



Emiliyn Kely Moron Valeriano

Variabilidade do padrão de esterases e atividade da glutaniona
s-transferase em linhagens geográficas de *Drosophila*
melanogaster e *D. simulans* resistentes e suscetíveis
ao inseticida DDT

São José do Rio Preto
2012

Emiliyn Kely Morón Valeriano

Variabilidade do padrão de esterases e atividade da glutanionas-transferase em linhagens geográficas de *Drosophila melanogaster* e *D. simulans* resistentes e suscetíveis ao inseticida DDT

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética, junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Área de concentração Genética, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Lilian Madi-Ravazzi

São José do Rio Preto
2012

Valeriano, Emiliyn Kely Morón

Variabilidade do padrão de esterases e atividade da glutationa S-transferase em linhagens geográficas de *Drosophila melanogaster* e *D. simulans* resistentes e suscetíveis ao inseticida DDT/ Emiliyn Kely Morón Valeirano. - São José do Rio Preto: [s.n.], 2012.

83 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Lilian Madi-Ravazzi

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Resistência a inseticidas. 2. D. Melanogaster. 3. D. Simulans. 4. Padrão de esterases. 5. Polimorfismo de EST-6. 6. GST. I. Madi-Ravazzi, Lilian. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título

CDU – 632.95.025.8

Emiliyn Kely Morón Valeriano

Variabilidade do padrão de esterases e atividade da glutanionas-transferase em linhagens geográficas de *Drosophila melanogaster* e *D. simulans* resistentes e suscetíveis ao inseticida DDT

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética, junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Área de Concentração Genética, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto

Comissão Examinadora

Prof^a. Dr^a. Lilian Madi-Ravazzi
UNESP – São José do Rio Preto
Orientadora

Prof. Dr. Carlos Roberto Ceron
UNESP – São José do Rio Preto

Prof^a. Dr^a. Alba Regina De Abreu Lima
FAMERP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
17 de dezembro de 2012

O presente trabalho foi realizado no Departamento de Biologia do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, da Universidade Estadual Paulista (IBILCE/UNESP), com auxílio financeiro da CAPES.

Dedico esta dissertação aos meus pais, Clemencia e Jaime, às minhas irmãs, Mariela e Nataly, ao meu filho Lucca David e ao meu marido Augusto,

Por sempre me apoiarem e me incentivarem em cada passo. Só cheguei até aqui pelo apoio e carinho de vocês.

A todos os meus amigos pelo incentivo constante e paciência, pois nos momentos difíceis longe da família vocês sempre me deram força como se fossem eles.

Obrigada, amo vocês!

Agradecimentos

Agradeço imensamente:

À Profª Drª Lilian Madi-Ravazzi pela paciência, incentivo, “puxões de orelha”, dedicação, respeito, ajuda incondicional e pelo carinho. Sem sua ajuda não conseguiria ter ido até o fim,

MUITO OBRIGADA PROFª LILIAN!

À Profª Drª Hermione Bicudo Campos Melara, por permitir a utilização de seu laboratório, para as análises das esterases.

Ào Prof Dr Eduardo Alves de Almeida, por ceder o espaço de seu laboratório para a realização dos experimentos.

Aos membros da banca examinadora pelas análises e correções para melhorar este trabalho.

A todos os funcionários do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto (UNESP/IBILCE) e, em particular, aos funcionários do Departamento de Biologia que sempre possibilitam, direta ou indiretamente, a realização das pesquisas científicas.

Agradecimentos especiais à secretaria Simone Carvalho Fernandes, ao técnico Sebastião Dias Barbosa, à Jucimara Colombo, ao Luís Roberto Faleiros e à Damaris de Freitas por serem sempre muito solícitos. Agradecimentos especiais também aos funcionários da Biblioteca e aos funcionários da Seção de Pós-graduação.

Agradeço, também, aos meus amigos de laboratório Letícia, Leiza, Mariana, Márcia, Elias, Wellintong, Maria Clara, Tiago, Thais Patarro, Karen, Denis, Allison, Andreia, Lucilene por estarem comigo fazendo parte desta jornada.

Ao órgão de Fomento CAPES pela bolsa concedida.

Aos meus familiares queridos de Santa Cruz, Tia Ema, Tio Wilmen, Tia Julia, Tia Felipa, Tio Carlos.

Aos amigos de Santa Cruz, minha cidade natal, Beatriz, Carola, Yovana.

RESUMO

D. melanogaster e *D. simulans* são espécies irmãs nativas da África tropical que divergiram de um ancestral comum a cerca de dois Myr. Estas espécies têm sido comparadas em vários traços, incluindo a morfologia, fisiologia, comportamento sexual, aloenzimas e outras proteínas, inversões cromossômicas, DNA nuclear e mitocondrial, elementos transponíveis, infecção por *Wolbachia* entre outros. Entretanto, estudos em populações da América do Sul, inclusive do Brasil, são escassos. O objetivo principal do trabalho foi comparar linhagens geográficas de *D. melanogaster* e *D. simulans* do Brasil, África e França, quanto à suscetibilidade ao inseticida DDT, ao padrão de beta e alfa esterases, principalmente em relação à frequência do polimorfismo da esterase-6 em indivíduos fenotipados como resistentes e suscetíveis, e a atividade da glutationa S-transferase. Ambas as espécies mostraram uma ampla variabilidade nos valores da CL_{50} obtidos. Os maiores valores foram observados nas linhagens africanas de *D. melanogaster* e *D. simulans*, TANA (447,89 $\mu\text{g/mL}$), e TANA-4 (920 $\mu\text{g/mL}$). A linhagem *Canton-S* de *D. melanogaster* foi a que apresentou o menor valor de $CL_{50} = 2,99 \mu\text{g/mL}$. Comparando as populações de mesma localidade de ambas as espécies verifica-se que as linhagens de *D. melanogaster* mostraram valores de CL_{50} maiores que os de *D. simulans*, com exceção da linhagem FLO onde *D. simulans* apresentou um valor de CL_{50} (94,60) ligeiramente superior ao de *D. melanogaster* (81,82). Foram analisadas duas bandas α -esterásicas, denominadas de α -1 e α -2, sendo que a banda α -2 foi observada em 100% de todos os indivíduos analisados de ambas as espécies. Os dados mostram maior variabilidade genética para *D. melanogaster* em relação à resistência ao DDT, alta resistência para as linhagens africanas de ambas as espécies, indicando que estas populações continuam sendo selecionadas por este ou outro inseticida, a inexistência de um cline para os alelos *S* e *F* nas linhagens de ambas as espécies, sugere-se que o tratamento com o DDT pode ter selecionado os indivíduos heterozigotos para algumas linhagens e isto pode ter mascarado o cline destas linhagens, ou mesmo um efeito de gargalo também não pode ser descartado. Quanto à análise da GST observou-se um sinergismo negativo entre a atividade da GST e o grau de resistência ao inseticida. A linhagem mais suscetível (*Canton S* de *D. melanogaster*) mostrou o nível mais alto de atividade da

GST e as linhagens mais resistentes (africanas de ambas as espécies), os níveis mais baixos.

