticas entre organismos. Tais

dados quando integrados com informações de áreas diferentes como etologia, ecologia, morfologia comparativa, sistemática e paleontologia, podem fornecer informações sobre vários aspectos da biologia e estrutura genética de populações de inúmeras espécies (Avise, 1994).

A aplicação da técnica de eletroforese de proteínas para análise intra e interespecífica em populações naturais tem sido amplamente utilizada e tem demonstrado ser uma técnica útil na análise de estrutura genética e variação geográfica de vários organismos (Avise & Kitto, 1973; Soltis *et al.*, 1987; Murphy *et al.*, 1990). Contudo tal método apresenta limitações, principalmente para a análise de insetos devido a: 1- com algumas exceções, os insetos devem estar vivos ou recentemente congelados antes da sua utilização. 2- as alozimas de alguns insetos apresentam-se pouco variáveis. 3- bandas que migram juntas são consideradas homólogas. 4- podem estar presentes bandas que não seguem o padrão de herança mendeliana. 5- para alguns loci, esta técnica revela apenas uma pequena parte da variação genética existente. 6- impossibilidade de definir padrões de ancestralidade e descendência entre alelos diferentes (Roderick, 1996). Portanto, embora consista num método versátil, o estudo de variantes eletroforéticas de loci nucleares codificadores possui utilidade limitada quando empregado para análise da variabilidade genética, principalmente em estudos a nível populacional (Avise *et al.*, 1979; Avise, 1994 e Roderick, 1996).

Com o desenvolvimento de novas técnicas de biologia molecular para a análise da variabilidade genética, tais como a análise do DNA mitocondrial, incrementou-se os índices de polimorfismo. O neutralismo, isto é, a teoria defendida por Kimura & Ohta

(1971) e Ohta (1974) de que as variações moleculares detectadas seriam seletivamente neutras, uma vez que não teriam efeito fenotípico, passou a ser amplamente aceito como a explicação mais satisfatória para a variabilidade do DNAmt (Ridley, 1993). Atualmente, as teorias neutralista e selecionista podem ser utilizadas para explicar a existência de variabilidade, reconhecendo-se variações de caráter neutro e outras de caráter adaptativo no DNA. Porém, a discussão permanece com relação ao fato de quanto desta variação deve ser atribuída a processos seletivos e quanto a processos estocásticos (Gillespie, 1992; Ridley, 1993).

Com a descoberta das endonucleases de restrição (Linn & Arber, 1968; Meselson & Yuan, 1968) a biologia molecular obteve um grande avanço. Em uma bactéria, tais enzimas têm a função de proteger a célula contra DNAs exógenos, clivando a molécula de DNA em uma sequência específica de nucleotídeos. Em estudos moleculares as enzimas de restrição são utilizadas numa grande variedade de análises de RFLP. A técnica de RFLP envolve a restrição de moléculas de DNA com uma ou mais endonucleases, a separação dos fragmentos resultantes de acordo com peso molecular por eletroforese em gel e a comparação dos fragmentos obtidos com padrões de tamanho já determinados para fagos. Quando indivíduos são comparados, as diferenças nos padrões de restrição que podem ocorrer são interpretadas como sendo resultado de substituições de base no sítio da enzima, adição ou deleção de DNA, rearranjos de sequências, etc, sendo que cada tipo de variação produz alterações diferentes nos padrões de bandas no RFLP. Este tipo de interpretação permite acesso direto a variações na sequência nucleotídica da molécula de DNA, possibilitando uma análise precisa da variabilidade genética de inúmeras populações

e espécies.

Devido a algumas características particulares, o DNA mitocondrial (DNAMt) tem se mostrado eficiente em fornecer um conjunto de marcadores genéticos herdáveis para a análise da variabilidade genética, estrutura e dinâmica de populações (revisão em Wolstenholme, 1992).

O genoma mitocondrial animal se apresenta, de maneira geral, como uma molécula circular de fita dupla covalentemente fechada, caracterizada por apresentar um padrão de herança materna (Fauron & Wolstenholme, 1980), embora alguns poucos casos de herança biparental tenham sido relatados (Kondo *et al.*, 1990; Hoeh *et al.*, 1991). Devido ao fato do DNAMt ser transmitido clonalmente e predominantemente das fêmeas para a progênie e não sofrer recombinação durante a reprodução sexual, o genótipo mitocondrial de um indivíduo pode, teoricamente, fornecer informações relevantes sobre a linhagem materna à que ele pertence (revisão em Avise & Lansman, 1983; Avise, 1994). Seu número de cópias haplóide, a transmissão materna e a ausência de recombinação tornam o DNAMt menos susceptível à homogenização genética interpopulações via fluxo gênico (Lansman *et al.*, 1981; Brown, 1983 e Lansman *et al.*, 1983) e mais susceptível à efeitos de afinamento de populações (Wilson *et al.*, 1985). Como resultado de todos estes fatores, tem-se que a análise do DNAMt tem sido capaz de responder muitas das questões que somente o estudo de isoenzimas não permite. Desta forma, por proporcionar os primeiros dados para estabelecer-se “genealogia gênica” a nível intraespecífico, os métodos envolvendo a análise do DNAMt criaram uma associação empírica e conceitual entre as disciplinas da genética de populações (micro evolução) e da filogenia tradicional

(basicamente estudos macro evolutivos) (Avice, 1989).

Outra vantagem do genoma mitocondrial é o fato de ser pequeno e simples quando comparado ao tamanho e complexidade do genoma nuclear. Uma consequência importante das diferenças entre os dois genomas é que muitas das complexidades e ambiguidades que tornam os dados do DNA nuclear muitas vezes difíceis de interpretar, são reduzidos ou até ausentes quando se analisa o DNAm (Wilson *et al.*, 1985). Assim, devido ao reduzido número de mecanismos de variação disponíveis do genoma mitocondrial, sua evolução parece ocorrer de modo mais rápido, simples e direto que o genoma nuclear, sendo portanto um modelo útil para a análise da evolução molecular de uma espécie e/ou um complexo de espécies relacionadas (Avice & Lansman, 1983; Brown, 1983; Wolstenholme, 1992; Moritz *et al.*, 1987).

O DNAm possui basicamente as mesmas funções em todos os organismos. Presentes no DNAm estão, 2 genes que codificam as subunidades ribossomais (LRNA e SRNA), 22 que codificam RNAs de transferência (RNAt) e 13 genes que codificam RNAs mensageiros (RNAm) que são traduzidos como subunidades de enzimas que atuam na síntese ou transporte de ATP (Brown, 1983; Moritz *et al.*, 1987; Wolstenholme, 1992). Em todos os metazoários a molécula de DNAm apresenta poucas ou nenhuma sequência intergênica e há ausência de íntrons em muitos vertebrados e invertebrados (Anderson *et al.*, 1981, 1982).

Existe uma única região não codificadora que possui sequências importantes para iniciação da transcrição e replicação, chamada Região Controle da replicação. Em insetos e nematóides esta região é extremamente rica em A+T e a maior parte da variação do

tamanho da molécula de DNAm_t, se deve a diferenças no número de cópias de sequências curtas repetidas em tandem nesta região (Clayton, 1982; Boyce, 1989).

Muitos estudos concluíram que a população de moléculas de DNAm_t em células somáticas de um organismo, apresenta-se homogênea quanto a sua sequência nucleotídica (Avisé & Lansman, 1983). Embora esta afirmação seja verdadeira para muitos organismos, há também relatos de situações em que um único indivíduo apresenta diferentes genótipos mitocondriais, sendo considerados heteroplásmicos (Solignac *et al.*, 1983; Boyce *et al.*, 1989; Hoeh *et al.*, 1991). Heteroplasmia para variantes de tamanho é relativamente comum e tem sido relatada para muitos grupos animais (Bermingham *et al.*, 1986; Harrison, 1989). Variações de tamanho de 500pb ou menos, são encontradas tipicamente confinadas na região controle e são comuns em vertebrados inferiores e em insetos (Moritz *et al.*, 1987). Repetições em “tandem” de sequências de 1.2-1.5 kpb são responsáveis por grandes variações de tamanho (Bentzen *et al.*, 1988). Em muitas taxa, moléculas de DNAm_t de grande tamanho aparecem somente como variantes raras em espécies, sugerindo que estas variantes não persistem por longos períodos no tempo evolutivo (Boyce *et al.*, 1989). Além disso, estudos sugerem que moléculas de DNAm_t de tamanho menor são transmitidas com maior frequência devido ao menor tempo necessário para a sua replicação (Solignac *et al.*, 1984; Rand & Harrison, 1986).

Heteroplasmia, devido a diferenças de sequência, é considerada mais rara e pode ser atribuída a eventos mutacionais recentes (Hoeh *et al.*, 1991). Exemplos de heteroplasmia envolvendo um único sítio de restrição são difíceis de serem detectados e podem surgir de interpretações errôneas sobre os padrões de restrição obtidos. Evidências

desse tipo de heteroplasma devem ser tratadas com cautela, evitando-se erros de interpretação (Bentzen *et al.*, 1988). Devido a dificuldades associadas à menor frequência, poucos são os trabalhos que registram casos de heteroplasma de sítio de restrição (Fauron & Wolstenholme, 1980; Hale & Singh, 1986; Bentzen *et al.*, 1988; Valle & Azeredo-Espin, 1995).

O uso do DNAm_t como marcador genético para estudos evolutivos e populacionais, tem demonstrado ser eficiente para muitos grupos animais (revisão em Wilson *et al.*, 1985 e Moritz *et al.*, 1987; Wolstenholme and Jeon, 1992) e também tem demonstrado ser efetivo para caracterizar a análise da variabilidade genética de *C. hominivorax* uma espécie causadora de miíase primária da família Calliphoridae (Roehrdanz & Johnson, 1988; Roehrdanz, 1989; Azeredo-Espin *et al.*, 1991; Azeredo-Espin, 1993; Infante & Azeredo-Espin, 1995). Pela ampla distribuição geográfica, pelo comportamento sinantrópico e grande importância sanitária de *C. macellaria* representa na região Neotropical, investigações sobre a variabilidade genética de populações podem auxiliar no entendimento de padrões históricos de dispersão e níveis atuais de fluxo gênico. A utilização desta metodologia para populações de *C. macellaria*, associada à estudos previamente realizados, poderá fornecer um conjunto de dados importantes para a compreensão da estrutura geográfica atual desta espécie no Brasil.

II. OBJETIVOS

- 1 - Verificar a eficiência do DNAMt como marcador genético para caracterizar as populações de *Cochliomyia macellaria*.
- 2 - Analisar através da metodologia de RFLP o DNAMt de *C. macellaria* coletadas em diferentes localidades e regiões, para uma avaliação da variabilidade genética desta espécie no Brasil.
- 3 - Estimar a divergência de sequência nucleotídica entre os DNAMt das populações analisadas.
- 4 - Verificar a compatibilidade sexual entre indivíduos de populações diferentes através de testes de cruzamento.
- 5 - Proceder a análise cariotípica de diferentes amostras de populações brasileiras previamente analisadas a nível do DNAMt.
- 6 - Correlacionar os dados obtidos através da análise cariotípica (informação nuclear) com os dados obtidos pela análise do DNAMt (informação citoplasmática).

III. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - MATERIAL

Neste trabalho foram utilizados larvas, pupas e/ou adultos de *Cochliomyia macellaria* provenientes de populações naturais coletadas entre maio de 1992 e maio de 1995 nas seguintes localidades brasileiras:

a. Botucatu-SP (Bo): 206km de Campinas, Campus da Universidade Estadual Paulista em maio de 1995.

b. Campinas-SP (Cp): Campus da Universidade Estadual de Campinas em outubro de 1994.

c. Caraguatatuba-SP (Ca): 275km de Campinas, Fazenda Serramar em maio de 1992.

d. Itaboraí-RJ (RJ): 450km de Campinas, Campus da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro em maio de 1992.

e. Manaus-AM (Ma): 3380km de Campinas, perímetro urbano da cidade de Manaus em novembro de 1993.

f. Porto Urucu-AM (PU): Base da Petrobrás em novembro de 1993.

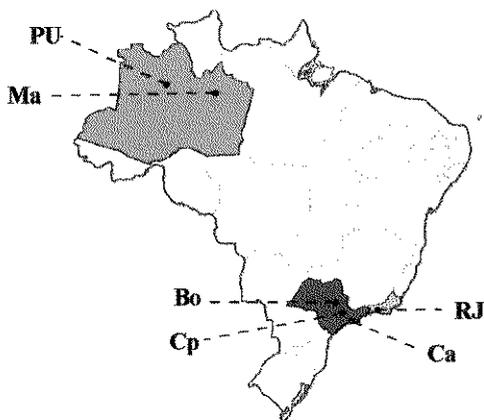


Figura 1: Mapa mostrando a localização das populações de *Cochliomyia macellaria* analisadas, Bo - Botucatu, Ca - Caraguatatuba, Cp - Campinas, Ma - Manaus, PU - Porto Urucu, RJ - Itaboraí.

3.2 - MÉTODOS

3.2.1-Método de coleta e criação de *Cochliomyia macellaria*

Em média 25 moscas adultas de *C. macellaria* foram coletadas diretamente em carcaça bovina ou foram atraídas por iscas colocadas em caixas. Foram testados tipos diferentes de iscas, levando-se em conta o comportamento saprófago de *C. macellaria*. Foram testados fígado bovino, peixe (sardinha), ou rato em decomposição. Este material foi deixado à temperatura ambiente por pelo menos 72 horas para iniciar a decomposição dos tecidos, em seguida foram expostos nos locais de coleta para a captura de adultos com auxílio de rede entomológica ou tubos de ensaio. Os adultos provenientes do campo foram colocados em gaiola telada (20x40x26cm), contendo em seu interior um algodão embebido em água, e transportados para o laboratório.

As moscas foram então transferidas para gaiolas de criação (34x50x26cm) e mantidas em sala com temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, 70% de umidade relativa e fotoperíodo de 12:12 horas. O meio de alimentação dos adultos foi constituído de uma mistura de leite em pó e açúcar em partes iguais e aproximadamente 10% de levedura de cerveja, fornecido em placa de Petri de 10cm de diâmetro. Água foi colocada na gaiola em frascos de vidro de 250ml, contendo em seu interior uma gase mais longa que o comprimento do frasco, onde as moscas podiam sugar por capilaridade.

Após 48 horas da coleta uma placa de Petri de 5cm de diâmetro contendo meio de estimulação foi introduzidoa na gaiola, para estimular as fêmeas a colocar os ovos. Foram

testados diferentes meios para estimulação das fêmeas maduras: uma mistura de carne moída fresca, sangue e água; fígado bovino em decomposição (deixado à temperatura ambiente por 72h) e uma mistura de carne moída processada por outras larvas e sangue fresco. As fêmeas depositaram seus ovos nas bordas da placa de Petri onde foram recuperados com o auxílio de um pincel.

Os ovos obtidos por esse método foram colocados em caixas de plástico teladas (20x15x8cm), contendo em seu interior serragem e carcaças de camundongos, e mantidos à 37°C. A eclosão das larvas ocorria aproximadamente 8 horas após a oviposição. As larvas permaneciam alimentando-se nas carcaças durante 5 dias em média e neste período foram adicionadas carcaças a cada 24 horas. No final deste período, as larvas cessavam a alimentação saindo da carcaça e migrando para a serragem onde ocorria a pupação. A serragem foi peneirada para a recuperação das pupas. Nesta fase, pupas provenientes de posturas de fêmeas diferentes da mesma população, foram misturadas obtendo-se um conjunto que representava as várias linhagens maternas da população original. As pupas foram então separadas do seguinte modo: uma parte foi colocada em frascos plásticos com tampa telada e mantidas à 37°C até a emergência dos adultos, que foram utilizados para a manutenção das linhagens no laboratório e para os testes de cruzamento. Outra parte foi colocada em tubos plásticos e congelada à -70°C para posterior utilização na análise de DNA mitocondrial.

3.2.2-Experimento de Cruzamento

Para a verificação da compatibilidade sexual entre as diferentes amostras populacionais foram realizados cruzamentos entre as populações Ca e RJ. Este experimento foi conduzido para se registrar a viabilidade do híbrido e o padrão de restrição do DNAm.

Aproximadamente 80 pupas da F1 dos adultos recém coletados no campo, foram individualizadas em tubos de ensaio contendo uma pequena quantidade de serragem, e mantidas à 37°C até a emergência dos adultos. Algumas horas após a emergência, os adultos foram separados por sexo e foram realizados os seguintes cruzamentos: 20 fêmeas de RJ e 20 machos de Ca foram colocados em uma gaiola de criação onde dieta para adultos e água foram fornecidos como descrito anteriormente. Cada gaiola de cruzamento foi sempre acompanhada de outra gaiola contendo o cruzamento recíproco (20 machos de RJ e 20 fêmeas de Ca). Para cada tipo de cruzamento foi feita uma réplica. Paralelamente, duas gaiolas controles com cada uma das populações parentais foram mantidas como controle dos padrões reprodutivos e para comparação dos indivíduos quanto ao haplótipo mitocondrial.

Em média, 10 dias após a emergência dos adultos era iniciada a estimulação das fêmeas maduras, obtendo-se ovos e pupas como descrito anteriormente. As pupas obtidas de cada cruzamento foram congeladas à -70°C para posterior análise do DNA mitocondrial, enquanto os adultos resultantes foram mantidos no laboratório para verificação da viabilidade e da fertilidade, que eram verificadas com a observação da produção da geração seguinte.

3.2.3-Análise do DNA mitocondrial.

Na análise do DNA mitocondrial foram empregadas várias técnicas moleculares que serão apresentadas e descritas por ítems.

3.2.3.1-Extração de Ácido Nucleico Total de *Cochliomyia macellaria*

Pupas de 3 dias que foram mantidas congeladas à -70°C foram retiradas dos casulos e separadas, individualmente, em 8 tubos Corex de 15ml, siliconizados, e contendo 1ml de tampão de homogenização (10mM TRIS, 60mM NaCl, 300mM sacarose, 10mM EDTA). Cada indivíduo foi homogeneizado manualmente com auxílio de um macerador de teflon. Em seguida foi adicionado 1ml de tampão de lise (300mM TRIS, 40mM SDS, 20mM EDTA) e 0.7% DEPC para eliminar proteínas. Os tubos foram então incubados no gelo por 15 minutos e adicionados a cada tubo 2ml de fenol equilibrado em tampão TRIS 2M pH 8.0. Em seguida, os tubos foram centrifugados à 3000g por 10 minutos e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo Corex de 15ml. Foram então adicionados 1ml de fenol e 1ml de solução clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). Cada tubo foi centrifugado à 3000g por 10 minutos sendo o sobrenadante transferido para um novo tubo, onde mais 2ml de solução clorofórmio:álcool isoamílico foram adicionados e repetiu-se a centrifugação já descrita anteriormente. Ao sobrenadante final foi adicionado 1.5ml de TE (10mM TRIS-Cl, 1mM EDTA), 150µl de NaOAc 3M, 9ml de etanol absoluto à -20°C e incubado à -70°C por 45 minutos. Após a incubação os tubos foram centrifugados à 11000g por 45 minutos à 4°C, e o "pellet" ressuspensionado em 1ml de TE, 50µl de NaOAc 3M e 2,75ml de

etanol absoluto à -20°C e precipitado novamente por 45 minutos à -70°C. Após uma segunda centrifugação, idêntica à anterior, o "pellet" de DNA foi seco a temperatura ambiente, ressuscitado em 200µl de TE e mantido em tubos eppendorf a -20°C para posterior análise com endonucleases de restrição.

3.2.3.2-Método para Isolamento Mitocondrial

Neste trabalho foi utilizada uma sonda heteróloga obtida do DNAMt de *Cochliomyia hominivorax* clonado anteriormente no nosso laboratório (Infante, 1994 e Infante & Azeredo-Espin, 1995). O seguinte procedimento foi conduzido para a produção da sonda e posterior clonagem.

Aproximadamente 8 gramas de pupas de *C. hominivorax* foram pesadas e distribuídas em 4 tubos (2g por tubo) de centrifuga de polialômero, mantidos no gelo. Adicionou-se a cada tubo 10ml de solução de MIM (0.22M manitol, 0.9mM EDTA, 1mM EGTA, 2mM HEPES e 70mM sacarose, pH 7.4). O conteúdo de cada tubo foi transferido separadamente para um tubo de vidro e homogeneizado com haste de teflon acoplada a um macerador elétrico. Em seguida completou-se o volume dos tubos para 50ml com solução de MIM e procedeu-se uma centrifugação em centrifuga refrigerada Beckman (4°C) modelo J2-21 a 900g durante 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para 4 tubos e incubado no gelo. Ao "pellet" dos quatro tubos originais foi acrescentado mais 50ml de MIM e centrifugado à 4°C e 900g por 10 minutos. Este sobrenadante foi transferido para 4 novos tubos, o volume dos 8 tubos foi completado para 50ml e centrifugados à 11000g e 4°C por 10 minutos. O "pellet" foi ressuscitado em 1ml de solução de

MIM e o conteúdo de 4 tubos foi transferido para um tubo de vidro e homogeneizado com um macerador de teflon manual, em seguida transferido para um tubo de centrifuga. O mesmo procedimento foi realizado com os outros 4 tubos. Os dois tubos resultantes foram centrifugados novamente à 900g e 4°C por 10 minutos, o sobrenadante foi transferido para dois tubos limpos e centrifugados à 11000g e 4°C por 10 minutos, obtendo-se no final um “pellet” rico em mitocôndrias. Este "pellet" foi ressuscitado em 1ml de MLB (mitochondrial lysis buffer) (50mM TRIS-Cl, 10mM EDTA, 0.1mM NaCl, pH 8.0) para lisar as mitocôndrias.

O conteúdo dos 2 tubos foi misturado e transferido para um novo tubo de centrifuga, onde foi adicionado SDS para uma concentração final de 1% e incubado por 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida adicionou-se 1/5 da concentração final de CsCl.

O CsCl foi dissolvido na solução já contendo o SDS e incubado no gelo por 15 minutos. Finalizando, a solução foi centrifugada a 11000g por 10 minutos para a obtenção de um sobrenadante final rico em DNA mitocondrial. Este foi transferido para um tubo de vidro e mantido à 4°C até a etapa de purificação do DNAm.

3.2.3.3-Purificação do DNA mitocondrial

3.2.3.3.1-Gradiente de Cloreto de Césio

O DNAm obtido através da técnica de MIM, foi transferido para tubos de vidro para a estimativa do volume e cálculo da densidade utilizando-se um refratômetro. Em função do índice

de refração e com o auxílio de uma tabela de densidade, obtém-se a quantidade de Cloreto de Césio necessária para a obtenção de um gradiente.

Foram adicionados 100µl de brometo de etídeo (10mg/ml) em cada tubo e o volume foi completado para 6,5ml final com tampão de CsCl (1,6g/ml de TE). A amostra foi transferida para tubos de ultracentrífuga (16x76mm) com auxílio de pipeta Pasteur e o volume do tubo foi totalmente completado com óleo mineral. Em seguida, a abertura dos tubos foi selada e estes foram centrifugados à 250000g por aproximadamente 20 horas, no rotor de ângulo fixo 80TI à 20°C. Após a centrifugação procedeu-se a retirada da banda correspondente ao DNAMt com auxílio de uma seringa de 1ml e de uma lâmpada de U.V. Para obtenção de DNAMt altamente purificado, foi realizado um segundo gradiente de CsCl. O DNAMt foi colocado cuidadosamente em tubos de ultracentrífuga de polialômero (13x51mm) com auxílio de pipeta Pasteur. O volume do tubo foi completado para 3,5ml com tampão de CsCl (1,6g/ml de TE) pH 8.0, brometo de etídeo e centrifugado à 200000g e 20°C no rotor Beckman VTI80 de ângulo fixo. A banda correspondente ao DNAMt foi retirada como descrito anteriormente e armazenada à -20°C.

3.2.3.3.2-Diálise do DNA mitocondrial

O DNAMt altamente purificado obtido através de dois gradientes de CsCl, foi submetido à extração do brometo de etídeo. Para isso acrescentou-se ao DNA, igual volume de Butanol-1 e em seguida retirou-se a fase superior da mistura, correspondente ao Butanol-1 + BET. Este procedimento foi repetido com a mesma amostra de DNAMt por no máximo 3 vezes.

Em seguida, para a remoção do CsCl, o DNAm foi dialisado utilizando-se filtros do tipo VM de 0.05µm (Millipore) que foram colocados sobre 20ml de tampão TE pH 7.4. Foram depositados, cuidadosamente sobre o filtro, 100µl da amostra de DNAm e deixados assim por 20 minutos. Em seguida o DNAm foi retirado dos filtros e armazenado em tubos limpos. Seguiu-se o procedimento anterior até que toda a amostra do DNAm tivesse sido dialisada.

Ao produto da diálise foi adicionado 10% de acetato de sódio 3M e o DNAm foi precipitado com etanol a -20°C, incubado a -70°C por 1 hora e centrifugado a 12000 rpm a 4°C por 30 minutos em microcentrífuga. O "pellet" final foi liofilizado e ressuspenso em 50µl de TE pH 8.0.

3.2.3.4-Produção de Sondas de DNA mitocondrial.

3.2.3.4.1- Marcação com Digoxigenina por "Random Primed" (Sonda Fria).

Durante a padronização da metodologia de hibridação foi testada uma técnica de marcação não radioativa denominada "Dig DNA labeling and detection kit nonradioative" (Boehringer-Mannheim Biochemica), segundo as recomendações do fabricante.

Nesta metodologia uma série de hexanucleotídeos, que servem como "primers", ligam-se aleatoriamente à molécula de DNAm previamente linearizada e denaturada. O fragmento Klenow da enzima DNA polimerase I promove a elongação do DNA através da atividade

polimerásica 5'→3' incorporando nucleotídeos à nova fita. Entre os nucleotídeos utilizados está o Dig-dUTP, dUTP marcado com Digoxigenina.

A reação de incorporação ocorre rapidamente e resulta na adição de um Dig-dUTP a cada 20-25 nucleotídeos. Assim, obtém-se o DNA marcado que é utilizado na hibridação das membranas de nylon contendo o DNAm.

A detecção da marcação pode ser feita de duas maneiras; 1- a membrana previamente hibridizada é incubada com uma solução de anticorpo anti-Digoxigenina conjugado com a enzima fosfatase alcalina; a detecção nesse método é quimioluminescente e utiliza o substrato da fosfatase alcalina, o AMPPD (nome comercial de: 3-(2'Spiroadamantane)-4-Methoxy-4-(3''Phosphoryloxy)3-(2'-Phenyl-1,2- Dioxetane) detectável por autoradiografia; ou 2- por reação colorida na própria membrana, previamente incubada com anticorpo anti-Digoxigenina + fosfatase alcalina, onde é adicionado um substrato da enzima (X-fosfato) e um corante que detecta o produto da reação, o NBT (Nitro Blue Tetrazolium).

Durante a padronização da técnica de sonda fria, o DNAm foi linearizado com a endonuclease *Hae*III. Em seguida fez-se a extração da enzima com fenol:clorofórmio e a denaturação do DNAm por 10 minutos a 100°C, interrompendo-se a reação no gelo.

Durante a reação de marcação incorporou-se ao DNAm (600ng) e ao DNA utilizado como padrão de tamanho (DNA de fago λ e ϕ X174), 2 μ l da mistura de hexanucleotídeos, 2 μ l de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP e Dig-dUTP) e 1 μ l de enzima Klenow para um volume final de 20 μ l. Após incubação a 37°C por 18 horas, a reação de marcação foi interrompida pela adição de 1 μ l de EDTA 2M pH 8.0 e o DNA foi precipitado com 2.5 μ l LiCl 4M e etanol (-20°C).

O precipitado foi incorporado à solução de hibridação (5xSSC, 0.1% sarcosyl, 0.02% SDS e 2% bloqueador + formamida) e esta solução mantida a -20°C para posterior utilização.

3.2.3.4.2-Marcação com ^{32}P através de kit de "Nick Translation"

(BRL):

A técnica de "Nick Translation" utiliza as enzimas DNaseI e a DNA polimeraseI obtida de *E. coli*.

A DNaseI hidrolisa ligações fosfodiéster aleatoriamente na dupla fita de DNA, criando vários pontos com extremidades 3'-OH livres. A DNAPoll adiciona nucleotídeos nestas extremidades 3' da dupla fita. Além disso, através da sua atividade exonucleásica 5'→3', esta enzima remove nucleotídeos da extremidade 5' do corte, substituindo por nucleotídeos marcados obtendo-se no final da reação DNAmT dupla fita marcado com ^{32}P (Sambrook *et al.*, 1989).

Para a marcação radioativa foi utilizado cerca de 1µg de DNAmT de *Cochliomyia hominivorax* purificado pela técnica de MIM ou obtido de material clonado (Infante, 1994). O Kit empregado foi o de "Nick Translation" da Bethesda Research Laboratories (BRL) de acordo com as recomendações do fabricante.

Marcou-se separadamente, o DNAmT de *C. hominivorax*, o DNA de fago λ digerido com *HindIII* e o DNA de fago ϕX174 digerido com *HaeIII*, estes dois últimos utilizados como marcadores de tamanho. Para cada reação de marcação do DNAmT foram utilizados: 25µl de DNAmT (~1µg), 5µl de αdCTP^{32} , 5µl de solução A_2 (que contém: dATP, dGTP e dTTP) e H_2O

destilada para um volume final de 45µl. Foram então adicionados 5µl de enzima (DNApolII/DNaseI) à reação e incubada a 15°C por 60 minutos. Para interromper a reação foram utilizados 5µl de 300mM Na₂ EDTA, pH 8.0.

3.2.3.5-Análise do DNA mitocondrial com endonucleases de restrição.

Para análise da variabilidade genética das populações de *Cochliomyia macellaria*, o DNAm_t desta espécie foi digerido com 13 endonucleases de restrição que reconhecem 4 ou 6 pares de bases: *Bam*HI (G/GATCC), *BCI*I (T/GATCA), *Cla*I (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), *Xba*I (T/CTAGA), *Xho*I (C/TCGAC).

As condições utilizadas na digestão enzimática foram as recomendadas pelos fornecedores Gibco-BRL e Pharmacia. As enzimas foram empregadas em concentração de 2.5U/ug de DNA mais 1/10 do volume total da reação de tampão de digestão. A reação foi interrompida pela adição de 5ul de uma solução contendo 25% de Ficoll, 0.5% de SDS, 0.1% de azul de bromofenol e 0.1% de xilenocianol.

Posteriormente as amostras foram aplicadas em gel de agarose em tampão TAE, e submetidas a uma voltagem de 20V e mantidas assim por aproximadamente 15 horas. A concentração do gel de agarose foi padronizada para 1% nos procedimentos de rotina. Porém, quando havia a necessidade de visualização de fragmentos menores que 1,0 kpb, a concentração do gel foi aumentada para cerca de 1,2% permitindo uma melhor separação

dos fragmentos menores. Os géis foram corados com brometo de etídeo e analisados em luz U.V. (Midrange/300nm).

Um total de 249 indivíduos de *C. macellaria* provenientes de três localidades do estado de São Paulo; Campinas-Cp (n = 35), Caraguatatuba-Ca (n = 64) e Botucatu- Bo (n = 37); uma do estado do Rio de Janeiro, Itaboraí-RJ (n = 50) e duas localidades do estado do Amazonas; Manaus-Ma (n = 30) e Porto Urucu-PU (n = 33), foram utilizados para a análise do DNAm com endonucleases de restrição.

3.2.3.6-“Southern Blot”

O DNA foi transferido para membrana de nylon segundo a técnica de Southern Blot (Southern, 1975). O gel foi primeiramente incubado em 250ml de uma solução de denaturação (50% NaOH 0.5M, 50% NaCl 1.5M) por 1 hora e em seguida foi incubado em 250ml de solução de neutralização (50% NaCl 1.5M, 50% TRIS 1M pH 7.4) por 2 horas. A transferência dos fragmentos de DNA contidos no gel foi feita para uma membrana de Nylon Hybond-N (Amersham) em 10xSSC (75mM NaCl, 7.5mM Na citrato, pH 7.0) por em média 17 horas. Em seguida o filtro foi lavado em 6xSSC por 5 minutos a temperatura ambiente e seco em estufa a 80°C, por duas horas, para fixação dos fragmentos de DNA.

3.2.3.7-Hibridação

Para a visualização dos fragmentos de DNA foi utilizada a técnica de hibridação, onde os fragmentos de DNA fixados na membrana foram hibridados com o DNA de uma sonda heteróloga previamente marcada com ^{32}P .

Incubou-se as membranas, por 2 horas, em solução de pré-hibridação, contendo 6xSSC, 0.5% de SDS, 5xDenhardt's (1% de Ficoll 400, 1% de Polivinilpirrolidona e 1% de Albumina Sérica Bovina fração V), 25% de Formamida deionizada e 1% de DNA de Esperma de Salmão. Em seguida, a solução de pré-hibridação foi removida e uma segunda solução, a de hibridação, contendo 6xSSC, 0.5% de SDS, 5xDenhardt's, 25% de formamida deionizada, 7mM de EDTA, 1% de DNA de Esperma de Salmão e DNA mitocondrial de *C. hominivorax* previamente marcado com ^{32}P , foi denaturada a 100°C por 10 minutos e adicionada às membranas. A incubação com a sonda heteróloga foi realizada a 37°C por 18 horas em forno de hibridação. Em seguida as membranas foram lavadas duas vezes, por 15 minutos, em uma solução contendo 2xSSC e 0.1% de SDS, a temperatura ambiente e mais duas vezes, por 30 minutos, em uma solução contendo 0.1xSSC e 0.1% de SDS a 55°C.

3.2.3.8-Detecção da Hibridação

Para a detecção dos fragmentos de restrição marcados, as membranas foram expostas a filme de Raio-X Kodak XAR-5 ou Hyperfilm-MP (Amersham) em cassete provido de intensificador. O tempo de exposição dependeu de algumas variáveis como tempo de uso da

sonda, quantidade de DNA, intensidade da marcação, e foi, em média, de 18 horas. Trascorrido esse tempo o filme foi revelado em Revelador-GBX Kodak e fixado em Fixador-GBX Kodak.

3.2.4-Análise da Divergência de Sequência do DNA mitocondrial Interpopulações.

Com os haplótipos obtidos a partir da análise com endonucleases de restrição, foi construída uma matriz de presença/ausência de sítio de restrição, designando a presença de sítio por 1 e a ausência por 0.

A proporção de fragmentos de restrição em comum para cada par de haplótipos foi calculada utilizando-se a fórmula de Nei & Li (1979): $F=2N_{xy}/(N_x+N_y)$, onde N_{xy} é o número de fragmentos em comum entre dois haplótipos, N_x e N_y são o número de fragmentos para cada haplótipo separadamente.