Palavras-chave: resistência a inseticidas, *D. melanogaster*, *D. simulans*, padrão de esterases, polimorfismo da EST-6, GST.

ABSTRACT

D. melanogaster and *D. simulans* are sister species native to tropical Africa which diverged from a common ancestor about two Myr. These species have been compared in several traits, including morphology, physiology, sexual behavior, allozymes and other proteins, chromosomal inversions, nuclear and mitochondrial DNA, transposable elements, *Wolbachia* infection among others. However, studies in populations of South America, including Brazil, are scarce. The main objective of the study was to compare geographic strains of *D. melanogaster* and *D. simulans* from Brazil, Africa and France, for susceptibility to the insecticide DDT, the pattern of α and β esterases, especially in relation to the frequency of the polymorphism of esterase-6 in individuals phenotyped as resistant and susceptible, and the activity of glutathione-S-transferase. Both species showed a wide variability in LC_{50} values obtained. The highest values were observed in African strains of *D. melanogaster* and *D. simulans*, TANA (447.89 mg / mL), and TANA-4 (920 / mL). The Canton-S strain of *D. melanogaster* was the one with the lowest LC_{50} = 2.99 mg / mL. Comparing populations from the same location of both species the strains of *D. melanogaster* showed LC_{50} values larger than *D. simulans*, except FLO *D. simulans* strain had a LC_{50} (94.60) slightly higher than *D. melanogaster* (81.82). We analyzed two bands α -esterases, which we call α -1 and α -2, and the band α -2 was observed in 100% of all individuals analyzed in both species. The data show greater genetic variability for *D. melanogaster* for resistance to DDT, high resistance to African strains of both species, indicating that these populations continue to be selected by this or another insecticide, the lack of a cline for the F and S alleles in strains of both species, suggest that treatment with DDT may have selected individuals heterozygous for some strains, which may have masked the cline these strains, or a bottleneck effect cannot be ruled out. Regarding the analysis of GST was observed a negative synergism between the GST activity and the degree of resistance to the insecticide. The most susceptible strain (Canton S of the *D. melanogaster*) showed the highest level of GST activity and more resistant strains (both African species), the lowest levels.

Keyword: insecticide resistance, D. melanogaster, D. simulans, standard esterase, polymorphism of EST-6, GST.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 <i>Drosophila melanogaster</i> e <i>D. simulans</i> : tão similares e tão diferentes	14
1.2 Esterases	16
1.2.1 Est-6	18
1.3 Glutaciona S-transferases	20
1.4 <i>Drosophila</i> : Organismo modelo no estudo da resistência	21
2. OBJETIVOS	22
3. MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 Linhagens geográficas de <i>D. melanogaster</i> e <i>D. simulans</i>	25
3.2 Bioensaios com o inseticida DDT	25
3.3 Análises do padrão das esterases	27
3.3.1 Preparação das amostras	27
3.4 Testes com inibidores	28
3.5 Análise bioquímica da Glutaciona S-transferase (GST)	29
3.5.1 Preparação das amostras	29
3.5.2 Preparo de soluções para análise	29
3.5.3 Calibragem do espectrofotômetro e leitura das amostras	30
3.5.4 Análise da Proteína	30
3.5.5 Análises estatísticas da atividade da proteína GST	31
4. RESULTADOS	32
4.1 Avaliação das CL ₅₀ entre linhagens e entre espécies	32

4.2 Polimorfismos Esterásicos	34
4.2.1 β - esterases	34
4.2.2 α - esterases	42
4.2.3 Testes com inibidores	43
4.3 Avaliação dos níveis da atividade da GST	55
5. DISCUSSÃO	64
6. CONCLUSÕES ESPECÍFICAS	73
7. CONCLUSÃO GERAL	75
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Drosophila melanogaster* e *D. simulans*: tão similares e tão diferentes

D. melanogaster é uma espécie referência para vários tipos de investigações genéticas, principalmente depois de seu seqüenciamento. É uma espécie cosmopolita, pode ser coletada em vários lugares, inclusive no ambiente doméstico onde foi introduzida e transportada pelo homem (DAVID; CAPY, 1988) e devido a essa colonização e adaptação esta espécie também é uma referência em estudos ecológicos. Sua espécie-irmã *D. simulans*, que divergiu do seu ancestral comum há dois milhões de anos, possui características comuns, mas também diferenças significantes.

D. melanogaster e *D. simulans* são nativas da África tropical, estão amplamente distribuídas em regiões de temperaturas tropicais (DAVID; TSACAS, 1981) e usam principalmente recursos da fermentação de frutos para sua alimentação. Além disto, ocupam áreas geográficas similares, são simpátricas, porém diferentemente de *D. melanogaster*, *D. simulans* não ocupa a área doméstica (ROUAULT; DAVID, 1982; DAVID; TSACAS, 1983).

Apesar de serem consideradas espécies irmãs, *D. melanogaster* e *D. simulans* possuem muitas características significantemente diferentes que merecem ser investigadas (PARSONS, 1983; LEMEUNIER et al., 1986; SINGH; CHOUDHARY; DAVID, 1987; CHOUDHARY; COULTHAT; SINGH, 1992).

Quando comparamos a variabilidade dessas duas espécies, na maioria dos casos a de *D. simulans* é menor que a de *D. melanogaster* (HYYTIA et al., 1985; SINGH; CHOUDHARD; DAVID, 1987; AULARD et al., 2004) exceto quando comparamos a diversidade nucleotídica (AQUADRO; LADO; NOON, 1988).

O número de cópias de elementos transponíveis (TEs) é muito diferente nas duas espécies, Vieira e Biemont (2004) sugerem que isto pode estar correlacionado com a dinâmica da população e a história das duas espécies. Em *D. simulans*, por exemplo, há um número menor de cópias de TEs por família do que em *D. melanogaster* (LEIBOVITCH et al., 1992; CAGGESE et al., 1995; NUZDHIN, 1995; VIEIRA; BIÉMONT, 1996). A alta taxa de TEs em *D. melanogaster* pode estar associada com sua colonização mundial antiga enquanto a colonização de *D. simulans* é recente. Condições de estresse em um novo ambiente e cruzamentos

entre as populações migratórias podem explicar a mobilização dos TEs enquanto as moscas estão em processo de colonização (VIEIRA; BIEMONT, 2004).

Um importante aspecto da variabilidade genética das duas espécies é que por se tratar de espécies cosmopolitas são encontradas em várias regiões com diferentes latitudes e altitudes, o que gera variação clinal entre as populações e dentro das populações. Estudos feitos analisando o peso corporal, comprimentos de asa e tórax, abdômen e cerdas esternopleurais, número de ovariolos e pigmentação torácica indicaram uma diferenciação geográfica muito menor em *D. simulans* do que *D. melanogaster* e os clines latitudinais são menos pronunciados (GIBERT et al., 2004).

Análises morfométricas revelaram uma grande quantidade de diferenças significativas que podem estar relacionados à especiação e à divergência de nichos ecológicos dentro de cada espécie. Em numerosas variações geográficas observou-se algum tipo de adaptação climática (GILBERT et al., 2004). Curiosamente, investigações moleculares têm levado a mesma conclusão (BABA - AISSA; SOLIGNAC, 1984; HALE; SINGH, 1986; SINGH; CHOUDHARY ; DAVID, 1987).

As razões para essas diferenças permanecem a serem elucidadas. Uma possibilidade é que *D. simulans* tem uma taxa muito mais elevada de dispersão, e uma maior taxa de fluxo gênico entre as populações. De fato, há provavelmente algumas diferenças nas capacidades de vôo das duas espécies (PETAVY et al., 1997), mas não está claro quais das espécies é mais bem capacitada para migrar por longas distâncias.

Estas variações genético-geográficas das duas espécies têm, na maioria dos casos, um significado adaptativo, como revelado pela ocorrência de clinas latitudinais. Semelhantes tendências são encontradas em ambas as espécies, mas a amplitude de variação é muito maior em *D. melanogaster* (ANDERSON; OAKESHOTT, 1984 Apud SAAD et al., 1994)

As espécies são morfologicamente mais próximas, quando as populações tropicais são comparadas, e a divergência aumenta com a latitude, de modo que as populações de regiões temperadas são mais diferentes. Uma vez que ambas as espécies são nativas da África tropical (PÈRE et al., 1988) é provável que a maior parte da diferenciação morfológica seja um evento evolutivo relativamente recente, que acompanhou a colonização dos lugares mais frios e é posterior à especiação

em si (LACHAISE; SILVAIN, 2004). A variação clinal latitudinal existe em vários outros drosofilídeos e é geralmente interpretada como consequência de uma adaptação às condições climáticas locais (COPPIN et al., 2007).

Há muitas hipóteses que tentam explicar as similaridades e diferenças entre as duas espécies (CHOUDHARY; SINGH, 1987; SINGH; CHOUDHARY; DAVID, 1987; SINGH; LONG, 1992). E estas hipóteses podem ser divididas em dois grupos: um baseado no *background* genético e outro referente à manutenção dessas diferenças associadas com fatores populacionais, como tamanho efetivo da população, taxa migratória, pressão de seleção, nicho e colonização.

A população natural de *D. melanogaster* é bem mais estruturada que de sua espécie-irmã (CHOUDHARY; SINGH, 1987; SINGH; LONG, 1992;) e esta hipótese sugere que a plasticidade genética de *D. melanogaster* é maior que a de *D. simulans*.

Essas duas espécies têm sido comparadas por inúmeros traços, e o segredo de suas similaridades e diferenças está longe de ser elucidado, por isso a necessidade de investigações. Além do mais, *D. melanogaster* e *D. simulans* são modelos muito promissores para responder várias questões evolutivas.

A lista de diferenças entre as duas espécies provavelmente não está completa. Entretanto, um aspecto importante é a comparação da variabilidade genética entre elas, principalmente, pelo fato delas serem cosmopolitas e freqüentemente encontradas nas mesmas áreas geográficas, em diferentes latitudes e altitudes e sua variação pode ser acessada em dois níveis: dentro e entre populações.

1.2 Esterases

As esterases englobam um conjunto de enzimas geneticamente distintas que podem desempenhar funções diversificadas em um organismo e possui em comum, a propriedade de catalisar a hidrólise de ésteres. Além dos ésteres, as esterases tem a capacidade de atuar sobre outros substratos, hidrolisando peptídeos, amidas e haletos. O fato das enzimas com atividade esterásica poderem hidrolisar ligações não-éster, origina problemas para a terminologia e a classificação das mesmas.

Com base no efeito da presença de inibidores (reagentes sulfidrílicos, organofosfatos e sulfato de eserina), as esterases foram divididas em quatro classes: carboxilesterases, arilesterases, colinesterases e acetilesterases (HEYMANN, 1980, apud HEALY et al., 1991; OAKESHOTT et al., 1993).

Estas enzimas tem sido estudadas em bactérias (SHIMADA et al., 1993), fungos (NISCHIKAWA; LIZUKA, 1993), plantas (CHO et al., 1994; CARVALHO et al., 2003; SOUZA et al., 2005) e animais (CHAKRABORTI et al., 1993; LIMA-CATELANI et al., 2004; GLYNN et al., 2005). Trabalhos utilizando insetos mostraram sua participação em processos digestivos (KAPIN; AHMAD, 1980; JONES; BRANCOFT, 1986; ARGENTINE; JAMES, 1995), reprodutivos (RICHMOND; SENIOR, 1991; MIKHAILOV; TORRADO, 2000), regulação do hormônio juvenil (KORT; GRANGER, 1991; ZERA; HOLTMEIER, 1992; NASCIMENTO; BICUDO, 2002; KETHIDI et al., 2005) e degradação de inseticidas (MUTERO et al., 1994; FEYEREISEN, 1995; WANG et al., 2004; GUPTA et al., 2005).