O índice de divergência entre as sequências nucleotídicas dos haplótipos, que é uma estimativa do número de substituições nucleotídicas por sitio, foi determinado utilizando-se a fórmula $\delta=-\ln F/r$ de Nei & Li (1979) onde, F é a proporção de fragmentos em comum entre os haplótipos e r é o número de nucleotídeos da sequência reconhecida por cada endonuclease utilizada. Os valores de F e δ foram utilizados para estabelecer uma estimativa do polimorfismo do DNAm_t de *Cochliomyia macellaria* nas várias populações analisadas.

3.2.5-Análise Cariotípica

3.2.5.1-Preparações Citológicas

Cromossomos mitóticos de gânglio nervoso de larvas de 3º estágio de *Cochliomyia macellaria* foram obtidos utilizando-se uma pequena modificação do método descrito por Azeredo-Espin (1987) para *Cochliomyia hominivorax*. As amostras analisadas foram Campinas-SP (Cp) e Porto Urucu-AM (PU). A análise de uma população de Caraguatatuba-SP (Ca) feita por Azeredo-Espin (1982) também foi considerada neste estudo, para fins comparativos.

A amostra Ca é de uma região litorânea e Cp do interior da região Sudeste. A amostra PU representa a região Norte do Brasil. A caracterização cariotípica foi conduzida nestas três populações sendo que as outras amostras (Bo, RJ e Ma), devido a problemas durante a manutenção das populações em condições de laboratório (ataque com formigas), não puderam ser analisadas. A amostragem é limitada, porém, permitiu de forma preliminar, caracterizar cariotipicamente diferentes regiões brasileiras proporcionando uma comparação da informação nuclear e citoplasmática (DNAMt).

Larvas no início de 3º estágio foram dissecadas em solução isotônica (solução salina 0.75%) para obtenção de gânglio nervoso. Estes foram transferidos para uma lâmina escavada contendo algumas gotas de solução fixadora (50% ácido acético, 50% metanol) e incubados nesta solução por 5 minutos. Em seguida os gânglios foram transferidos para outra lâmina escavada, limpa, contendo uma pequena gota de solução de ácido acético 60%. Com auxílio de estiletos de ponta fina os gânglios foram rapidamente desintegrados nesta solução e

ressuspensos várias vezes com auxílio de pipeta Pasteur (ponta de capilar de 10cm). Obteve-se com isso uma suspensão celular que foi transferida para lâminas de microscopia (26x76x1.1mm) limpas, previamente colocadas sobre uma placa aquecida a 45°C.

Para o estudo do cariótipo e a confecção dos ideogramas das diferentes populações de *C. macellaria*, as lâminas preparadas como descrito acima, foram coradas com Giemsa 4% por 20 minutos. Em seguida as lâminas foram diafanizadas em xilol por 10 minutos, secas completamente a temperatura ambiente e montadas com lamínulas (24x60mm) e Permount (Fisher).

3.2.5.2- Análise das lâminas

As lâminas foram analisadas em fotomicroscópio ZEISS e LEITZ (Dialux 20) utilizando-se a objetiva de 40x/0.65 Ph2. As metáfases mitóticas foram fotografadas em fotomicroscópio ZEISS utilizando-se a objetiva neofluar de imersão 100x/1.30 em contraste de fase, utilizando-se filme PAN COPEX (Agfa) ou T-MAX (Kodak).

Os negativos foram revelados em Microdol-X Kodak a 25°C e fixados (Kodak). As ampliações foram feitas em papel fotográfico Kodabrome F3 Kodak, reveladas com revelador Dektol Kodak e fixadas em fixador Kodak. Em seguida foram lavadas e secas a temperatura ambiente.

3.2.5.3- Análise morfométrica dos cromossomos

Os cromossomos de *C. macellaria* foram medidos em fotografias de 10 metáfases de indivíduos diferentes, representando as três localidades (Ca, Cp e PU), procurando-se para isso preparados onde todos os pares cromossômicos encontravam-se bem individualizados.

O comprimento de um braço cromossômico corresponde à distância que vai da parte mediana do centrômero até a parte distal do cromossomo. Utilizando-se tais medidas, as porcentagens do comprimento total do complemento (%CTC) e a proporção dos braços (Rb) foram calculadas pelas seguintes fórmulas:

$$\%CTC = \frac{\text{comprimento de um cromossomo} \times 100}{\text{comprimento total do complemento I-VI}}$$

$$Rb = \frac{\text{comprimento do braço longo}}{\text{comprimento do braço curto}}$$

Com estas medidas foram calculadas a média e o desvio padrão relativo às metáfases representativas das populações também utilizadas para construção de ideogramas representativos das localidades analisadas.

IV. RESULTADOS

4.1 - Método de coleta e criação de *Cochliomyia macellaria*.

A utilização de iscas atrativas diferentes durante as coletas, indicou que um maior número de adultos foi obtido quando rato ou peixe em decomposição foram utilizados como isca. Nas oviposições em condições de laboratório, obteve-se os melhores resultados empregando-se a mistura de carne processada por outras larvas e sangue fresco. Este tipo de estímulo foi eficiente e permitiu a recuperação de quantidades maiores de ovos durante o processo de manutenção das linhagens.

4.2 - Construção de sondas de DNA mitocondrial de *Cochliomyia hominivorax*

4.2.1 - DNA mitocondrial para produção e marcação de sondas

Para otimização da construção de sondas o DNAMt utilizado passou a ser obtido de clones plasmidiais de *C. hominivorax* (Infante, 1994; Infante & Azeredo-Espin, 1995). Além de facilitarem a obtenção do DNAMt em grandes quantidades (midipreparação), o material clonado reduziu o tempo e os custos do procedimento de purificação de DNAMt.

Foram testadas duas técnicas para marcação de sonda. Uma radioativa com ^{32}P por “nick translation” e uma não radioativa com dígoxigenina por “random primed”, como descrito no item (3.4.1) de material e Métodos.

A técnica de marcação a frio (não radioativa), foi testada devido a algumas desvantagens da técnica radioativa, como por exemplo; os riscos decorrentes do manuseio e exposição ao material radioativo, a perda de atividade da sonda por decaimento da radiação do ^{32}P em 15 a 20 dias e a necessidade de pelo menos $1\mu\text{g}$ de DNAm para confecção da sonda. Apesar das vantagens de um procedimento a frio, os resultados não se mostraram satisfatórios. Após a utilização da sonda, os filtros apresentavam um “back ground” bastante acentuado que não foi resolvido por adaptações no procedimento de lavagem das membranas. Este “back ground” dificultou muito a visualização dos fragmentos no autoradiograma, principalmente aqueles menores que 2.0 kpb. Por outro lado, a marcação por “nick translation” mostrou-se mais eficiente por ser mais rápida e por não causar “back ground” nos autoradiogramas. Embora apresentando algumas desvantagens a sonda de ^{32}P foi utilizada nos experimentos de rotina, onde a análise de um grande número de autoradiogramas era necessária. Com uma sonda chegou-se a hibridar cerca de 30 membranas, fato que acabou por reduzir o tempo gasto com o procedimento.

4.3 - Análise do DNA mitocondrial com endonucleases de restrição

As Tabelas I e II contém o número de sítios de reconhecimento e o tamanho de cada fragmento gerado pelas 13 endonucleases testadas. O tamanho total da molécula de DNAm desta espécie foi estimado em aproximadamente 16.5 Kpb.

Das 13 endonucleases utilizadas, quatro não possuem sítio de clivagem no DNAm_t de *C. macellaria* das diferentes localidades (*Bam*HI, *Kpn*I, *Pst*I e *Xba*I). Outras duas enzimas, *Hae*III e *Xho*I, possuem um único sítio de clivagem no DNAm_t de *C. macellaria* e apenas linearizam a molécula. As enzimas *Msp*I, *Bcl*I, *Cla*I e *Eco*RI geraram cada uma um único padrão de restrição não detectando polimorfismo de DNA e, ao todo, estas enzimas reconhecem 13 sítios de restrição no DNAm_t desta espécie (Tabela II).

No entanto, três enzimas (*Eco*RV, *Hind*III e *Pvu*II) foram consideradas marcadoras, sendo capazes de detectar variabilidade genética nas diferentes populações de *C. macellaria* analisadas. Foram obtidos cinco padrões de restrição para *Eco*RV, quatro para *Hind*III e dois padrões diferentes para *Pvu*II (Figura 2 e Tabela I).

Os padrões de restrição obtidos para as enzimas marcadoras foram designados por letras maiúsculas e em ordem alfabética de acordo com a ordem em que foram encontrados.

As três enzimas foram capazes de detectar padrões únicos, exclusivos de uma determinada localidade. Foram encontrados padrões exclusivos e diferentes para amostras de três localidades: padrão E de *Eco*RV e D de *Hind*III somente em Porto Urucu, padrão C de *Hind*III em Caraguatatuba e padrão B de *Pvu*II somente no Rio de Janeiro.

Tabela I: Tamanho aproximado em kilobases dos fragmentos gerados por digestão do DNA mitocondrial de *Cochliomyia macellaria* com as endonucleases marcadoras. As letras designam os padrões observados com cada enzima.

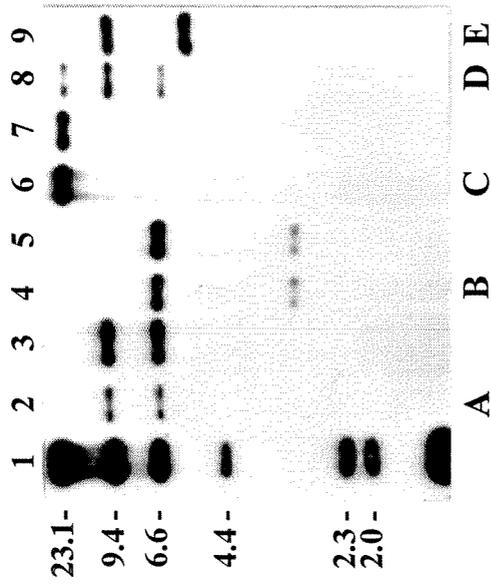
Endonucleases e Padrões	Número de Sítios	Tamanho do Fragmento (Kpb)	Tamanho Total (Kpb)
<i>EcoRV</i>			
A	2	10.5, 6.3	16.8
B	3	6.3, 6.3, 3.1	15.7
C	1	15.0	15.0
D*	1/2	15.0/10.5, 6.3	15.0/16.8
E	3	10.5, 5.0	15.5
<i>HindIII</i>			
A	4	5.3, 4.0, 3.4, 1.3	14.0
B	5	5.3, 3.4, 2.2, 1.5, 1.3	13.7
C	3	7.0, 4.0, 3.8	14.8
D	5	4.0, 3.4, 3.2, 2.3, 1.3	14.2
<i>PvuII</i>			
A	2	8.4, 7.8	16.2
B	3	8.4, 6.4	14.8

D* - indivíduos heteroplásmicos

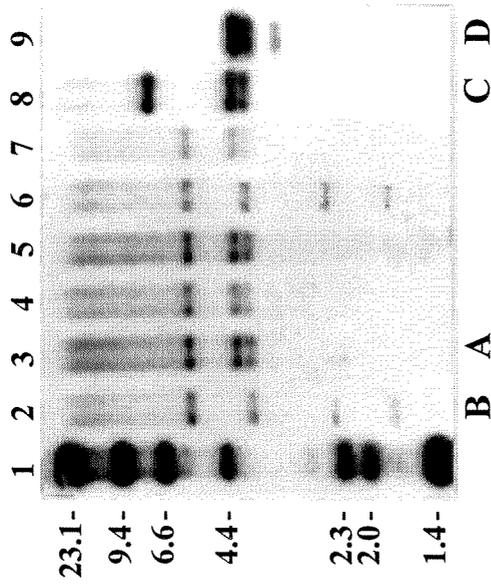
Tabela II: Número e tamanho (pb) dos fragmentos de restrição do DNA mitocondrial de *Cochliomyia macellaria* obtidos com endonucleases que apresentam um único padrão de restrição.

Endonuclease	Número de sítios	Tamanho dos Fragmentos
<i>BclI</i>	2	12.100 4.000
<i>ClaI</i>	3	9.700 5300 2.000
<i>EcoRI</i>	4	7.200 5.200 2.800 1.100
<i>HaeIII</i>	1	~16.500
<i>MspI</i>	2	12.200 5.700
<i>XhoI</i>	1	~16.500

2.1



2.2



2.3

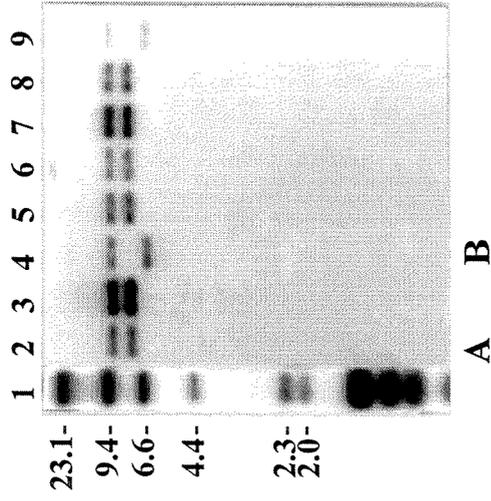


Figura 2: Autoradiogramas de Southern Blot mostrando DNAm_t de *Cochliomyia macellaria* das populações amostradas, digerido com *EcoRV*, *HindIII* e *PvuII*. Os padrões de tamanho utilizados são DNA de fago λ digerido com *HindIII* e DNA de ϕ X174 digerido com *HaeIII*. Os números à esquerda correspondem ao tamanho dos fragmentos de restrição em Kpb.

A estimativa da frequência de cada padrão nas diferentes localidades foi realizada e estão indicadas na Tabela III.

Com *EcoRV* os padrões mais frequentes foram os padrões A e C. Em Botucatu o padrão C foi observado em 100% dos indivíduos analisados e em Campinas o padrão A foi encontrado em todos os indivíduos amostrados. Para as localidades de Caraguatatuba e Rio de Janeiro o padrão A foi o mais frequente e para Manaus e Porto Urucu o mais frequente foi o padrão C.

Para a enzima *HindIII* o padrão A foi o mais frequente e o único observado em Botucatu, Campinas e Manaus. O padrão A de *PvuII* foi o único observado em todas as localidades, exceto para o Rio de Janeiro onde o padrão B também ocorre.

A amostra de Porto Urucu apresentou um maior número de padrões polimórficos. Nesta localidade foram encontrados quatro padrões para *EcoRV* (A, B, C e E), três para *HindIII* (A, B e D) e um para *PvuII* (A). As amostras de Caraguatatuba e do Rio de Janeiro também apresentaram um alto polimorfismo. Caraguatatuba apresenta quatro padrões diferentes para *EcoRV* (A, B, C e D) sendo que um deles, o padrão D, caracteriza indivíduos heteroplásmicos para sítio de restrição. Para *HindIII* observou-se dois padrões (A e C) e um para *PvuII* (A). As amostras do Rio de Janeiro também apresentam três padrões de *EcoRV* (A, C e D), dois de *HindIII* (A e B) e dois de *PvuII* (A e B) (Tabela III).

Tabela III: Frequência dos padrões para as enzimas marcadoras nas populações de *Cochliomyia macellaria* analisadas.

Endonuclease	Padrão	Localidade					
		Bo	Ca	Cp	PU	Ma	RJ
<i>EcoRV</i>	A	0.59	1.00	0.36	0.82		
	B	0.08		0.06			
	C	1.00	0.30	0.43	1.00	0.08	
	D*	0.01					0.10
	E			0.15			
<i>HindIII</i>	A	1.00	0.96	1.00	0.90	1.00	0.74
	B				0.03		0.26
	C		0.03				
	D				0.06		
<i>PvuII</i>	A	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.84
	B						0.16

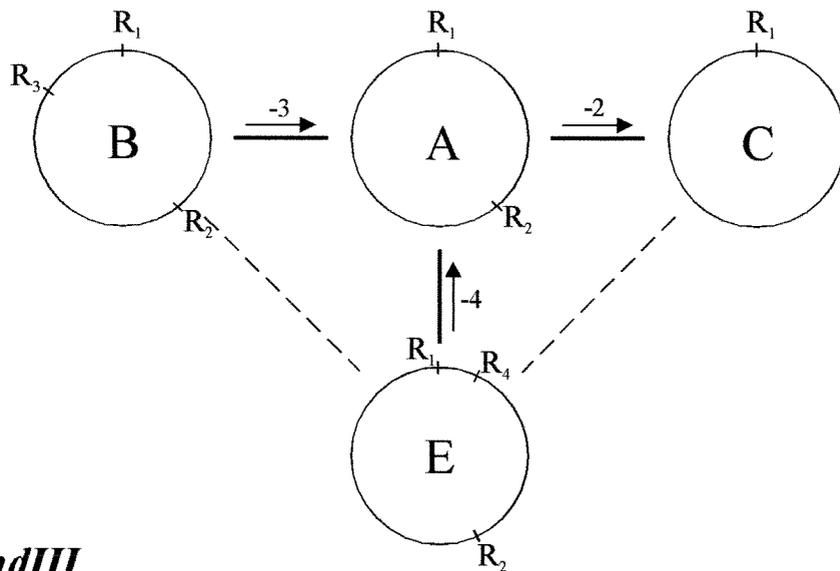
D* - indivíduos heteroplásmicos

Os indivíduos que apresentaram o padrão D de *EcoRV* foram considerados heteroplásmicos para sítio de restrição, possuindo linhagens celulares com diferentes padrões de restrição de DNAm (Figura 2). Neste caso, uma parte com padrão A e outra com padrão C para *EcoRV*. As possíveis causas da heteroplasmia serão consideradas posteriormente no item Discussão.

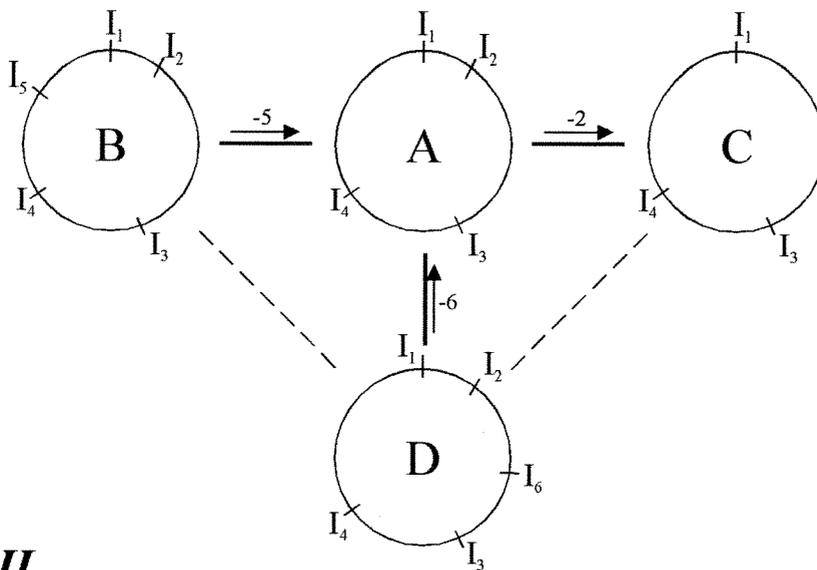
Os padrões de fragmentos para cada enzima marcadora estão relacionados uns aos outros pelo simples ganho ou perda de um único sítio. As séries de transformação que refletem os passos prováveis para interconversão dos padrões de restrição das enzimas estão representados na Figura 3. Os sítios de restrição foram localizados arbitrariamente na molécula de DNAm e foram representados por letras maiúsculas e números para facilitar a compreensão de perdas e ganhos de sítios. Assim, os sítios de restrição para *EcoRV* foram denominados de R₁ a R₄, os de *HindIII* de I₁ a I₆ e os de *PvuII* de P₁ a P₃ (Figura 3).

Os padrões de restrição do DNAm de *C. macellaria* para as enzimas marcadoras, foram combinados para produzir os haplótipos mitocondriais. A análise de 245 indivíduos com estas enzimas nas seis localidades, detectou a ocorrência de 11 haplótipos mitocondriais (Tabela IV).

EcoRV



HindIII



PvuII

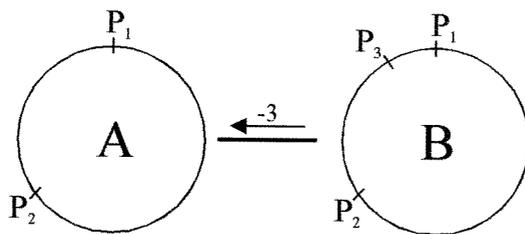


Figura 3: Padrão de interconversão dos sítios de restrição obtidos com as três endonucleases marcadoras. As linhas cheias indicam alteração de um sítio de restrição, as setas indicam a direção da perda do sítio. As linhas pontilhadas indicam alteração de mais de um sítio. A localização dos sítios é arbitrária. Os fragmentos R₄ e P₃ não foram visualizados nos autorradiogramas mas são sugeridos, baseado no tamanho da molécula de DNAm.

Tabela IV: Número de indivíduos por haplótipos mitocondriais obtidos com três endonucleases de restrição (*EcoRV*, *HindIII* e *PvuII*) nas populações analisadas de *Cochliomyia macellaria*.

Haplótipos Mitocondriais	Populações					
	Bo	Ca	Cp	PU	Ma	RJ
1- AAA		35	35	11		25
2- ABA				1		8
3- ACA		2				
4- BAA		5		2		
5- CAA	37	21		12	30	4
6- DAA		1				3
7- DBA						2
8- ABB						3
9- CDA				2		
10- EAA				5		
11- AAB						5
Total	37	64	35	33	30	50

Os haplótipos mais frequentes nas populações foram os haplótipos 1 (AAA) e 5 (CAA), encontrados em 43% e 42%, respectivamente, dos indivíduos analisados. O haplótipo 5 foi o mais amplamente distribuído ocorrendo em cinco das seis populações analisadas, seguido pelo haplótipo 1 que ocorre em quatro das seis populações. Os haplótipos 7 (DBA), 8 (ABB) e 11 (AAB) foram observados somente no Rio de Janeiro. O haplótipo 3 (ACA) é exclusivo de Caraguatatuba enquanto os haplótipos 9 (CDA) e 10 (EAA) são exclusivos das amostras de Porto Urucu (Figura 4).

As populações do Rio de Janeiro e de Porto Urucu apresentaram maior variabilidade do DNAm_t com sete haplótipos mitocondriais ocorrendo em RJ e seis em PU, sendo que três foram exclusivos para Rio de Janeiro (haplótipos 7, 8 e 11) e dois exclusivos de Porto Urucu (haplótipos 9 e 10). Em Caraguatatuba foram encontrados 5 haplótipos e em Botucatu, Campinas e Manaus encontrou-se somente um haplótipo (Figura 4).

Com nove dos onze haplótipos mitocondriais identificados foi construída uma matriz de presença/ausência de sítios de restrição. Os haplótipos 6 e 7 não foram incluídos na matriz por corresponderem a padrões que indicam heteroplasmia para sítio de restrição do DNAm_t. Na construção da matriz foram considerados todos os sítios de restrição das enzimas marcadoras.

Do total de sítios obtidos com as endonucleases marcadoras, 7 mostraram-se diagnósticos na detecção de variabilidade do DNAm_t desta espécie (Tabela V).

Com os dados obtidos da análise com endonucleases, calculou-se a proporção de fragmentos comuns (F) e a divergência de sequência nucleotídica (δ) de acordo com Nei

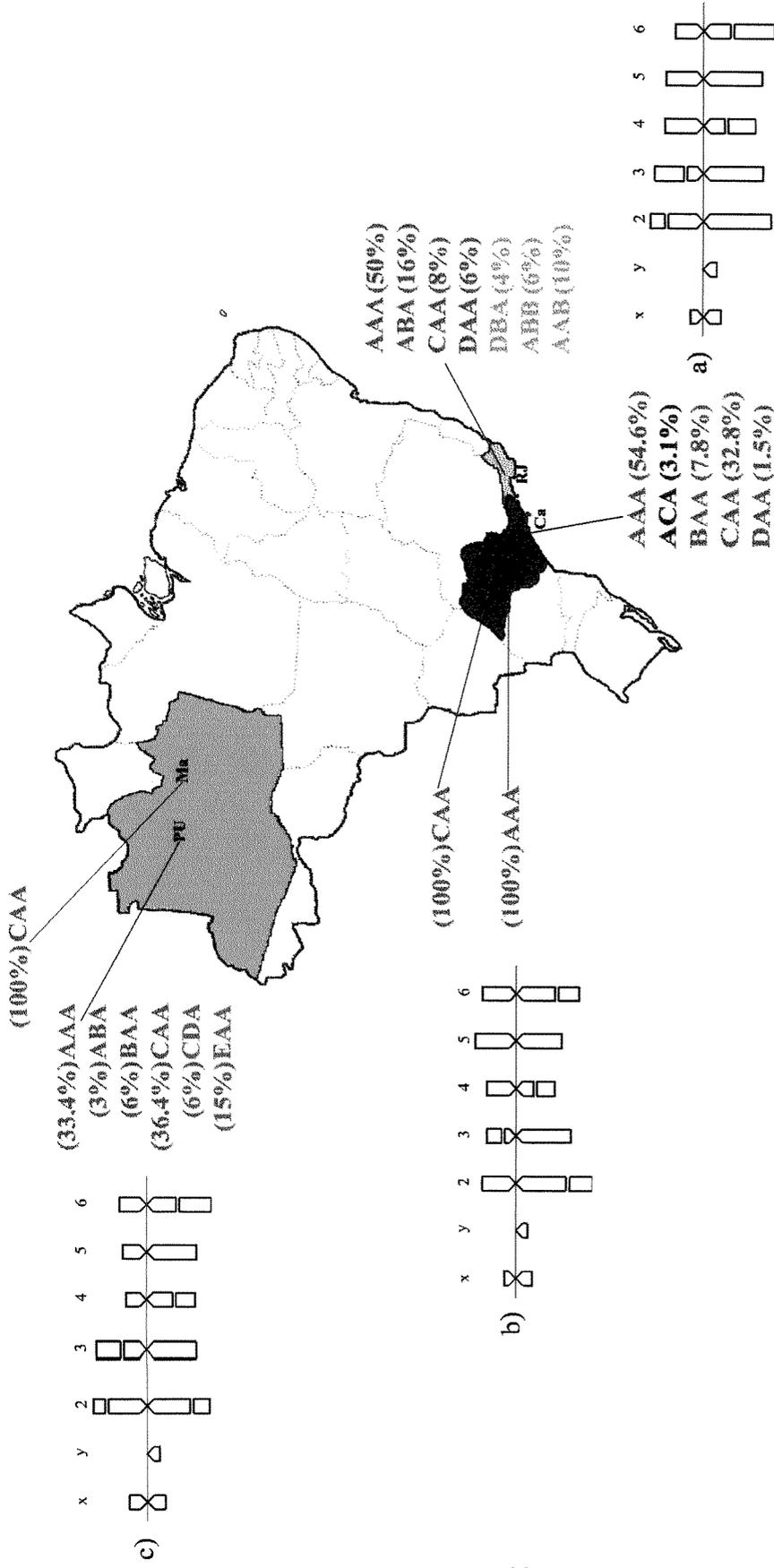


Figura 4: Localização das populações de *Cochliomyia macellaria* analisadas, distribuição e frequência dos haplótipos por localidade e ideogramas correspondentes. Os haplótipos indicados em verde, amarelo e vermelho são exclusivos das populações de PU, RJ e Ca, respectivamente. (Bo = Botucatu, Ca = Caraguatatuba, Cp = Campinas, Ma = Manaus, PU = Porto Urucu e RJ = Rio de Janeiro)

Tabela V: Matriz de presença/ausência de sítios de restrição de nove haplótipos mitocondriais obtidos com as três endonucleases marcadoras, indicando sete sítios diagnósticos para detectar variabilidade no genoma mitocondrial de *Cochliomyia macellaria*.

<i>EcoRV</i>	<i>HindIII</i>		<i>EcoRV</i>				<i>HindIII</i>		<i>PvuII</i>	
	<i>HindIII</i>	<i>PvuII</i>	R2	R3	R4	I2	I5	I6	P3	
1- A	A	A	1	0	0	1	0	0	0	
2- A	B	A	1	0	0	1	1	0	0	
3- A	C	A	1	0	0	0	0	0	0	
4- B	A	A	1	1	0	1	0	0	0	
5- C	A	A	0	0	0	1	0	0	0	
8- A	B	B	1	0	0	1	1	0	1	
9- C	D	A	0	0	0	1	0	1	0	
10- E	A	A	1	0	1	1	0	0	0	
11- A	A	B	1	0	0	1	0	0	1	

& Li (1979). Os valores de F e δ encontrados para *C. macellaria* estão indicados na Tabela VI. O valor de F variou de 0.947 até 0.987 e o valor de δ variou de 0.002 até 0.009.

As mudanças evolutivas nos sítios de restrição podem ser inferidas a partir dos diferentes padrões obtidos (Figura 3). Baseado na matriz de presença/ausência de sítios de restrição para 9 haplótipos mitocondriais e nos valores obtidos para a divergência de sequência (δ) do DNAm_t, foi elaborado um cladograma de parcimônia relacionando os 9 haplótipos, considerando o menor número de eventos mutacionais para ocorrer a interconversão de um padrão para outro (Figura 5).

No cladograma estão indicadas as prováveis relações e mudanças de sítio de restrição entre os haplótipos descritos para *C. macellaria*. Nesta análise não foram incluídos os haplótipos 6 e 7, por corresponderem a padrões que indicam heteroplasmia para sítio de restrição.

A Figura 5 indica que quase todos os haplótipos estão associados ao haplótipo 1, que está associado diretamente por somente uma mudança de sítio a outros cinco haplótipos (2, 3, 4, 5 e 10).

4.4 - Experimento de cruzamento.

Testes de cruzamento foram realizados para verificar-se a compatibilidade sexual entre diferentes populações de *C. macellaria*. Os seguintes cruzamentos foram montados, como descrito no item 2 de Material e Métodos:

Tabela VI: Divergência nucleotídica (δ) (acima da diagonal) entre 9 haplótipos mitocondriais de *Cochliomyia macellaria* baseado na proporção de fragmentos de restrição em comum (F) (abaixo da diagonal) (Nei and Li, 1979).

	1	2	3	4	5	8	9	10	11
1	-	0.002	0.003	0.002	0.003	0.004	0.005	0.002	0.002
2	0.986	-	0.005	0.004	0.005	0.002	0.002	0.004	0.004
3	0.985	0.972	-	0.005	0.005	0.007	0.007	0.005	0.004
4	0.986	0.974	0.972	-	0.005	0.007	0.007	0.004	0.004
5	0.986	0.972	0.970	0.972	-	0.007	0.002	0.005	0.004
8	0.973	0.987	0.959	0.961	0.959	-	0.009	0.007	0.002
9	0.972	0.986	0.957	0.959	0.986	0.947	-	0.007	0.007
10	0.986	0.973	0.972	0.973	0.972	0.961	0.959	-	0.004
11	0.986	0.973	0.972	0.973	0.972	0.986	0.959	0.974	-

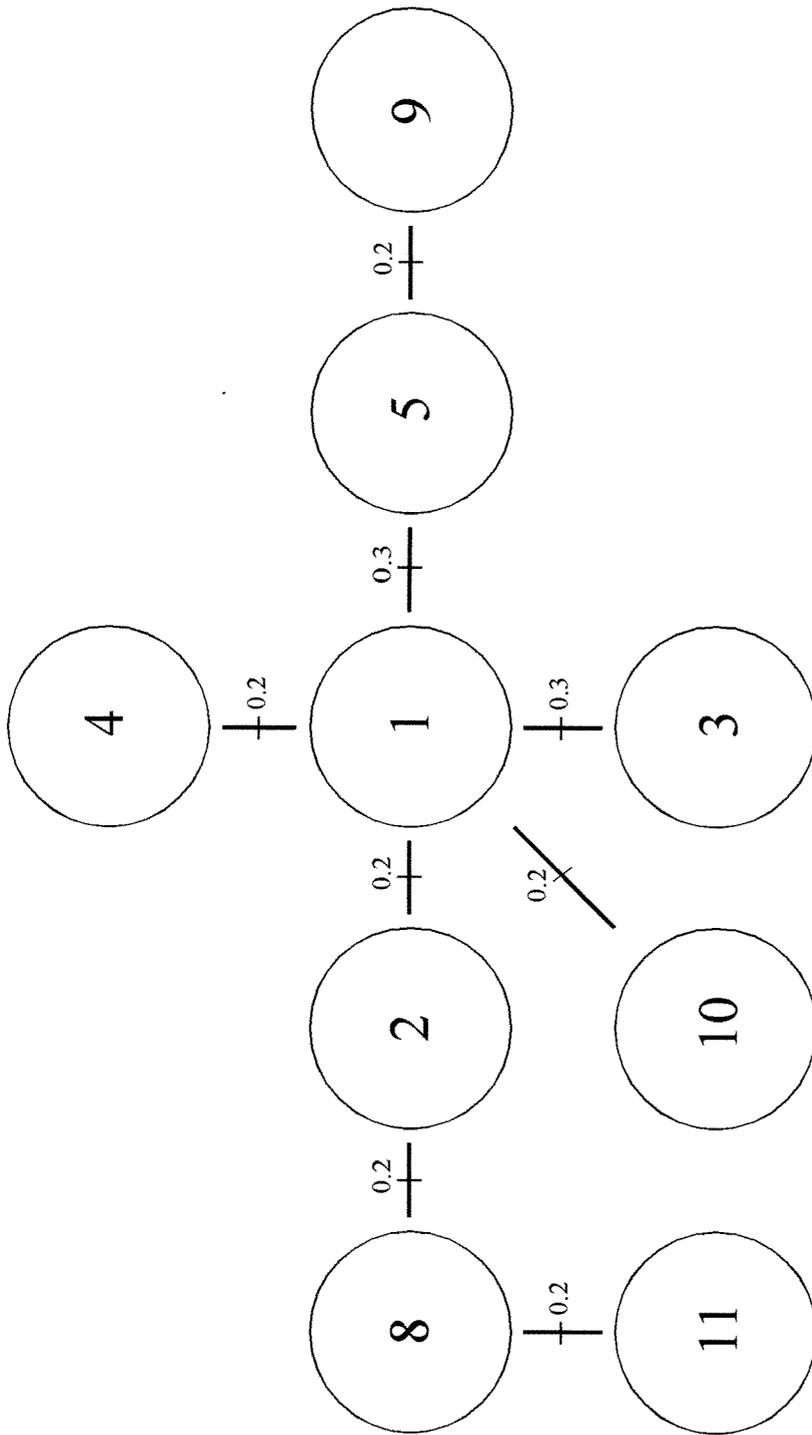


Figura 5: Cladograma obtido pelo método da parcimônia com os haplótipos mitocondriais de *Cochliomyia macellaria*. Os números acima das retas indicam os valores de divergência de sequência de sequência (δ) entre os haplótipos. Os haplótipos 6 e 7 foram excluídos do cladograma por representarem indivíduos com heteroplasma de restrição do DNAm.