Em *Drosophila*, dois grupos de esterases podem ser distinguidos com base no substrato hidrolisado *in vitro*, o grupo das α e β - esterases, que hidrolisam preferencialmente substratos como α -naftil e β -naftil acetato. O grupo das α -esterases inclui carboxilesterases, colinesterases e acetilesterases. O grupo das β esterases incluía somente carboxilesterases, entretanto, Mateus et al. (2009) detectou a presença de acetilesterases características da fase larval em espécies do complexo *mulleri*.

Os genes das α esterases apresentam uma organização em cluster. Em *D. melanogaster*, genes de 11 α -esterases foram mapeados na posição 84D3-5 no cromossomo IIIIR, formando um cluster (RUSSEL et al., 1996). Esterases específicas de machos que hidrolisam o α -naftil acetato foram observadas somente em espécies do grupo repleta (CERON, 1988; LAPENTA et al., 1995).

O grupo das β esterases tem sido estudado no gênero *Drosophila* e a maioria das espécies estudadas até o momento apresenta pelo menos duas β esterases, sendo uma presente em todas as etapas do desenvolvimento e outra restrita a fase larval, como a EST-6 (todo o ciclo) e EST-P(larval) de *D. melanogaster* (WRIGHT, 1963; DUMANCIC et al., 1997).

Mas, está claro que algumas esterases são de ampla especificidade ao substrato e são capazes de hidrolisar ésteres endógenos e exógenos, de estruturas

muito diferentes. Muitos pesticidas, drogas e outros produtos químicos sintéticos são ésteres. Os grupos organofosforados, carbamatos e piretróides são inseticidas que se encontram nesta categoria (WALKER; MACKNESS, 1983). Daí a relação entre ação de inseticidas, resistência e esterases.

1.2.1 *Est-6*

A EST6 é uma carboxilesterase (E.C.3.1.1.1) cujo gene estrutural foi mapeado na região proximal do braço esquerdo do cromossomo III em *D. melanogaster* (WRIGHT, 1963). O locus *Est-6* é polimórfico para duas principais aloenzimas na maioria das populações de *D. melanogaster* (OAKESHOTT et al., 1987). Oakeshott et al. (1981) descreveram clines latitudinais nas frequências alélicas das aloenzimas para populações de três continentes. A aloenzima EST-F é mais rara e a EST-S é mais frequente com o aumento da distância do equador. Um padrão clinal semelhante existe para o loco *Est-6* de *D. simulans*, espécie irmã de *D. melanogaster* (ANDERSON; OAKESHOTT, 1984). No entanto, não existe uma relação consistente entre a variação geográfica nas frequências aloenzimáticas e mudanças temporais nas frequências enzimáticas em localidades únicas (RICHMOND, 1982).

Cochrane e Richmond (1979) usando critérios de termoestabilidade in vitro, encontraram quatro variantes de EST6-F e três dentro de EST6-S em *D. melanogaster*. Cooke et al., (1987) usou eletroforese de alta resolução em acetato de celulose e detectou um total de dez aloenzimas de EST6 para esta espécie. Estas aloenzimas foram classificadas em cinco principais classes, EST6-U, EST6-VF, EST6-F', EST6-F e EST6-S, separadas por diferenças relativamente grandes na mobilidade eletroforética. As três primeiras classes são incomuns e cada uma contém uma única aloenzima. Entretanto, as classes mais comuns, EST6-F e EST6-S contêm respectivamente, três e quatro variantes com menor mobilidade (LABATE et al, 1989).

Cooke e Oakeshott (1989) sequenciaram toda região codificante da *Est-6* em 13 linhagens de *D. melanogaster* de uma população australiana (escolhida por incluir todas as variantes aloenzimáticas conhecidas na população). Eles sugeriram que as isoenzimas *F* e *S* diferem em dois aminoácidos (Asn/Asp na posição 237 e

Thr/Ala na posição 247) (maiores detalhes em HASSON; EANES, 1996; BALAKIREV et al., 1999) e consideraram estas duas substituições de aminoácidos como os alvos mais prováveis para a seleção subjacente às clines latitudinais previamente detectadas para as isoenzimas de *F* e *S*. Hasson e Eanes (1996) investigaram o polimorfismo de nucleotídeos da *Est-6* na região codificadora de 16 linhagens de diferentes lugares do mundo, selecionados com base na presença/ausência da inversão cosmopolita *In(3L)Payne*, e detectaram polimorfismos compartilhados entre os cromossomos *St* e *In(3L)Payne*, indicando grande fluxo gênico entre os arranjos. Balakirev et al. (1999) sequenciaram 15 alelos da região codificadora da *Est-6* de uma população californiana e encontraram dois haplótipos altamente diferenciados, um contendo os alelos *F*, e o outro consistindo de alelos *S*. Também foi detectado um pico distinto de aumento na variação na região ao redor do sítio de substituição, responsável pelo polimorfismo de EST6 F/S e sugeriram que a seleção balanceada pode estar envolvida no polimorfismo.

Todos estes estudos envolvem amostras que são muito pequenas (BALAKIREV et al, 1999.), não-casuais, ou ambas (COOKE; OAKESHOTT, 1989; HASSON; EANES, 1996) e, portanto, inadequados para muitos testes genéticos de população (BALAKIREV; BALAKIREV; AYALA, 2002).

Muitos estudos têm detectado a seleção envolvida no polimorfismo destas variantes da EST-6. Entretanto, a natureza da seleção detectada diverge nestes diferentes estudos (OAKESHOTT et al, 1989; RICHMOND et al. 1990).

Um dos principais problemas destes estudos iniciais é a dificuldade de se medir aspectos do valor adaptativo que seriam relevantes para a função da EST6. Os primeiros estudos envolveram a seleção dependente da frequência (HEALY; DUMANCIC; OAKESHOT, 1991), ou os efeitos do estresse em altas temperaturas (WHITE; MANE; RICHMOND, 1988) ou altas concentrações de certos ésteres no alimento. A EST-6 é encontrada em grandes quantidades no ducto ejaculatório de machos adultos (RICHMOND et al, 1990; SHEEHAN; RICHMOND; COCHRANE, 1979; HEALY; DUMANCIC; OAKESHOTT, 1991). Esta enzima é encontrada em baixos níveis em tecidos digestivos e outros (olhos, antenas, aparelho bucal, esôfago, hemolinfa, músculo torácico, pernas e asas de ambos os sexos e nos órgãos reprodutivos de fêmeas virgens). Em larvas no 3º instar larval a

atividade da EST6 foi detectada na hemolinfa, corpo gorduroso e discos imaginiais (HEALY; DUMANCIC; OAKESHOTT, 1991).

A proteína EST6 dos machos é transferida para as fêmeas nos primeiros minutos da cópula pelo fluido seminal e afeta o comportamento da fêmea, no sentido de estímulo à utilização dos espermatozoides e na oviposição e reduz sua receptividade a um novo acasalamento (GILBERT; RICHMOND, 1982; SCOTT, 1986). Entretanto, não foram encontradas diferenças consistentes na comparação dos genótipos *Est-6F* e *Est-6S* quanto a estes componentes reprodutivos do valor adaptativo (GILBERT, 1985; MIEKLE; RICHMOND, 1991).

Saad et al (1994) estudaram cinco componentes do valor adaptativo em 18 isolinhagens de *D. melanogaster* polimórficas para diferentes isoformas dos alelos de *Est6* e a principal diferença obtida por estes autores mais para a quantidade das enzimas do que para a sua estrutura, e as diferenças variaram entre os componentes do valor adaptativo testados. E estas diferenças significantes foram para as variantes com menor mobilidade dentro de ambas as classes de EST6, S e F.

1.3 Glutathione S-transferases

As Glutathione S-transferases (GSTs, EC 2.5.1.18) são enzimas codificadas por uma família gênica e existem em organismos pro e eucariotes. Estas enzimas estão envolvidas em muitas atividades fisiológicas tais como detoxificação de compostos xenobióticos e endógenos, transporte intracelular, biossíntese de hormônios e proteção contra stress oxidativo (ENAYATI; RANSON; HEMINGWAY, 2005). Estas enzimas diméricas catalizam a reação de conjugação do tri-peptídeo glutathione (GSH) com os compostos eletrofílicos, aumentando a solubilidade dos produtos tornando mais fácil sua excreção (ARMSTRONG, 1997).

Estas isoenzimas estão divididas de acordo com a sua localização celular em três principais categorias: GSTs citosólicas, microsossomais e mitocondriais. Até o momento somente os dois primeiros grupos têm sido encontrados nos insetos (JAKOBSSON et. al, 1996; HAYES, 2005). As GSTs citosólicas são proteínas que estão compostas de 200 a 250 aminoácidos e são ativas como homodímeros ou heterodímeros. Baseados na sequência homóloga da região N-terminal,

especificidade de substrato, imuno-reatividade, e sensibilidade a diferentes inibidores, as GSTs citosólicas nos insetos têm sido divididas em seis classes (Delta, Épsilon, Omega, Sigma, Theta e Zeta) (DING et al., 2003; RANSON et al., 2001).

As classes Delta e Épsilon são únicas e existem somente nos insetos. Estudos recentes têm observado a relação entre as GSTs e resistência a inseticidas em insetos (PEMPLE; TAYLOR, 1992).

Estudos recentes têm focado sobre a relação das GSTs e a resistência a inseticidas em insetos e tem sido demonstrado que as GSTs citosólicas (principalmente Delta e Epsilon) estão envolvidas na resistência a DDT/organofosfatos (ENAYATI; RANSON; HEMINGWAY, 2005). Em *Aedes aegypti* foi mostrado o envolvimento da GSTe2 e GSTe7 na resistência ao DDT e ao piretroíde Deltametrina (LUMJUAN et al., 2011) e em *Tribolium castaneum* a existência de diferentes classes de GSTs podem também estar envolvidas na detoxificação de diferentes inseticidas (SHI et al., 2012).

Tem sido verificado que alguns componentes ambientais induzem e aumentam a expressão das GSTs, assim certas GSTs têm sido utilizadas como biomarcadores da poluição ambiental (PEREZ-LOPES; NOVOA-VALINAS; MELGAR-RIOL, 2002; AYOOLA; GARCIA-ALONSO; HARDEGE, 2010). Além disto, pesquisas com GSTs humanas têm focado sobre como alguns polimorfismos da GSTs estão associados com a suscetibilidade ao câncer (VRANA et al., 2009; CHEN, et al., 2010).

1.4 *Drosophila*: Organismo modelo no estudo da resistência

D. melanogaster tem sido utilizada como organismo modelo para o entendimento dos mecanismos de resistência e de sua evolução. A utilidade desta espécie não é somente devida à descoberta de que populações naturais têm desenvolvido resistência a xenobióticos liberadas no ambiente pelo homem, mas também devido às inúmeras vantagens genéticas desta mosca, fácil acasalamento, rápido ciclo de vida, pequeno número de cromossomos.

D. simulans, espécie críptica de *D. melanogaster*, também tem sido utilizada para o estudo de resistência a inseticidas devido à abundância de informações bioquímicas e genéticas disponíveis para esta espécie (WILSON, 1988; FFRENCH-

CONSTANT et al., 1993; WINDELSPECHT et al., 1995). Estudos têm demonstrado que estas espécies exibem uma resposta diferencial à seleção por inseticida (WALLACE, 1986; WINDELSPECHT et al., 1995; GRANZOTTO, 2007), fazendo delas um sistema atrativo para o estudo dos efeitos da seleção sobre espécies simpátricas.

Resistência é definida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como “O desenvolvimento, em uma linhagem de um organismo, da capacidade de tolerar doses de tóxicos que são letais para a maioria dos indivíduos em uma população normal (susceptível) da mesma espécie” (ANONYMOUS, 1957 apud SCOTT, 1995). Scott (1995) acrescenta que a resistência é a expressão fenotípica em uma população, de um traço herdável que já foi expresso em alguns dos indivíduos em uma população antes da exposição ao tóxico, sendo um evento pré-adaptativo.

A resistência a inseticidas é um dos maiores obstáculos que impedem o controle de pestes de importância agrícola e médico-sanitária. A resistência resulta em aumento das taxas de aplicação dos inseticidas, diminuindo a produção, causando danos ambientais, e a disseminação de doenças animais e humanas quando os vetores não podem ser controlados (PIMENTEL et al., 1992).