1 - 20 machos Ca X 20 fêmeas RJ

2 - 20 machos RJ X 20 fêmeas Ca

As progênies resultantes dos cruzamentos acima foram viáveis e produziram progênies férteis. A progênie resultante do cruzamento 1 foi denominada de H-1 e a progênie do cruzamento 2 foi denominada H-2.

O DNA mitocondrial de pupas da F1 (total de 91 indivíduos), representando todas as progênies híbridas, foi digerido com 13 endonucleases de restrição como descrito em Material e Métodos.

Ao todo, 9 enzimas reconheceram sequências no DNAmT das progênies híbridas, tendo sido obtidos 23 sítios de clivagem no DNAmT dos indivíduos H-1 e 20 sítios para os indivíduos H-2. Das enzimas testadas, 4 não apresentaram sítios de reconhecimento no DNAmT das progênies híbridas, a saber: *Bam*HI, *Kpn*I, *Pst*I e *Xba*I. Outras duas reconheceram apenas um único sítio (*Hae*III e *Xho*I). As enzimas *Msp*I e *BCI*I, reconheceram 2 sítios no DNAmT; *Cla*I e *Pvu*II reconheceram 3 sítios; *Eco*RI e *Eco*RV 4 sítios e *Hind*III 6 sítios no DNAmT (Tabela II).

Três enzimas foram capazes de detectar variabilidade no DNAmT das progênies. A análise do DNAmT dos indivíduos de H-1 revelou 2 padrões de restrição para *Eco*RV (padrões A e D), dois padrões para *Hind*III (padrões A e B) e dois para *Pvu*II (padrões A e B). Os indivíduos de H-2 analisados apresentaram um único padrão para *Eco*RV (padrão C), para *Hind*III (padrão A) e para *Pvu*II (padrão A) (Tabela VII e Figura 2). A combinação dos padrões de restrição resultou em 4 haplótipos mitocondriais para H-1 (haplótipos 1, 2, 6 e 8) e somente um haplótipo para H-2 (haplótipo 5) (Tabela VIII).

Tabela VII: Frequência dos padrões para as enzimas marcadoras nas populações de *Cochliomyia macellaria* analisadas.

Endonuclease	Padrão	Localidade			
		Ca	RJ	H-1	H-2
<i>EcoRV</i>	A	0.59	0.82	0.95	
	B	0.08			
	C	0.30	0.08		1.00
	D*	0.01	0.10	0.04	
	E				
<i>HindIII</i>	A	0.96	0.74	0.50	1.00
	B		0.26	0.50	
	C	0.03			
	D				
<i>PvuII</i>	A	1.00	0.84	0.63	1.00
	B		0.16	0.36	

D* - indivíduos heteroplásmicos

Tabela VIII: Número de indivíduos por haplótipos mitocondriais obtidos com três endonucleases de restrição (*EcoRV*, *HindIII*, *PvuII*) nas populações analisadas de *Cochliomyia macellaria*.

Haplótipos Mitocondriais	Populações			
	Ca	RJ	H-1	H-2
1- AAA	35	25	20	
2- ABA		8	6	
3- ACA	2			
4- BAA	5			
5- CAA	21	4		47
6- DAA	1	3	2	
7- DBA		2		
8- ABB		3	16	
9- CDA				
10-EAA				
11-AAB		5		
Total	64	50	44	47

Entre os indivíduos de H-1 foram observados dois com o haplótipo 6. O padrão D para *EcoRV*, que constitui o haplótipo 6 é característico de indivíduos heteroplásmicos para sítio de restrição como descrito anteriormente .

4.5 - Cariótipo de *Cochliomyia macellaria*

4.5.1 - Autossomos

Em *C. macellaria* de Ca (Azeredo-Espin, 1982), Cp e PU os pares de autossomos 2, 3, 4 e 5 são metacêntricos e o par autossômico 6 é o único submetacêntrico, apresentando um valor de relação de braços de 3,0 (Figura 6 e Tabela IX).

Para Ca foi descrito por Azeredo-Espin (1982) uma constrição na região distal do braço curto do par 2, na região proximal do braço curto do par 3, e outra na região proximal do braço longo do par 4 (ideograma a, Figura 4). Também nesta população observa-se, ocasionalmente, uma constrição na região proximal do braço longo do par 6.

O cariótipo da amostra populacional de Cp (ideograma b, Figura 4) apresenta constrição na região distal do braço longo do par 2, na região proximal do braço curto do par 3, na região proximal do braço longo do par 4, na região distal do braço longo do par 6 (Figura 6). Para a amostra de PU (ideograma c, Figura 4) observou-se duas constrições no par 2, uma na região distal do braço longo e outra na região distal do braço curto; uma na região proximal do braço curto do par 3, na região proximal do braço longo do par 4 e na região proximal do braço longo do par 6 (Figura 6).

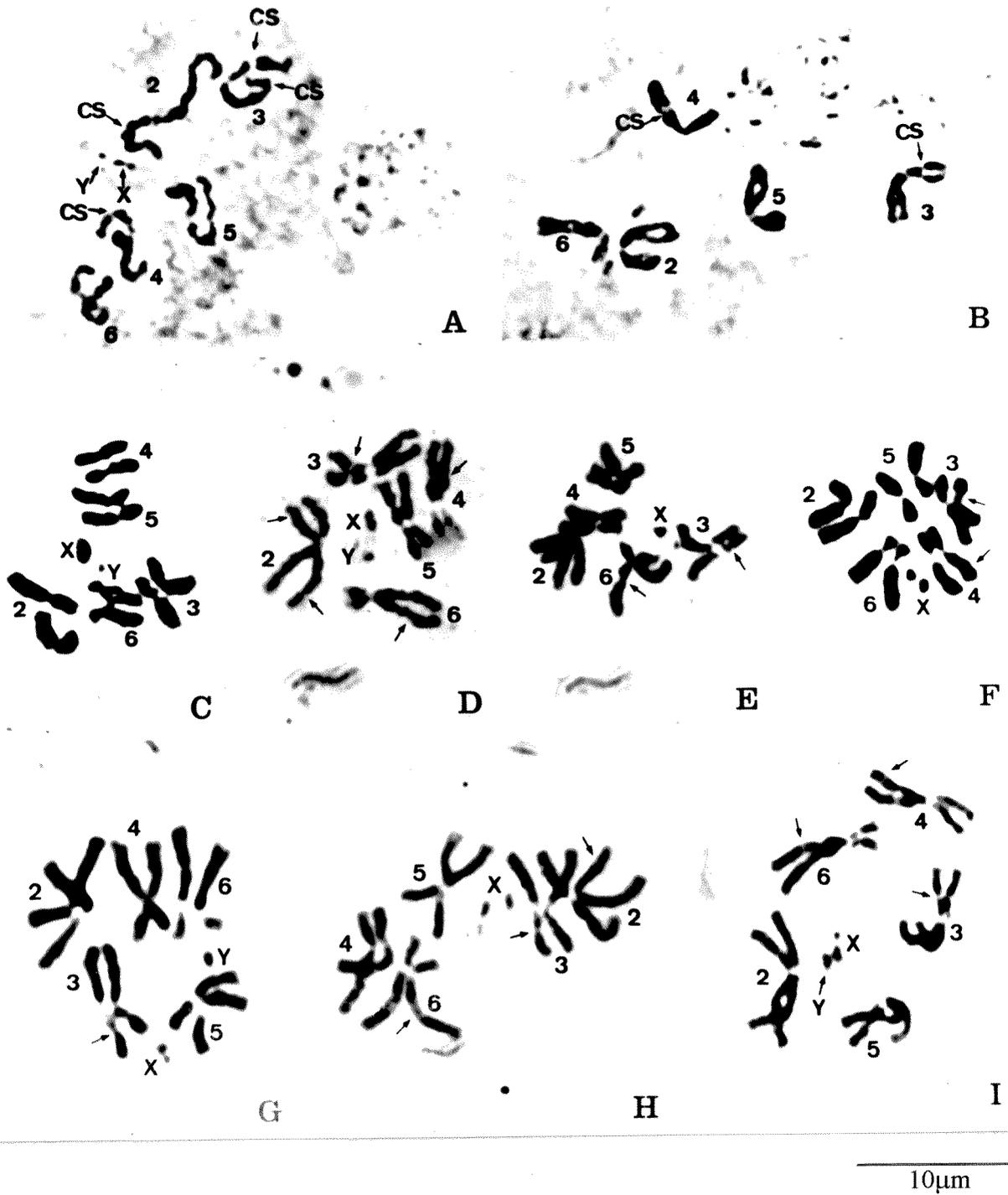


Figura 6: Cromossomos mitóticos de gânglios nervosos de larvas, corados com Giemsa nas populações de Caraguatatuba (A, B e C) (Azeredo-Espin, 1982), Porto Urucu (D, E e F) e Campinas (G, H e I). Nas fotos A e B as constrições secundárias estão indicadas por CS e nas demais fotos por setas.

Tabela IX: Relação de braços dos pares de cromossomos de três populações de *Cochliomyia macellaria* (média e desvio padrão).

POPULAÇÕES	PARES DE CROMOSSOMOS						
	X	Y	2	3	4	5	6
Caraguatatuba (Ca)	1.40 (0.94)	1.50 (0.58)	1.40 (0.18)	1.32 (0.16)	1.48 (0.24)	1.70 (0.43)	2.92 (0.80)
Campinas (Cp)	1.60 (0.40)	1.70 (0.0)	1.20 (0.29)	1.42 (0.11)	1.96 (0.24)	1.75 (0.21)	3.17 (0.60)
Porto Urucu (PU)	1.00 (0.0)	1.40 (0.14)	1.95 (0.22)	1.45 (0.63)	1.61 (0.34)	1.46 (0.04)	3.20 (0.28)
Tipos de Cromossomos	m	t	m	m	m	m	sm

m = metacêntrico / t = centrômero na região terminal / sm = submetacêntrico

4.5.2 - Cromossomos Sexuais

O cromossomo X de *C. macellaria* nas três amostras populacionais analisadas (Ca, Cp e PU), é metacêntrico. Porém, a relação de braços na amostra de PU é 1,0 , diferindo de Ca e Cp onde o cromossomo X apresenta braços com comprimentos desiguais e relação de braço de 1,4 e 1,6 , respectivamente. Tal cromossomo é menor que o menor par autossômico (número 4), apresentando um comprimento relativo ao genoma de 3,5% (Tabela X).

Em Ca, Cp e PU o cromossomo Y apresenta o centrômero na região terminal e caracteriza-se por ser muito pequeno, apresentando-se bem condensado nas fotomicrografias e muitas vezes difícil de ser visualizado.

Tabela X: Comprimento relativo dos pares de cromossomos, expressos em porcentagem do comprimento total do complemento (%CTC) de três populações brasileiras de *Cochliomyia macellaria* (média e desvio padrão).

POPULAÇÕES	PARES DE CROMOSSOMOS (%CTC)						MÉDIA DO COMPRIMENTO TOTAL DO COMPLEMENTO EM μm	
	X	Y	2	3	4	5		6
Caraguatatuba (Ca)	3.22 (0.80)	1.58 (0.51)	23.38 (0.70)	20.34 (0.59)	16.07 (0.84)	18.16 (0.65)	18.80 (0.60)	25.3
Campinas (Cp)	4.95 (0.12)	1.70 (0.0)	23.58 (0.05)	17.50 (0.19)	16.19 (3.20)	17.85 (0.28)	20.10 (1.06)	21.8
Porto Urucu (PU)	3.57 (0.0)	2.00 (0.49)	23.66 (1.80)	20.08 (1.80)	17.40 (0.60)	16.50 (1.80)	18.74 (1.70)	24.3
Tipo de Cromossomo	m	t	m	m	m	m	sm	sm

m = metacêntrico / t = centrômero na região terminal / sm = submetacêntrico

V. DISCUSSÃO

Nas últimas duas décadas, a análise do DNA mitocondrial (DNAm_t) demonstrou ser uma metodologia importante para estudos evolutivos de animais e vegetais. Vários estudos utilizaram o DNAm_t para analisar estrutura de populações e fluxo gênico, biogeografia, relações filogenéticas, etc (revisão em Wilson *et al.*, 1985; Moritz *et al.*, 1987). Intraespecificamente, tem se detectado extenso polimorfismo mitocondrial em vários grupos de animais e com um alto grau de diferenciação geográfica (Avice *et al.*, 1987).

É comum encontrar um alto grau de polimorfismo intraespecífico associado com diferenciação geográfica marcante. Quando uma espécie apresenta baixa diversidade no DNAm_t geralmente esta é interpretada como sendo decorrente de dispersão frequente de fêmeas ou afunilamentos recentes na espécie. Esta interpretação assume que os marcadores genéticos de DNAm_t são neutros e que a reversão de mutações é desprezível (revisão em Moritz *et al.*, 1987). Além disso, de acordo com Moritz *et al.* (1987) deve-se considerar também a extinção ao acaso de linhagens maternas como uma fonte potencial de erros interpretativos com relação à baixa diversidade do DNAm_t.

No entanto, quando polimorfismo de DNA é detectado, pode-se inferir relações de parentesco entre linhagens maternas dentro de populações de uma espécie. Porém, de acordo com Moritz *et al.* (1987), esta abordagem é melhor aplicada em demes isolados uma vez que a migração de indivíduos pode gerar falsas indicações de parentesco.

A técnica de RFLP utilizada para analisar a variabilidade do DNAMt, mostrou ser bastante eficiente em revelar informações sobre a extensão das diferenças de sequência do DNAMt intra e inter populações de *C. macellaria*. Embora tais informações não se refiram à evolução de sequências específicas, é possível realizar algumas inferências sobre a estrutura populacional de *C. macellaria*.

A ocorrência de haplótipos mitocondriais únicos em determinadas localidades (Tabela IV), fornece fortes evidências de que existem diferentes linhagens maternas responsáveis pela manutenção das populações locais como por exemplo, Ca, RJ e MA.

Quando se compara a frequência dos haplótipos, considerando-se as populações como amostras regionais, isto é, região Sudeste (Botucatu, Campinas, Caraguatatuba e Rio de Janeiro) e região Norte (Manaus e Porto Urucu), fica evidente a predominância de haplótipos diferentes nas duas regiões (Figura 4). Na região Norte, o haplótipo 5 (CAA) é o mais frequente, enquanto no Sudeste, o haplótipo mais frequente é o 1 (AAA). Isso reforça a idéia de linhagens maternas diferentes contribuindo para a manutenção das populações locais.

Neste trabalho, são sugeridas algumas hipóteses para explicar a origem das linhagens mitocondriais que ocorrem em mais de uma população. Uma alternativa seria a origem comum destes haplótipos, a partir de um haplótipo “ancestral”. Outra possibilidade seria a de que estes haplótipos tenham se originado de linhagens maternas distintas, através de eventos mutacionais independentes. Baseado no cladograma obtido (Figura 6), a interpretação mais provável seria a de uma origem comum destes haplótipos, embora

somente com a análise de um maior número de populações, estabelecimento de transectos e de outros parâmetros biológicos poder-se-á reforçar esta interpretação.

Nas amostras de população de Botucatu, Campinas e Manaus, detectou-se a presença de apenas um haplótipo mitocondrial em cada uma das localidades. Provavelmente os haplótipos observados nestas localidades estejam fixados (Tabela II), indicando a presença de uma única linhagem materna de *C. macellaria* nestes locais. A ausência de variabilidade genética do DNAmT nestas três populações pode ser explicada como resultante de efeito de fundador, evento que resulta em quebra brusca dos níveis de variabilidade. Possivelmente a diminuição do tamanho efetivo da população de *C. macellaria* nestes locais tenha ocorrido devido à competição interespecífica e tal fato favorece a fixação de um haplótipo, provavelmente o mais frequente nas fêmeas. A ocorrência de espécies de *Chrysomya* em altas frequências nestas localidades, poderia estar gerando uma forte pressão de competição sobre as populações de *C. macellaria* ocasionando um afinilamento populacional que resultaria na ocorrência dos níveis reduzidos de variabilidade observados. Porém, seriam necessários estudos comparativos sobre dinâmica e estrutura populacionais, associadas à estimativas de variabilidade genética de um maior número de amostras de *C. macellaria*, bem como de outras espécies de califorídeos generalistas, para que se possa estabelecer as possíveis relações entre estas espécies e a variabilidade genética.

Em Caraguatatuba e Rio de Janeiro, apesar da presença e provável interferência, das espécies de *Chrysomya* e da redução populacional provavelmente ocasionada pela competição, foi detectada grande variabilidade genética no DNAmT. Essas duas

localidades caracterizam-se por ser litorâneas e apresentar regiões de Mata Atlântica muito próximas aos locais de coleta (pastagens em Caraguatatuba e depósito de lixo urbano no Rio de Janeiro). *C. macellaria* é considerada uma espécie hemisinantrópica, isto é, tem preferência por áreas habitadas e não habitadas, podendo ser encontrada tanto em regiões de mata quanto em locais habitados (Ferreira, 1983). Ao contrário, muitas espécies de *Chrysomya* têm preferência por áreas habitadas não ocorrendo em áreas desabitadas como as matas. Este quadro sugere a possibilidade de estar ocorrendo a migração de *C. macellaria* de regiões habitadas para regiões de mata dentro de uma mesma localidade, como estratégia para evitar a forte competição com as espécies de *Chrysomya* (Madeira, comunicação pessoal). Essa situação poderia explicar a manutenção da variabilidade genética apesar da forte competição interespecífica. Outra interpretação seria a ocorrência de múltiplas introduções de fêmeas de *C. macellaria*, com diferentes haplótipos mitocondriais, oriundas de outras localidades e regiões do Brasil. Evidências experimentais demonstram a capacidade de dispersão de espécies da família Calliphoridae (Krafsur *et al.*, 1979; Baungartner & Greenberg, 1984; Laurence, 1986) que pode se dar tanto através do vôo como através de atividade humana, onde casos de transporte de moscas via aviões, navios, etc, estão bem documentados (Guimarães *et al.*, 1979; Gagné, 1981; Laurence, 1986). Caraguatatuba está situada em uma região de intensa atividade pecuária onde o fluxo de animais vivos é constante e atividades relacionadas ao abate e comercialização de gado também é bastante comum. Além disso, os locais de coleta normalmente ficavam próximos a carcaças de animais e à material orgânico em decomposição (lixo urbano). No Rio de Janeiro a atividade pecuária não é tão intensa

quanto em Ca, mas os locais de coleta ficavam próximos a depósitos de lixo urbano, ambiente favorável a reprodução de varejeiras e que, provavelmente, apresentam uma densidade populacional maior do que outros pontos da mesma localidade.

Pode-se então sugerir, que a manutenção da variabilidade genética nestas localidades esteja ocorrendo mais pela interação dos vários fatores descritos do que pela ação de um deles isoladamente. Contudo, estudos mais detalhados sobre a dinâmica populacional e comportamento desta espécie, em localidades com vegetação nativa próximas à áreas habitadas, se fazem necessários para que a variabilidade genética seja melhor compreendida.

Em Porto Urucu as condições ambientais diferem muito das outras localidades analisadas. É uma região distante de grandes centros urbanos, com pouca influência de atividade humana e com a presença de áreas de floresta tropical conservadas. Outra característica muito importante de Porto Urucu é a ausência, até o momento, de espécies do gênero *Chrysomya* (Paraluppi, comunicação pessoal). A ausência das espécies introduzidas permitiria que *C. macellaria* encontre neste local um ambiente livre de pressão de competição, fator que favorece a sua ocorrência em grande quantidade permitindo a manutenção de variabilidade. Este conjunto de fatores pode estar contribuindo para a manutenção da variabilidade genética encontrada na população desta localidade além do fato de não se poder descartar a ocorrência de fluxo gênico de outras localidades para a região de PU.

Embora algumas inferências sobre os níveis atuais de fluxo gênico e sobre a estrutura populacional desta espécie possam ser feitas, deve-se considerar que, apesar do

grande número de indivíduos analisados e da amostragem compreender seis localidades brasileiras, nossas amostras ainda assim são limitadas quando se considera a ampla distribuição desta espécie no território brasileiro. Torna-se prematuro, portanto, fazer afirmações sobre a dinâmica populacional de *C. macellaria*, que será melhor esclarecida com uma futura ampliação das amostras para diferentes regiões brasileiras e com o estabelecimento de transectos inter regiões, além da análise de outros parâmetros biológicos.

Com relação ao genoma mitocondrial, a análise com a enzima *EcoRV* produziu evidências de heteroplasmia de sítio de restrição em 6 indivíduos de Ca e RJ. Como já descrito na Introdução, os casos de heteroplasmia para variantes de tamanho são considerados relativamente mais comuns que os casos de heteroplasmia de sítio de restrição. Na verdade os casos de heteroplasmia de restrição parecem ser considerados raros muito mais devido a alguns fatores que afetam a análise com enzimas de restrição, do que devido à raridade do fenômeno propriamente dito (Avisé & Lansman, 1983; Bentzen *et al.*, 1988). Em alguns casos, bandas submolares são observadas nos géis de análise de restrição do DNAm. Estas são comumente atribuídas aos seguintes fatores: 1- digestões incompletas pela enzima, presumivelmente resultantes da provável perda parcial da atividade da enzima de restrição, 2- baixa concentração da enzima em relação ao DNAm, 3- pouco tempo de incubação, 4- diferenças nas cinéticas dos sítios de clivagem (Avisé & Lansman, 1983). Tais bandas extras, quando submetidas a uma nova digestão, desaparecem. Contudo, na maioria das vezes, casos verdadeiros de heterogeneidade de seqüência (heteroplasmia), não são distinguidos das digestões incompletas, sendo tratados

como tal. Além disso, exemplos de heteroplasma envolvendo um único sítio de restrição são mais difíceis de serem detectados que aqueles associados com polimorfismos de tamanho. Isso ocorre porque heteroplasma para sítio de restrição é detectada apenas por uma única enzima de restrição, enquanto a heteroplasma de tamanho de fragmentos de restrição pode ser detectada e comprovada com várias enzimas (Bentzen *et al.*, 1988). Essas ambiguidades também reforçam o fato de que evidências de heteroplasma para o DNAm, tenham que ser tratadas com cautela para evitar-se erros interpretativos.

No presente trabalho, foram consideradas as possibilidades de ocorrência de digestão parcial ou contaminação na análise do padrão heteroplásmico de *EcoRV* ("D"). A reprodutibilidade do padrão "D" em condições de excesso de enzima e longos períodos de incubação (5 - 8 h), descartou a hipótese de digestão parcial. Por outro lado, se a heteroplasma tivesse sido causada por contaminação com DNAm de indivíduos diferentes, os padrões para as outras endonucleases, também poderiam detectar heterogeneidade para qualquer sítio para os quais as moscas diferissem. Nenhum dos indivíduos que foram considerados heteroplásmicos para sítio de restrição, apresentaram heterogeneidade de sítio para outras enzimas. Este fato descartou a possibilidade de contaminação.

A heteroplasma observada em *C. macellaria* pode ter sido resultante de dois fatores: 1- contribuição paterna; 2- segregação incompleta de formas variantes dos DNAm envolvidos. A segunda possibilidade parece ser mais provável para esta espécie, uma vez que, através da análise do DNAm dos descendentes dos cruzamentos efetuados, foi observado que o DNAm é herdado através da linhagem materna (Valle & Azeredo-

Espin, 1995). Isso fica claro, por exemplo, quando se analisa os haplótipos obtidos para os indivíduos de H-1 (machos Ca x fêmeas RJ). O haplótipo 8 (ABB) é exclusivo das populações de onde originaram-se as fêmeas para o cruzamento (RJ), este mesmo haplótipo apareceu em 36% dos indivíduos de H-1 analisados.

Para analisar a relação entre cada um dos padrões obtidos com as enzimas marcadoras no DNAm_t, foram estabelecidos os eventos de ganho e/ou perda de sítios de restrição entre eles. Para isso utilizou-se o critério da parcimônia onde considera-se o menor número possível de mudanças para a interconversão de um padrão para outro, dando-se prioridade para as perdas de sítio. Segundo Templeton (1983), no processo evolutivo a perda de sítios de restrição supera o ganho de sítios em frequência.

A Figura 3 mostra os prováveis passos para interconversão dos padrões de *C. macellaria* para as enzimas marcadoras e as possíveis perdas de sítio de restrição estão indicadas por setas. Para *EcoRV* o padrão A pode ter surgido pela perda do sítio R₃ do padrão B originando um fragmento de 10,1 Kpb. Por outro lado, o padrão A pode ter aparecido pela perda do sítio R₄ do padrão E originando um fragmento de 6,6 Kpb. O padrão C pode ter se originado pela perda do sítio R₂, permanecendo apenas o sítio R₁ que lineariza a molécula de DNAm_t. O fragmento de 1,0 Kpb do padrão E (entre os sítios R₂ e R₄) não é visível nos autoradiogramas.

O padrão C de *HindIII* pode ter se originado pela perda do sítio I₂ do padrão A formando um fragmento de 7,0 Kpb. O padrão A, por sua vez, pode ter surgido de duas maneiras, pela perda do sítio I₅ do padrão B ou pela perda do sítio I₆ do padrão D, formando os fragmentos de 4,1 Kpb e 5,5 Kpb respectivamente.

Para *PvuII* os dois padrões relacionam-se pela perda do sítio P₃. O padrão B pode ter originado o padrão A, gerando um fragmento de 7,8 Kpb. Como no caso do padrão E de *EcoRV*, o fragmento de 1,0 Kpb do padrão B de *PvuII* não é visível nos autorradiogramas.

O tamanho do DNAm_t de *C. macellaria* foi estimado em 16,5 Kpb, sem variação no comprimento da molécula. Na Tabela I são mostrados os tamanhos de cada fragmento obtido com as enzimas marcadoras e, baseado nestes dados, inferiu-se o tamanho total da molécula de DNAm_t. Para o padrão A de *EcoRV*, por exemplo, obteve-se uma somatória de 16,8 Kpb; porém, para o padrão B a somatória é de 15,7 Kpb. Segundo dados da literatura, o tamanho da molécula de DNAm_t de outras espécies de Calliphoridae assemelham-se em tamanho; *C. hominivorax* com 16,3 Kpb (Roehrdanz & Johnson, 1988; Roehrdanz, 1989; Infante & Azeredo-Espin, 1995) e *Phaenicia eximia* com DNAm_t de 16,4 Kpb (Azeredo-Espin & Madeira, 1996). Para se determinar com maior precisão o tamanho da molécula, um padrão de tamanho de alto peso molecular (High Molecular Weight pattern - BRL) foi utilizado como referência na medição dos fragmentos e os dados confirmaram que o tamanho do DNAm_t é de aproximadamente 16,5 Kpb (Tabela I). Roehrdanz & Johnson (1996), descreveram o DNAm_t de *C. macellaria* de uma única população como tendo, aproximadamente, 16,2 Kpb. Para estes autores, a diferença de tamanho obtida por Valle & Azeredo-Espin (1995) é decorrente de variações nas condições de gel e nos padrões de tamanho empregados, não refletindo assim, diferenças significativas de tamanho.

Baseado em vários exemplos da literatura, considera-se que a maior parte do polimorfismo intraespecífico do DNAMt é atribuído a perda ou ganho de sítios de restrição particulares de sequências específicas, sem alterações detectáveis do tamanho do genoma (Avice & Lansman, 1983). Por exemplo, Lansman *et al.* (1983), observaram que todas as diferenças entre 61 padrões de restrição de DNAMt de *Peromyscus maniculatus*, resultaram de alterações de sítios individuais que foram mapeados numa molécula de tamanho constante. De fato, nas regiões codificadoras, as alterações de sítio tendem a ser resultantes da substituição de bases, mais do que pequenas adições ou deleções nucleotídicas que podem alterar a sequência de leitura.

A presença e/ou ausência de sítios de reconhecimento de determinadas enzimas, são caracterizadas como a presença e/ou ausência de determinado padrão, fornecendo dados apropriados para o estabelecimento de relações entre os haplótipos que são utilizados para se estabelecer as relações filogenéticas do genoma (Harrison, 1989).

Um fenômeno observado freqüentemente no genoma mitocondrial animal é a homoplasia (Avice *et al.*, 1987) onde muitos sítios de restrição parecem ‘ligar’ e ‘desligar’ repetidamente durante a evolução. Este fenômeno é atribuído a substituições recorrentes de bases, principalmente transições (A - G, C - T) (Avice *et al.*, 1987). Porém, o padrão de substituição parece diferir no DNAMt de *Drosophila*, onde transversões (principalmente A - T) ocorrem tanto quanto ou mais que as transições de base (Moritz *et al.*, 1987). Filogenias inferidas à partir de genótipos mitocondriais podem ficar comprometidas quando a homoplasia, isto é, convergência evolutiva ou reversão de sítios

de restrição, for comum (Awise & Lansman, 1983; Awise *et al.*, 1987), pois tal fenômeno tem o efeito de gerar ambigüidades quando se compara padrões de restrição.

Roehrdanz (1989) observou homoplasia para alguns sítios de restrição da enzima *HaeIII*, em populações de *Cochliomyia hominivorax* do México e América Central. Por outro lado, Infante & Azeredo-Espin (1995), não observaram homoplasia em populações brasileiras de *C. hominivorax*. No presente trabalho não foi detectada homoplasia para populações brasileiras de *C. macellaria*. Tal fato nos permite inferir que as relações propostas entre os diferentes haplótipos obtidos para esta espécie, não são resultado de convergência e sim de relações genéticas entre os haplótipos.

O cladograma obtido com os haplótipos mitocondriais sugere que o haplótipo mitocondrial 1 (AAA) é um forte candidato a ser o haplótipo “ancestral” nas populações de *C. macellaria* analisadas, devido a: a- ser o haplótipo mais frequente ocorrendo em 43% do total de indivíduos analisados; b- ser o segundo haplótipo mais bem distribuído geograficamente, ocorrendo em quatro das seis localidades analisadas (Cp, Ca, PU e RJ); c- apresentar posição central no cladograma, se relacionando a outros cinco haplótipos por apenas uma mudança de sítio (Figura 5).

O haplótipo 5 (CAA) foi o segundo mais freqüente nos indivíduos analisados ocorrendo em 42% dos casos, e é o haplótipo mais bem distribuído geograficamente, não ocorrendo apenas na amostra de Campinas. Sua posição no cladograma, entretanto, revela que este haplótipo se relaciona com somente outros três (por mudança de um único sítio) inclusive o haplótipo 1. Os demais haplótipos não possuem ampla distribuição geográfica

e, além disso, suas frequências não excedem 4% nas populações. Portanto, a interpretação de que o haplótipo 1 seja o “ancestral” parece ser a mais provável.

Infante & Azeredo-Espin (1995) realizaram a análise da variabilidade genética do DNAmT de diferentes populações brasileiras de *Cochliomyia hominivorax*. A metodologia utilizada foi a mesma empregada neste trabalho para a análise populacional de *C. macellaria*, o que facilita a realização de comparações entre as duas espécies quanto à variabilidade e estrutura genética de população.

C. hominivorax, também pertencente à família Calliphoridae, é muito semelhante morfologicamente e foi confundida até 1933 com *C. macellaria*, quando Cushing & Patton estabeleceram a distinção entre as duas espécies; além das diferenças morfológicas, apresenta diferenças sob aspectos genéticos e de comportamento (Azeredo-Espin, 1982; Guimarães *et al.*, 1983; Infante, 1994). *C. hominivorax* é causadora de miíases primária enquanto *C. macellaria* possui hábito exclusivamente saprófago. Além disso, também são encontradas diferenças no ciclo de vida, como número de ovos e tempo de desenvolvimento larval (Guimarães *et al.*, 1983).

A análise do DNAmT de *C. hominivorax* via RFLP (Infante & Azeredo-Espin, 1995), mostrou que das 15 endonucleases testadas 4 (*Hae*III, *Hind*III, *Msp*I e *Pvu*II) foram capazes de detectar variabilidade sendo que duas delas (*Hind*III e *Pvu*II) também detectaram variabilidade no DNAmT de *C. macellaria*. Com a combinação dos padrões obtidos para as enzimas marcadoras pode-se detectar 15 haplótipos para a espécie *C. hominivorax* e 11 para *C. macellaria*. Porém, não foram observados padrões de restrição iguais para *C. macellaria* e *C. hominivorax*, mesmo para as enzimas comuns que foram

marcadoras comuns para as duas espécies. Este fato demonstra a possibilidade de diferenciar-se também as duas espécies pela análise do polimorfismo de DNAMt.

Apesar do fato de as duas espécies apresentarem os padrões de restrição do DNAMt visualmente diferentes, Roehrdanz & Johnson (1996) comparando o mapa de restrição de ambas, detectaram a presença de 30 sítios de restrição em comum. Contudo, o cálculo da divergência de sequência entre as duas espécies foi de $\delta = 0.052$ ou 5.2%; valor considerado elevado, refletindo diferenças de sequências interespecíficas (Awise, 1994), demonstrando a vantagem de utilizar esta metodologia para diferenciar espécies.

Casos de heteroplasmia foram detectados nas duas espécies. Enquanto a heteroplasmia observada para *C. hominivorax* (n=17) foi de tamanho (padrão “E” de *PvuII*, Infante & Azeredo-Espin, 1995), em *C. macellaria* (n=8) a heteroplasmia envolve sítios de restrição (padrão “D” de *EcoRV*, Valle & Azeredo-Espin, 1995).

Awise *et al.*, 1987 estabeleceram cinco categorias teóricas para filogeografia intraespecífica que associam o grau de divergência dos genótipos mitocondriais entre diferentes populações. A filogenia baseada em DNAMt pode apresentar discontinuidades, onde genótipos relacionados diferem de outros por muitos eventos mutacionais. Estes grupos de DNAMt geneticamente distintos podem ocupar regiões geograficamente separadas na distribuição da espécie (categoria I), ou podem co-ocorrer geograficamente (categoria II). Por outro lado, filogenias de DNAMt podem ser mais ou menos contínuas geneticamente e separadas espacialmente (categoria III), totalmente sobrepostas (categoria IV) ou parcialmente agrupadas (categoria V).

Neste trabalho os resultados obtidos sugerem, principalmente para as amostras de Ca, RJ e PU, que a espécie *C. macellaria* seja incluída na categoria I. Neste caso, os genótipos mitocondriais apresentam descontinuidade filogenética e separação geográfica. Avise *et al.*, (1987) afirmam que esta é a situação mais comumente encontrada e que descontinuidade genética com orientação geográfica envolve barreiras ao fluxo gênico. De fato, as populações de PU e RJ são as que mais diferem, possuindo 7 haplótipos diferentes sendo que esta diferença pode ser atribuída à distância geográfica existente entre estas localidades. Quando se compara as populações de Ca e RJ observa-se um total de 5 haplótipos diferentes e quando se compara as amostras de PU e Ca observa-se 5 haplótipos diferentes (Figura 5). A ocorrência de haplótipos comuns entre as populações não descarta a possibilidade de ocorrência de fluxo gênico, principalmente entre Ca e RJ, já que a distância entre PU e as demais populações é grande (3.000km em média).