Dinamicamente, as populações de insetos suscetíveis expostas a toxinas por um período de tempo são gradualmente substituídas pelas populações resistentes (ROUSH; MCKENZIE, 1987; MCKENZIE, 1993; MCKENZIE, 1996).

Os tipos mais comuns de resistência encontrados nos insetos são a desintoxicação enzimática aumentada e a insensibilidade ao sítio alvo (AGOSIN, 1985; OPPENOORTH, 1985). A resistência mediada pelas monooxigenases é provavelmente o tipo mais freqüente de metabolismo baseado na resistência à inseticida (HODGSON; KULKARNI, 1983; OPPENOORTH, 1985; BRATTSTEN et al., 1986; SCOTT; ROUSH; LIU, 1991), embora em alguns casos a resistência mediada pelas esterases (HEMINGWAY; KARUNARATNE, 1998) e pelas glutathione S-transferase (YU, 1996) sejam também importantes. Dessa forma, acredita-se que as famílias multigênicas como o citocromo P450, glutathione S-transferase e esterases forneçam meios para os animais se defenderem dos xenobióticos e de desafios do meio ambiente, tais como as plantas tóxicas e produtos químicos e microbianos encontrados nos alimentos e nas drogas, pesticidas ou poluentes orgânicos (FEYEREISEN, 1999; SCOTT; KASAI, 2004; Le GOFF et al., 2006).

Há consenso sobre o fato de que a resistência a inseticida contribui positivamente para a população de inseto-praga através da adaptação dos indivíduos ao uso de inseticidas: a dúvida começa quando o uso de inseticida é interrompido ou drasticamente modificado, circunstância em que a resistência a inseticida pode não ser tão útil (COUSTAU; CHEVILLON; FFRENCH-CONSTANT, 2000). Esse é um assunto que merece ser investigado cujos resultados poderão ajudar a suprimir ou retardar a evolução da resistência (COUSTAU; CHEVILLON; FFRENCH-CONSTANT, 2000).

Muitos exemplos de custos fisiológicos de importância prática têm sido associados com a resistência a inseticidas (COUSTAU; CHEVILLON; FFRENCH-CONSTANT, 2000; McCARROLL; HEMINGWAY, 2002). A diversidade de padrões de resistência pode impor diferentes custos sobre as populações resistentes favorecendo a fixação de alguns fenótipos resistentes sob determinadas condições ambientais (COUSTAU; CHEVILLON; FFRENCH-CONSTANT, 2000)

A resistência ao DDT (DDT-R) está se aproximando de uma fixação global, na espécie *D. melanogaster*, mesmo após ter sido abolido o uso intenso do DDT em atividades agrícolas, embora ainda utilizado no controle de insetos vetores (CATANIA et al., 2004). Os autores sugerem que isso pode ser devido a outro inseticida que continuou a seleção, por resistência cruzada ou porque esse loco parece ter pouco ou nenhum efeito sobre o valor adaptativo das moscas que o transportam (WILSON, 2005; McCART; BUCKLING; FFRENCH-CONSTANT, 2005).

2. OBJETIVOS

O presente estudo teve por objetivo avaliar a variabilidade genética de linhagens geográficas de *Drosophila melanogaster* e *Drosophila simulans* procedentes do Brasil, África e França, quanto à:

- Suscetibilidade ao inseticida DDT por meio da CL_{50} ;
- A frequência das α e β -esterases em indivíduos resistentes e suscetíveis;
- A atividade da enzima Glutathione S-transferase (GST) em indivíduos resistentes e suscetíveis.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Linhagens geográficas de *D. melanogaster* e *D. simulans*

As linhagens que foram utilizadas, procedentes de diferentes regiões geográficas do Brasil, África e França estão discriminadas na Tabela 1. Os experimentos foram realizados em câmara de temperatura constante a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ com meio de cultura padrão de banana e fermento biológico (*Saccharomyces cerevisiae*).

3.2 Bioensaios com o inseticida DDT

Para os bioensaios com o DDT, moscas virgens dos estoques de todas as linhagens de *D. melanogaster* e *D. simulans* foram separadas por sexo e armazenadas em frascos de vidro contendo meio de cultura padrão de banana-fermento até a idade de quatro dias. Estas moscas foram colocadas em frascos específicos para o teste (frascos de cintilação de 20 ml) previamente preparados como segue: 200µl de solução de inseticida (preparada com acetona a partir de uma solução estoque de 1000µg DDT/mL de acetona) e aplicada no frascos de cintilação nas concentrações: 0; 5; 10; 30; 50; 100; 150; 200µg/mL. Para cada concentração testada foram realizadas quatro réplicas.

Após a aplicação da solução, os frascos foram continuamente movimentados até que a acetona evaporasse totalmente. Depois de 4 horas, 25 moscas foram colocadas em cada um dos frascos de cintilação e estes foram fechados com algodão embebido em solução açucarada (sacarose 5%) para fornecer alimento, água e evitar a dessecação das moscas. A mortalidade foi computada 24 horas após a exposição ao inseticida. A partir dos dados da mortalidade foi calculado a CL_{50} de cada linhagem por meio do programa POLO PC (1987).

Tabela 1. Espécies, procedência geográfica, símbolo e ano de coleta das linhagens de *D. melanogaster* e *D. simulans*.

Espécie	Procedência	Linhagens	Ano de coleta
<i>D. melanogaster</i>	Lagarto/SE	SE	2004
	Mucuri/BA	MUC	2005
	Ubatuba/SP	UBA	2010
	São José do Rio Preto/SP	RP-08	2008
	Florianópolis/SC	FLO	2009
	Bento Gonçalves/RS	BG	2006
	África	TANA	2011
	<i>Canton</i>	<i>Canton-S</i>	-
<i>D. simulans</i>	Mucuri/BA	MUC	2005
	São José do Rio Preto/SP	RP-08	2008
	Florianópolis/SC	FLO	2009
	Bento Gonçalves/RS	BG	2006
	África	TANA-4	2011
	França	GIF-2	2011

3.3 Análises do padrão das esterases

Foram selecionadas moscas controle para a análise do padrão de esterases das diferentes linhagens. As moscas foram congeladas para análise posterior, em um prazo máximo de 30 dias. O número total de moscas submetidas à eletroforese foi de 560 moscas, 40 para cada linhagem, sendo 20 fêmeas e 20 machos.