Baseado nos resultados obtidos para Cp, Bo e Ma pode-se sugerir que estas populações de *C. macellaria*, sejam incluídas na categoria IV. Neste caso, os genótipos mitocondriais proximamente relacionados parecem não estar geograficamente localizados, possivelmente devido a uma interação recente e relativamente extensiva, através de fluxo gênico. Para que isso ocorra são necessárias a ausência de barreiras zoogeográficas, bem como um tipo de comportamento que favoreça a dispersão (Avise *et al.*, 1987). No caso de *C. macellaria* a inclusão das populações de Cp e Bo, apesar da ocorrência de haplótipos diferentes nestas localidades (Figura 4 e Tabela IV), na Categoria IV é mais evidente pelos seguintes fatos: 1- são regiões relativamente próximas geograficamente (229 Km), 2- comprovadamente os adultos de *C. macellaria* possuem grande capacidade

de vôo (Baumgartner & Greenberg, 1984), fato que possibilita e facilita a dispersão e fluxo gênico, 3- somente uma única alteração de sítio de restrição foi observada entre os haplótipos que ocorrem nestas duas localidades, indicando proximidade entre eles ($\delta=0.003$). A inclusão de Ma na categoria IV torna-se um pouco mais complicada pelo fato desta localidade encontrar-se em região totalmente distinta e distante geograficamente das outras no Estado do Amazonas, tornando-se complicada a inferência de possível fluxo gênico entre as duas regiões. Porém, como mencionado anteriormente, amostras que incluam populações da região Central e do Noroeste do Brasil fazem-se necessárias para que a dinâmica populacional de *C. macellaria* seja melhor esclarecida.

Um dos melhores exemplos de espécie que se enquadra na categoria IV é o das enguias Americanas da espécie *Anguilla rostrata* (Awise *et al.*, 1987). Neste caso os autores documentaram a ausência de diferenciação de DNAm_t entre amostras populacionais amplamente distribuídas (Awise *et al.*, 1986). Os resultados por eles obtidos foram: 1- um único genótipo mitocondrial prevalecendo em todas as localidades; 2- genótipos variantes observados em 2 ou mais indivíduos não estavam confinados à localidades específicas; 3- o polimorfismo (detectado por uma única enzima) apresentou-se amplamente distribuído geograficamente e não apresentou diferenças de frequência entre as localidades; 4- a divergência de sequência calculada foi baixa ($\delta = 0.001$). Tais dados levaram à conclusão de que *A. rostrata* é constituída por uma única população intercruzante com ampla distribuição de larvas.

O cálculo da divergência de sequência foi efetuado para as duas espécies. Para *C. hominivorax* a divergência de sequência nucleotídica entre os haplótipos variou de 0.3% a

2.7% ($\delta=0.92\%$), enquanto para *C. macellaria* a variação foi de 0.2% a 0.9% ($\delta=0.5\%$). Infante (1994) incluiu as populações de *C. hominivorax*, exceto a população de Caraguatatuba, na categoria IV de filogenia intraespecífica (Avice *et al.*, 1987), onde os haplótipos mitocondriais não parecem estar geograficamente localizados devido a uma interação recente, através da ausência de barreiras geográficas interlocalidades. Já a população de Caraguatatuba foi incluída na categoria II, onde há descontinuidade genética do DNAm não associada com separação geográfica. Como será tratado posteriormente na discussão, as populações de *C. macellaria* de Ca, RJ e PU foram incluídas na categoria I (descontinuidade genética com separação espacial), enquanto as populações de Bo, Cp e Ma foram incluídas na categoria IV como ocorreu para a maior parte das populações de *C. hominivorax*.

Os cruzamentos interpopulacionais mostraram que não há indícios de incompatibilidade sexual. As progênies foram denominadas H-1 e H-2 e são resultantes dos cruzamentos 1 e 2, respectivamente. O DNAm dos indivíduos das progênies também foi submetido à análise com endonucleases de restrição para avaliação da variabilidade genética.

Em H-1 foram encontrados dois padrões para *EcoRV* (A e 'D') sendo que um deles é característico de indivíduos heteroplásmicos (Tabela VII). Este fato está de acordo com o padrão de herança materna do DNAm, já que indivíduos heteroplásmicos também foram observados na análise da população de onde se originaram as fêmeas do cruzamento. Para *HindIII* foram observados 2 padrões (A e B) que ocorreram exatamente na mesma frequência, cada um em 50% dos indivíduos. Para *PvuII* foram observados os

padrões A e B. De fato, o padrão B de *PvuII* somente foi observado no Rio de Janeiro, amostra de população que forneceu as fêmeas para o cruzamento 1 que originou H-1 (Tabela VII).

Combinando-se os padrões de restrição para as enzimas marcadoras, obtiveram-se os haplótipos mitocondriais para H-1 (Tabela VIII). Foram observados quatro haplótipos [1(AAA), 2(ABA), 6(DAA) e 8(ABB)] sendo que o mais frequente (AAA) foi também o mais frequente na população materna de H-1. Baseado nestes resultados pode-se inferir que no cruzamento de machos de Ca e fêmeas do RJ, linhagens maternas diferentes contribuíram para formar a progênie (H-1).

Em H-2 foi encontrado somente um padrão para cada enzima marcadora. C para *EcoRV*, A para *HindIII* e A para *PvuII*, portanto, somente um haplótipo mitocondrial foi observado nos 47 indivíduos analisados (CAA) (Tabela VIII). Tal fato deve ter ocorrido ou porque somente uma linhagem materna (fêmeas com o haplótipo 5) contribuiu para a produção da progênie, ou porque os indivíduos analisados eram oriundos da postura de uma única fêmea. A primeira hipótese parece ser a mais provável, uma vez que durante a estimulação das fêmeas para a obtenção das posturas, foram tomadas precauções para evitar que somente a postura de uma fêmea fosse analisada.

O cálculo da estimativa de divergência de sequência nucleotídica (δ) do genoma mitocondrial de *C. macellaria*, apresentou valores que variam de 0.002 a 0.009, com um valor médio de $\delta = 0.005$. A proporção de fragmentos em comum (F) para os haplótipos mitocondriais variou de 0.674 a 0.986, com valor médio de $F = 0.842$.

É evidente a predominância de dois haplótipos mitocondriais (1 e 5) e sua ampla distribuição geográfica. Um outro dado importante observado foi o de que há três populações onde somente um único haplótipo mitocondrial foi encontrado (Bo, Cp e Ma). Em duas delas, Bo e Ma, o haplótipo fixado é o 5 e em Cp o haplótipo fixado é o 1. Vários tipos de eventos podem levar à diferenciação genética entre populações, tais como: colonização de um novo habitat (Bartlet & Richardson, 1986; Holt, 1987; Rice & Solt, 1988); colonização de um novo território ou região (efeito fundador) (Carson & Templeton, 1984; Bartlet & Richardson, 1986); afunilamento populacional (Nei *et al.*, 1975); mudanças genéticas por eventos estocásticos, tais como deriva genética e mutação (Templeton, 1980) ou seleção natural (Barker & Thomas, 1987). No caso de *C. macellaria*, a fixação destes haplótipos nas populações pode ser explicada pelo fato de, no Brasil, as populações desta espécie terem passado por uma drástica diminuição populacional devido à competição com espécies de *Chrysomya* e, provavelmente, os haplótipos 1 e 5 foram fixados por ocorrerem em maior frequência nestas localidades. O fato de existirem haplótipos exclusivos em algumas localidades (ACA = Ca, DBA, ABB e AAB = RJ, CDA e EAA = PU) sugere que a espécie *C. macellaria* se encontra em franco processo evolutivo e um monitoramento da variabilidade genética temporal e de um maior número de localidades se faz necessário para que a sua estrutura populacional seja melhor entendida.

O maior número de substituições nucleotídicas $\delta = 0.009$ foi observado entre os haplótipos 8 e 9 sendo que, o haplótipo 8 é exclusivo da população de RJ e o 9 exclusivo

de PU. A presença de haplótipos como o 8 e o 9 sugere que esta espécie apresenta-se subdividida pela distância e caminha para a estruturação genética.

Taylor & Peterson II (1994), através da análise de alozimas em populações de *C. macellaria* da Costa Rica, concluíram que, baseado em estatística para o equilíbrio de Hardy-Weinberg e estatística de Wright, *C. macellaria* é uma espécie panmítica sem evidência de subestruturação populacional. Tal fato condiz parcialmente com nossas conclusões sobre o estado atual das populações de *C. macellaria* no Brasil, já que diferenças foram observadas entre, por exemplo, PU e RJ. Deve-se ressaltar também a diferença quanto à extensão territorial entre Brasil e Costa Rica. Provavelmente, um território menor como o da Costa Rica estaria favorecendo a interação entre populações gerando um quadro de panmixia. Além disso, o método de análise via RFLP do DNAm_t pode revelar informações sobre eventos de fluxo gênico e efeito de fundador, que a análise de alozimas muitas vezes não permite.

Os valores de divergência de sequência observados em *C. macellaria* estão dentro dos valores tipicamente encontrados para análise intrapopulacional e intraespecífica (0.0005 - 0.020) (Stephan & Langley, 1992; Avise, 1994). Apesar de termos classificado *C. macellaria* parcialmente como 'categoria-IV' e dos baixos valores de divergência de sequência encontrados, não podemos inferir com exatidão se a variabilidade observada representa um alto polimorfismo de uma espécie com populações intercruzantes e, portanto, uma espécie panmítica. Segundo Avise *et al.*, 1987 a simples documentação de um padrão 'categoria-IV' não implica necessariamente em panmixia. Na verdade há fortes indícios de que espécies assim classificadas teriam uma relativa facilidade de

movimentação (associada com a capacidade de vôo) durante tempo evolutivo recente, sendo que suas populações estiveram em contato genético, provavelmente, por pelo menos dezenas de milhares de gerações.

Azeredo-Espin (1982) analisou cariotipicamente *C. hominivorax* e *C. macellaria* encontrando diferenças suficientes para distinguir facilmente as duas espécies. O comprimento dos autossomos e a morfologia dos cromossomos sexuais é diferente entre elas. O cromossomo X em *C. hominivorax* é submetacêntrico e apresenta um comprimento maior que o X metacêntrico de *C. macellaria*. Em *C. macellaria* o cromossomo Y apresenta centrômero na região terminal e é bem menor que o Y metacêntrico de *C. hominivorax*. O complemento somático de *C. macellaria* também apresenta um número maior de constrições secundárias que o de *C. hominivorax*. Além disso, o cromossomo X de *C. macellaria* de Ca, Cp e PU é metacêntrico diferindo de *C. hominivorax* (submetacêntrico). Além disso, os dados de relação de braço do cromossomo X também diferem. Apesar de metacêntrico, o X de Cp e Ca possuem braços com comprimentos desiguais ($Rb = 1,6$ e $Rb = 1,4$, respectivamente) o que não ocorre em PU onde os braços têm comprimentos iguais ($Rb = 1,0$) (Tabela IX). O cromossomo Y, visualizado em Cp, é muito pequeno e possui centrômero terminal como em Ca.

Foram detectadas também diferenças na porcentagem do comprimento total do complemento (%CTC) (Tabela X). O par autossômico 3 de Cp é menor que o mesmo par de Ca e PU. Já o par autossômico 6 desta mesma população (Cp) é maior que o mesmo par de Ca e PU que possuem praticamente o mesmo comprimento (Figura 4). O comprimento médio total do complemento foi de $25,3\mu\text{m}$ para Ca, $21,8\mu\text{m}$ para Cp e

24,3µm para PU (Tabela X). Embora tenham sido observadas estas diferenças do tamanho do complemento, é possível que estas possam estar relacionadas com o grau de condensação cromossômica diferente durante o estágio larval utilizado para a análise. Procurou-se minimizar tais efeitos padronizando-se a análise, para larvas que estivessem no mesmo estágio de desenvolvimento.

As diferenças mais marcantes entre *C. macellaria* e *C. hominivorax* e também entre as populações de *C. macellaria* analisadas, residem na presença e localização de constrições secundárias. Tais constrições distinguem as três populações analisadas. Outras técnicas de coloração como bandamento dos cromossomos, além da análise de um maior número de populações, são necessárias até para caracterizar as constrições em termos de frequência.

Quando se compara os dados de marcadores nuclear e mitocondrial, pode-se estabelecer uma correlação entre os haplótipos e os cariótipos observados (Figura 4). A ocorrência de cariótipos diferentes para cada localidade e a presença de haplótipos exclusivos indicam que esta espécie encontra-se num processo de estruturação genética no Brasil.

As abordagens realizadas neste trabalho demonstraram ser eficientes na obtenção de marcadores genéticos para caracterizar eventos evolutivos recentes. Porém, um maior entendimento da estrutura populacional desta espécie no Brasil, que nas últimas décadas sofreu drástica alteração no seu habitat, somente será conseguido com o contínuo monitoramento da variabilidade genética, com estudos biogeográficos e acompanhamento dos efeitos da competição interespecífica.

VI. RESUMO

A espécie *Cochliomyia macellaria* (Fabricius) caracteriza-se por ser exclusivamente saprófaga, podendo causar miíases apenas em infestações secundárias de feridas. Apresenta ampla distribuição geográfica nas Américas, do sul do Canadá até a Argentina. Esta espécie, por ser sinantrópica, tem grande importância como vetor mecânico de microorganismos patogênicos.

Na década de 70, as Américas foram invadidas por espécies do gênero *Chrysomya* (Robineau-Desvoidy) cuja distribuição geográfica era confinada ao Velho Mundo. A introdução no continente Americano ocorreu através de intervenção humana. O estabelecimento de espécies de *Chrysomya* no Novo Mundo afetou diretamente a fauna local de moscas varejeiras que exploram o mesmo recurso e mostram-se competidores eficientes. As espécies nativas do Novo Mundo do gênero *Cochliomyia* são consideradas equivalentes ecológicos das espécies de *Chrysomya*. A introdução e estabelecimento de espécies deste gênero na região Neotropical tem contribuído para alterar a distribuição e frequência de populações de *C. macellaria* no Brasil.

O conhecimento básico da variabilidade genética e evolução intraespecífica é uma informação necessária para a compreensão da estrutura de população e eventos evolutivos recentes como introduções e fluxo gênico. Em insetos, o DNAm tem mostrado ser um marcador genético efetivo para obter informações sobre a variabilidade e estrutura genética de populações.

Neste trabalho, a análise de restrição do DNAm_t e o cálculo da divergência de sequência nucleotídica no DNAm_t de 6 populações brasileiras de *C. macellaria*, foram conduzidos para examinar a variabilidade genética e para fornecer bases para a compreensão da atual estrutura populacional de *C. macellaria*. Foi realizada também a análise cariotípica para a obtenção de dados que relacionassem informações nucleares e citoplasmáticas de algumas populações.

O uso de 13 endonucleases de restrição na análise do DNAm_t de *C. macellaria* revelou que 3 enzimas (*EcoRV*, *HindIII* e *PvuII*) foram eficientes para detectar variabilidade. Baseado nos padrões de restrição obtidos para estas enzimas, foram caracterizados 11 haplótipos mitocondriais.

Entre os haplótipos mitocondriais, os valores obtidos para divergência de sequência de nucleotídeos (δ) variaram de 0.002 a 0.009. Estes dados sugerem diferenciação local do DNAm_t de algumas populações. A análise cladística dos haplótipos observados e da distribuição geográfica sugere que algumas populações de *C. macellaria* apresentam certa descontinuidade genética com separação espacial, dados que refletem barreiras ao fluxo gênico. Por outro lado, algumas populações revelam que haplótipos intimamente relacionados não apresentam localização geográfica, o que pode refletir interação dessas populações através de fluxo gênico, migração entre as diferentes localidades ou interferência humana.

A análise cariotípica de três populações de *C. macellaria* (Ca, Cp e PU) revelou diferenças quanto a posição dos centrômeros e tamanho dos cromossomos sexuais, além de

detectar constrições secundárias que podem ser utilizadas como marcadores interpopulacionais e interespecíficos a nível cromossômico.

Apesar de ter sido detectada interação via fluxo gênico entre algumas das populações de *C. macellaria* e dos baixos valores de divergência de sequência, a alta variabilidade observada no DNAm_t representa um marcador genético molecular efetivo para a compreensão de eventos evolutivos recentes e no monitoramento de afinamento e competição entre as espécies causadoras de miíases nativas e introduzidas da família Calliphoridae.

VII. ABSTRACT

Cochliomyia macellaria (Fabricius) is an endemic New World species ranging from southern Canada to Argentina, that is specially abundant in the tropical regions. This species is exclusively saprophagous species breeding in carrion and is also a secondary agent of myiasis. It is perhaps the most widely distributed calliphorid in the Americas. The adults of *C. macellaria* are attracted to a wide variety of substrates for food or reproduction, such as urban garbage, human and livestock feces and wounds infested with dipteran larvae or not. This species has been reported as a mechanical vector of human and animal diseases.

Recently, four Old World blow flies of the genus *Chrysomya* (Robineau-Desvoidy) were introduced in the New World. These species, particularly *C. albiceps* and *C. putoria*, have the same habitat of the native species, including *C. macellaria*, providing strong interspecific competition, and have caused a population reduction and displacement of *C. macellaria* in several regions of Brazil.

Investigations of the genetic variability among populations of this species would help to understand historical patterns of dispersal and current levels of gene flow. In insects, the mtDNA has been considered an effective genetic marker to obtain informations about species variability and their genetic structure.