3.3.1 Preparação das amostras

As moscas foram maceradas em tubos *ependorfs* contendo 20 μ L da solução tampão da amostra a 10% (Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8 + 10% glicerol) e deixadas em repouso por aproximadamente dez minutos. Durante este procedimento as amostras ficaram sob gelo. Deste homogeneizado foram retirados 10 μ L do sobrenadante para aplicação nos poços do gel.

Preparação dos géis e identificação das esterases

O padrão de esterases foi analisado em géis de poliacrilamida a 12% e géis de empilhamento a 4%, seguindo a técnica de Laemmli (1970). Após a aplicação das amostras, os géis foram submetidos à eletroforese por aproximadamente quatro horas, sob voltagem constante de 200 v, utilizando-se tampão de corrida Tris-glicina 0,1M pH 8,3 no interior da cuba.

As esterases foram identificadas nos géis seguindo as técnicas descritas por Johnson *et al* (1966) e Steiner e Johnson (1973). Após a eletroforese os géis foram pré-incubados por 45 minutos em 50 mL de tampão fosfato 0,1M, pH 6,2, em temperatura ambiente ($\sim 25^{\circ}\text{C}$). Feito isto, o tampão foi retirado e adicionado a solução de coloração preparada com 100 mL da solução aquosa de tampão fosfato 0,1M, pH 6,2; 0,09 gr β -naftil acetato; 0,09 gr de α -naftil acetato (como substrato); 0,12 gr de Fast Blue RR e 10 mL de N-propanol. Os géis permaneceram incubados na solução corante por aproximadamente 1 hora, na ausência de luz.

Após este tratamento, foram visualizadas nos géis bandas pretas, vermelhas e/ou magenta pelo fato de que as esterases hidrolisam os substratos

diferentemente. Quando hidrolisam preferencialmente o α -naftil acetato as bandas nos géis coram-se de preto e são chamadas de α -esterases. Quando hidrolisam preferencialmente o β -naftil acetato as bandas nos géis coram-se de vermelho e são chamadas β -esterases. Quando hidrolizam ambos, α e β -naftil acetato, as bandas coram-se de magenta e são chamadas de α/β -esterases.

Decorrido o tempo estabelecido, os géis foram submetidos à solução descorante contendo 250 mL de álcool etílico, 100 mL de ácido acético e 650 mL de água destilada. Os géis foram secos a temperatura ambiente, seguindo técnica de Ceron, Santos e Bicudo (1992).

3.4 Testes com inibidores

Nestes testes foram utilizados os seguintes inibidores separadamente: diazon a 40% e prostigmina 0,5 mg/ml.

As amostras foram maceradas previamente em 20 μ l de tampão de amostra e um volume de 10 μ l do sobrenadante de cada amostra foi aplicado em três géis. Esses géis continham as amostras de três linhagens em duplicata. Após a eletroforese (220 v, 4 horas) o gel foi cortado em dois. Uma parte do gel foi pré-incubado com o inibidor diazon a 40% por 45 min, feito isso essa solução foi retirada e foi acrescentado uma solução de coloração mais o inibidor diazon a 40%. A outra parte do gel foi pré-incubada com uma solução tampão de fostato (pH=6,2) e corado seguindo-se o procedimento normal mais 1mL de acetona, sem qualquer inibidor (controle).

Nos experimentos utilizando o inibidor prostigmina, o preparo dos géis foi semelhante ao descrito anteriormente para o experimento com o diazon. Esses géis continham as amostras de três linhagens e a sua réplica. Após a eletroforese, o gel foi cortado pela metade, sendo que na primeira metade foi realizado a adição de 2 ampolas do inibidor prostigmina a 0,5 mg/ml durante a pré-incubação, ficando até a solução de coloração. A outra metade foi pré-incubado e corado seguindo-se o procedimento normal, sem qualquer inibidor (controle).

3.5 Análise bioquímica da Glutathione S-transferase (GST)

Para a análise bioquímica da glutathione S-transferase primeiramente foram selecionadas moscas com fenótipos resistentes e suscetíveis de todas as linhagens. Isto foi feito submetendo moscas de quatro dias de idade ao bioensaio com o DDT, utilizando a CL_{50} previamente estabelecida no experimento descrito no item 3.2. As moscas foram congeladas (- 80° C) para análise posterior, em um prazo máximo de 30 dias. O número de amostras analisadas foi de 4200 moscas sendo 300 para cada linhagem, sendo 150 fêmeas e 150 machos.

3.5.1 Preparação das amostras

A atividade da GST foi avaliada pelo método de Keen, Habig e Jakoby (1976). De cada linhagem, para cada fenótipo, foram utilizadas 10 moscas para a preparação de cada homogeneizado. Para cada linhagem foram efetuadas cinco réplicas. As moscas (10) foram maceradas em tubos *ependorfs* contendo 400 μ L da solução tampão fosfato 0,2 mM, pH 7,5 e centrifugadas a 9000 rpm, por aproximadamente vinte minutos. Foram retirados 400 μ L do sobrenadante, que foram colocados em novos *ependorfs* e centrifugados a 50000 rcf, por aproximadamente uma hora. Foram retirados 400 μ L do sobrenadante e transferidos para três *ependorfs* separados em três alíquotas. Uma das alíquotas foi utilizada para a análise da GST, outra foi utilizada para a análise da proteína, e a terceira foi armazenada. Todas as amostras assim preparadas foram acondicionadas à temperatura de - 80°C para posterior análise.

3.5.2 Preparo de soluções para análise

Solução 1

Em um *ependorf* foi adicionado 61,46 mg da GSH (glutathione reduzida) e 1mL de tampão fosfato 0,2 M, pH 6,5.

Solução 2

Em um *ependorf* foi adicionado 40,51 mg de CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno) e 1mL de etanol absoluto, ambas as soluções foram sonicadas por um minuto.

As soluções 1 e 2 assim preparadas foram colocadas sob gelo.

Solução 3

Solução tampão fosfato 0,2 M, pH 6,5 que foi colocada em banho- maria a 30°C.