In this work, the mtDNA restriction analysis and the sequence divergence of six Brazilian populations of *C. macellaria* were conducted to estimate the genetic variability and to understand the actual populational structure of this species. A karyotypic analysis was also conducted to obtain data that compare nuclear and cytoplasmatic information in some populations.

Three out of thirteen enzymes (*EcoRV*, *HindIII* and *PvuII*) were suitable to detect mtDNA variation between the sampled *C. macellaria* populations. Combined restriction patterns for these three enzymes comprised the mtDNA haplotypes of each of the individuals. Eleven mitochondrial haplotypes were detected.

Among the mitochondrial haplotypes, the values of sequence divergence estimated (δ) ranged from 0.002 to 0.009. These data suggest local differentiation of mtDNA of some populations. The cladistic analysis of the haplotypes and the analysis of geographical distribution suggest that some populations of *C. macellaria* show genetic discontinuity with spatial separation, reflecting barrier to gene flow.

The karyotypic analysis of three populations (Ca, Cp e PU) revealed differences in centromere position and size of sexual chromosomes besides the presence of secondary constrictions that can be used as interspecific and interpopulation markers.

The data presented in this work confirm the effectiveness of mtDNA as a genetic marker to understand recent evolutionary events, and to monitorize bottlenecks and competition among native and introduced species of the Calliphoridae family.

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anderson, S.; Bankier, A.T.; Barrell, B.G.; de Braijn, M.H.L.; Coulson, A.R.; Drouin, J.; Eperon, I.C.; Nierlich, D.P.; Roe, B.A.; Sanger, F.; Schreier, P.H.; Smith, A.J.H.; Staden, R. and Young, I.C. (1981).** Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290: 457-465.
- Anderson, S.; de Bruijn, M.H.L.; Coulson, A.R.; Eperon, I.C.; Sanger, F. and Young, I.C. (1982).** Complete sequence of bovine mitochondrial DNA, conserved features of the mammalian mitochondrial genome. *J. Mol. Biol.* 156: 683-717.
- Avise, J.C. (1994).** *Molecular Markers, Natural History and Evolution.* Chapman & Hall, New York, NY, pp 511.
- Avise, J.C.; Giblyn-Davidson, C.; Laerm, J.; Patton, J.C. and Lansman, R.A. (1979).** Mitochondrial DNA clones and matriarchal phylogeny within and among geographic populations of the pocket gopher, *Geomys pinetis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76(12): 6694-6698.
- Avise, J.C. and Kitto, G.B. (1973).** Phosphoglucose isomerase gene duplication in the bony fishes: an evolutionary history. *Biochem Genet.* 8: 113-132.
- Avise, J.C. and Lansman, R.A. (1983).** Polymorphism of mitochondrial DNA in populations of higher animals. In *Evolution of Genes and Proteins.* M. Nei and R.K. Koehn. pp 143-164. Sinauer, Sunderland, MA.
- Avise, J.C.; Helfman, G.S.; Saunders, N.C. and Hales, L.S. (1986).** Mitochondrial DNA differentiation in North Atlantic eels: Population genetic consequences of an unusual life history pattern. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83: 4350-4354.
- Avise, J.C.; Arnold, J.; Ball, R.M.; Bermingham, E.; Lamb, T.; Neigel, J.E.; Reeb, C.A. and Saunders, N.C. (1987).** Intraspecific Phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 18: 489-522.
- Avise, J.C. (1989).** Gene trees and organismal histories: a phylogenetic approach to population biology. *Evolution* 43(6): 1192-1208.
- Azeredo-Espin, A.M.L. (1982).** Análise cariotípica de cinco espécies de Calliphoridae (Diptera) do Estado de São Paulo. Tese de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP pp 167.

- Azeredo-Espin, A.M.L. (1987). Análise cariotípica, morfométrica e de compatibilidade sexual, em linhagens brasileiras de *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae). Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, pp 149.
- Azeredo-Espin, A.M.L. and Pavan, C. (1983). Karyotypes and possible regions of origin of three species of Calliphoridae (Diptera) recently introduced in Brazil. *Rev. Bras. Genet.* 6(4):619-638.
- Azeredo-Espin, A.M.L.; Schroder, R.F.W.; Huettel, M.D. and Sheppard, W.S. (1991). Mitochondrial DNA variation in geographic populations of Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Experientia* 47: 483-485.
- Azeredo-Espin, A.M.L. (1993). Mitochondrial DNA variability in geographic populations of screwworm fly from Brazil. *Int. Atomic Energy Agency.* 327: 161-165.
- Azeredo-Espin, A.M.L. and Madeira, N. (1996). Primary myiasis in dog caused by *Phaenicia eximia* (Diptera: Calliphoridae) and preliminary mitochondrial DNA analysis of the species in Brazil. *J. Med. Entomol.* 33(5): 839-843.
- Barker, J.S.F. and Thomas, R.H. (1987). A quantitative genetic perspective on adaptative evolution. In *Genetic constraints on adaptative evolution.* ed. V. Loeschcke pp 2-23. Springer-Verlag, Berlin
- Bartlett, D.C.H. and Richardson, B.J. (1986). Genetic attributes of invading species. In *Ecology of biological invasions.* ed. R.H. Groves and J.J. Burdon. pp 21-33. Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- Baumgartner, D.L. and Greenberg, B. (1984). The genus *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) in the New World. *J. Med. Entomol.* 21: 105-113.
- Baumgartner, D.L. and Greenberg, B. (1985). Distribution and medical ecology of the blow flies (Diptera: Calliphoridae) of Peru. *Ann. Entomol. Soc. America* 78: 565-587.
- Bentzen, P.; Leggett, W.C. and Brown, G.G. (1988). Length and restriction site heteroplasmy in the mitochondrial DNA of American shad (*Alosa sapidissima*). *Genetics* 118: 509-518.
- Bermingham, E.; Lamb, T.E. and Avise, J.C. (1986). Size polymorphism and heteroplasmy in the mitochondrial DNA of lower vertebrates. *J. Heredity* 77: 249-259.

- Boyce, T.M.; Zwick, M.E. and Aquadro, C.F. (1989).** Mitochondrial DNA in the bark weevils: size, structure and heteroplasm. *Genetics* 123: 825-836.
- Boyes, J.W. (1961).** Somatic chromosomes of higher Diptera. V. Interspecific variation in the Calliphoridae. *Can. J. Zool.* 39: 549-570.
- Boyes, J.W. and VanBrink, J.M. (1965).** Chromosomes of calyprate Diptera. *Can. J. Genet. and Cytol.* 7: 537-550.
- Boyes, J.W. and Shewell, G.E. (1975).** Cytotaxonomy of *Calliphoridae* (Diptera). *Genetica* 45: 435-488.
- Brown, W.M. (1983).** Evolution of animal mitochondrial DNA. In *Evolution of Genes and Proteins*, ed. M. Nei and R.K. Koehn. pp 62-88. Sinauer, Sunderland, MA.
- Carson, H.L. and Templeton, A.R. (1984).** Genetic revolutions in relation to speciation phenomena: the founding of new populations. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 15: 97-131.
- Clayton, D.A. (1982).** Replication of animal mitochondrial DNA. *Cell* 28: 693-705.
- Cushing, E.C. and Patton, W.S. (1933).** Studies on the higher Diptera of medical and veterinary importance. *Cochliomyia americana*, sp. nov., the screwworm fly of the New World. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 27(4): 539-551.
- Dear, J.P. (1985).** A revision of New World Chrysomini (Diptera: Calliphoridae). *Rev. Bras. Zool.* 3: 109-169.
- Fauron, C.M.R. and Wolstenholme, D.R. (1980).** Intraspecific diversity of nucleotide sequence within the A+T-rich region of mitochondrial DNA molecules of *Drosophila mauritiana*, *D. melanogaster* and *D. simulans*. *Nucleic Acids Res.* 8: 5391-5410.
- Ferreira, M.J.M. (1983).** Sinantropia de *Calliphoridae* (Diptera) em Goiânia, Goiás. *Rev. Bras. Biol.* 43: 199-210.
- Gagné, R.J. (1981).** *Chrysomya spp.*, Old World blow flies (Diptera:Calliphoridae), recently established in the Americas. *Entomol. Soc. Am. Bull.* 27: 21-22.
- Gagné, R.J.; Gerrish, R.R. and Richard, R.D. (1982).** Correspondence. *ESA Newsl.* 5(5): 9.
- Gillespie, (1992).** *The causes of molecular evolution*. Oxford Univ. Press, New York.

- Guimarães, J.H.; Prado, A.P. and Linhares, A.X. (1978).** Three newly introduced blow flies species in Southern Brazil (Diptera: Calliphoridae). *Rev. Bras. Entomol.* 22: 53-60.
- Guimarães, J.H.; Prado, A.P. and Buralli, G.M. (1979).** Dispersal and distribution of three newly introduced species of *Chrysomya* Robineau-Desvoidy in Brazil (Diptera: Calliphoridae). *Rev. Bras. Entomol.* 23: 245-255.
- Guimarães, J.H.; Papavero, N. and Prado, A.P. (1983).** As miíases na região neotropical (Identificação, Biologia, Bibliografia). *Rev. Bras. Zool.* 1(4): 239-416.
- Hale, L.R. and Singh, R.S. (1986).** Extensive variation and heteroplasmy in size of mitochondrial DNA among geographic populations of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:8813-8817.
- Hall, D.G. (1948).** *The Blow flies of North America*. Thomas Say. Found., Entomol. Soc. Am. Washington, DC, pp 447.
- Hanski, I. (1977).** Biogeography and ecology of carrion flies in the Canary Island. *Am. Entomol. Fenn.* 43: 101-107.
- Harrison, R.G. (1989).** Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. *Trends Ecol. Evol.* 4: 6-11.
- Hoeh, W.R.; Blakley, K.H. and Brown, W.M. (1991).** Heteroplasmy suggests limited biparental inheritance of *Mytilus* mitochondrial DNA. *Science* 251: 1488-1490.
- Holt, D.R. (1987).** Population dynamics and evolutionary process: The manifold roles of habitat selection. *Evol. Ecol.* 1:331-347.
- Imbiriba, A.S.; Izutani, D.T.; Milhoretto, I.T. and Luz, E. (1977).** Introdução da *Chrysomya cloropyga* (Wiedemann, 1818) na região neotropical (Diptera: Calliphoridae). *Arq. Biol. Tecnol.* 20: 35-39.
- Infante, M.E. (1994).** Análise do DNA mitocondrial em populações de *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae) do Estado de São Paulo. Master Thesis. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, pp 122.
- Infante, M.E. and Azeredo-Espin, A.M.L. (1995).** Genetic variability in mtDNA of *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae) from Brazil. *Biochem. Genetics* 33: 737-756.
- Jirón, L.F. (1979).** Sobre moscas califóridas de Costa Rica (Diptera: Cyclorrhapha). *Brenesia* 16: 221-222.

- Kimura, M. and Ohta, T. (1971).** Theoretical aspects of population genetics. Princeton Univ. Press
- Kondo, R.; Satta, Y.; Matsuura, E.T.; Ishiwa, H.; Takahata, N. and Chigusa, S.I. (1990).** Incomplete maternal transmission of mitochondrial DNA in *Drosophila*. *Genetics* 126: 657-663.
- Krafsur, E.S.; Hightower, B.G. and Leira, L. (1979).** A longitudinal study of screwworm population *Cochliomyia hominivorax* (Diptera:Calliphoridae) in northern Veracruz, Mexico. *J. Med. Entomol.* 16: 470-481.
- Lansman, R.A.; Shade, R.O.; Shapira, J.F. and Avise, J.C. (1981).** The use of restriction endonucleases to measure mitochondrial DNA sequence relatedness in natural populations. III. Techniques and potential applications. *J. Mol. Evol.* 17: 214-226.
- Lansman, R.A.; Avise, J.C. and Huettel, M.D. (1983).** Critical experimental test of the possibility of "paternal leakage" of mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 1969-1971.
- Laurence, B.R. (1981).** Geographical expansion of the range of *Chrysomya* blowflies. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 75: 130-131.
- Laurence, B.R. (1986).** Old World flies in the New World. *Parasitology Today* 2: 77-79.
- Linn, S. and Arber, W. (1968).** Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*. X. In vitro restriction of phage fd replicative form. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 59: 1300-1306.
- Meselson, M. and Yuan, R. (1968).** DNA restriction enzyme from *E. coli*. *Nature* 217: 1110-1114.
- Moritz, C.; Dowlings, E. and Brown, W.M. (1987).** Evolution of animal mitochondrial DNA: Relevance for population biology and systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 18: 269-292.
- Murphy, R.W.; Sites, J.W.; Buth, D.G. and Hauffler, C.H. (1990).** Proteins I: isozyme electrophoresis. In *Molecular Systematics*, ed D.M. Hillis and C. Moritz, pp 45-126. Sinauer, Sunderland, MA.
- Nei, M.; Maruyama, T. and Chakraborty, R. (1975).** The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution* 29: 1-10.

- Nei, M. and Li, W.-H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76(10): 5269-5273.
- Ohta, T. (1974). Mutational pressure as the main cause of molecular evolution and polymorphism. *Nature* 252: 351-354.
- Paraluppi, N.D. (1992). Calliphoridae (Diptera) de Manaus: Levantamento taxonômico, sazonalidade, atividade de vôo, desenvolvimento ovariano e potencialidade como vetores de bactérias nas feiras livres. Doctoral Thesis, INPA, Manaus, AM, pp 123.
- Prado, A.P. and Guimarães, J.H. (1982). Estado atual de dispersão e distribuição do gênero *Chrysomya* Robineau-Desvoidy na região neotropical (Diptera: Calliphoridae). *Rev. Bras. Entomol.* 26: 225-231.
- Rand, D.M. and Harrison, R.G. (1986). Mitochondrial DNA transmission genetics in crickets. *Genetics* 114: 955-970.
- Rice, W.R. and Solt, G.W. (1988). Speciation via disruptive selection and habitat preference. Experimental evidence. *Am. Nat.* 131: 911-917.
- Richard, R.D. and Ahrens, E.H. (1983). New distribution record for the recently introduced blow fly *Chrysomya rufifacies* (Macquart) in North America. *Southwest Entomol.* 26: 225-231.
- Ridley, D. (1993). *Evolution*. Blackwell Scientific Publications, Inc., New York, NY.
- Roderick, G.K. (1996). Geographic structure of insect populations: gene flow, phylogeography, and their uses. *Ann. Rev. Entomol.* 41: 325-352
- Roehrdanz, R.L. (1989). Intraspecific genetic variability in mitochondrial DNA of the screwworm fly (*Cochliomyia hominivorax*). *Biochem. Genetics* 27: 551-569.
- Roehrdanz, R.L. and Johnson, D.A. (1988). Mitochondrial DNA variation among geographical populations of the screwworm fly *Cochliomyia hominivorax*. *J. Med. Entomol.* 25: 136-141.
- Roehrdanz, R.L. and Johnson, D.A. (1996). Mitochondrial DNA restriction site map of *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae). *J. Med. Entomol.* 33(5): 863-865.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning*. 2nd ed., cold spring Harbor Lab. Press, Cold Spring Harbor, NY.

- Solignac, M.; Monnerot, M. and Mounolou, J.-C. (1983).** Mitochondrial DNA heteroplasmy in *Drosophila mauritiana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 6942-6946.
- Solignac, M.; Générmont, J.; Monnerot, M. and Mounolou, J.-C. (1984).** Genetics of mitochondria in *Drosophila*: mtDNA inheritance in heteroplasmic strains of *D. mauritiana*. *Mol. Gen. Genet.* 197: 183-188.
- Soltis, P.S.; Soltis, D.E. and Gottlieb, L.D. (1987).** Phosphoglucosmutase gene duplications in *Clarkia* (Onagraceae) and their phylogenetic implications. *Evolution* 41: 667-671.
- Southern, E.M. (1975).** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503.
- Sttebins, G.L. (1950).** *Variation and Evolution in Plants*. Columbia Univ. Press, New York. pp 643.
- Stephan, W. and Langley, C.H. (1992).** Evolutionary consequences of DNA mismatch inhibited repair opportunity. *Genetics* 132: 567-574.
- Taylor, D.B. and Peterson II, R.D. (1994).** Population genetics and gene variation in primary and secondary screwworm (Diptera:Calliphoridae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 87(5): 626-633.
- Templeton, A.R. (1980).** The theory of speciation via the founder principle. *Genetics* 94: 1011-1038.
- Templeton, A.R. (1983).** Phylogenetic inference from restriction endonuclease cleavage site maps with particular reference to the evolution of man and the apes. *Evolution* 37: 221-244.
- Valle, J.S. and Azeredo-Espin, A.M.L. (1995).** Mitochondrial DNA variation in two brazilian populations of *Cochliomyia macellaria* (Diptera:Calliphoridae). *Braz. J. Genet.* 18(4): 521-526.
- Wilson, A.C.; Cann, R.L.; Carr, S.M.; George, M.Jr.; Gyllensten, U.B.; Helm-Bychowski, K.M.; Higuchi, R.G.; Palumbi, S.R.; Prager, E.M.; Sage, R.D. and Stoneking, M. (1985).** Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biol. J. Linn. Soc.* 26: 375-400.
- Wolstenholme, D.R. (1992).** Animal Mitochondrial DNA: Structure and Evolution. In *Mitochondrial Genomes. Int. Rev. Cytol.* 141:173-232.
- Zumpt, F. (1965).** Myiasis in man and animals in the Old World. Butterworths, London, pp 267.