3.5.3 Calibragem do espectrofotômetro e leitura das amostras

Antes de iniciarmos as análises das amostras o espectrofotômetro foi zerado. Para isto foi utilizado 1000 µL de solução tampão de fosfato (pH = 6,5). Em seguida foi feita a hidrólise com 980µL de solução tampão adicionando 10µL de GSH mais 10µL de CDNB e a absorbância foi lida a 340 nm, por 1 minuto.

Depois deste procedimento iniciou-se o preparo das cubetas para a análise das amostras. Em uma cubeta foi adicionado 10µL da solução de 200mM de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), 10µL da solução de 200mM de GSH e 20µL da amostra a ser analisada (uma alíquota, anteriormente obtida descrito no item 3.4.1), sendo a absorbância medida a 340 nm por 1 minuto. Este procedimento foi feito com todas as réplicas das linhagens resistentes e suscetíveis e seu controle.

3.5.4 Análise da proteína

Para esta análise foi utilizada a segunda alíquota das amostras obtida conforme item 3.4.1.

Inicialmente preparou-se a curva com concentrações conhecidas de proteína, utilizando-se uma solução de Albumina de Soro Bovino (BSA) diluída no tampão que foi utilizado para a homogeneização das alíquotas, colocando nos *ependorfs* contendo o reativo de Bradford (Sigma-Aldrich) nas diferentes concentrações (10, 20, 30, 40 e 50µL). Feito isto, foram preparadas as amostras (segunda alíquota)

conforme segue. Em novos *ependorfs* foram colocados 20 μ L das amostras mais 980 μ L da solução de Bradford pura. Este procedimento também foi feito em duplicata. Depois de homogeneizadas manualmente as soluções, (invertendo os *ependorfs* por cinco vezes), as amostras foram colocadas no escuro por 40 minutos, juntamente com as amostras da curva.

Após zerar o espectrofotômetro como a solução de Bradford puro, as amostras podem ser submetidas à leitura. Em primeiro lugar analisam-se as soluções de Bradford em diferentes concentrações para obter a curva de calibração. São utilizadas as duas réplicas. Feito isto, inicia-se a leitura das amostras.

3.5.5 Análises estatísticas da atividade da proteína GST

A análise foi realizada através da utilização do programa Statistica 7.1 (Statsoft). Foram feitas comparações das linhagens resistentes e suscetíveis de ambas as espécies, procedentes do Brasil, África e França. Foi realizado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk's, seguido do teste de homogeneidade das variâncias (Levene) e quando os dados eram paramétricos, foi aplicado ANOVA One-Way, seguido do teste de Tukey HSD, caso os dados eram não paramétricos, foi aplicado Kruskal-Wallis. As diferenças estatisticamente significantes foram aceitas somente para $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Avaliação das CL₅₀ entre linhagens e entre espécies

Os bioensaios com o DDT realizados nas sete linhagens geográficas e uma linhagem de laboratório (*Canton-S*) da espécie *Drosophila melanogaster* e nas seis linhagens geográficas de *Drosophila simulans* mostraram uma ampla variabilidade nos valores da CL₅₀ obtidos. Os maiores valores foram observados nas linhagens africanas de *D. melanogaster* e *D. simulans*, TANA (447,89), e TANA-4 (920). A linhagem *Canton-S* de *D. melanogaster* foi a que apresentou o menor valor de CL₅₀ = 2,99 (Tabela 2).

Nas linhagens brasileiras de *D. melanogaster* os maiores valores da CL₅₀ foram obtidos para UBA (263,70), seguidos por BG, RP e FLO, e os menores foram para SE e MUC (Tabela 2).

Para as linhagens brasileiras de *D. simulans* o maior valor obtido de CL₅₀ foi para a linhagem FLO, igual a 94,60 µg/mL, as outras linhagens, RP, BG e MUC mostraram valores mais baixos. Como já destacados anteriormente, a linhagem TANA-4 da África foi a que apresentou maior valor da CL₅₀ de todas as linhagens analisadas das duas espécies. Na linhagem GIF-2 da França, o valor da CL₅₀ foi de 84,64 µg/mL.

Comparando as populações de mesma localidade de ambas as espécies verifica-se que as linhagens de *D. melanogaster* mostraram valores de CL₅₀ maiores que os de *D. simulans*, com exceção da linhagem FLO onde *D. simulans* apresentou um valor de CL₅₀ (94,60) ligeiramente superior ao de *D. melanogaster* (81,82). Na comparação das linhagens africanas, *D. simulans* mostrou o dobro do valor da CL₅₀ de *D. melanogaster*, como já destacado acima.

Tabela 2. Valor da CL_{50} ($\mu\text{g/mL}$) para o inseticida DDT nas linhagens de *D. melanogaster* e em *D. simulans* de diferentes procedências geográficas. C = número de moscas controle, sem o tratamento com o DDT. N = número de moscas submetidas ao tratamento com o inseticida nas diferentes concentrações,

Espécies	Linhagens	Procedência geográfica	C/N	CL_{50}
<i>D. melanogaster</i>	TANA	África	75/700	447,89
	UBA	Ubatuba/SP	75/700	263,70
	BG	Bento Gonçalves/RS	75/700	107,55
	RP	São José do Rio Preto/SP	75/500	95,11
	FLO	Florianópolis/SC	75/500	81,82
	SE	Lagarto/SE	75/500	65,75
	MUC	Mucuri/BA	75/500	53,87
	Canton-S	—	75/300	2,99
<i>D. simulans</i>	TANA-4	África	75/700	920
	FLO	Florianópolis/SC	75/500	94,60
	GIF-2	França	75/500	84,64
	RP	São José do Rio Preto/SP	75/500	26,06
	BG	Bento Gonçalves/RS	75/500	14,14
	MUC	Mucuri/BA	75/500	10,58

4.2 Polimorfismos Esterásicos

4.2.1 β -esterases

Na análise do padrão de esterases das linhagens das espécies *D. melanogaster* e *D. simulans* foram observadas mais frequentemente e mais visivelmente pela metodologia empregada, duas bandas β -esterásicas características, que foram aqui diagnosticadas como a esterase-6 em suas formas alélicas S e F (Figuras 1 a 17).

Duas bandas α -esterásicas mais frequentemente identificadas também foram consideradas nesta análise, a α -1 e a α -2. Sendo que a α -2 foi observada em 100% dos indivíduos (Figuras 1 a 17).

As bandas β -esterásicas, consideradas como a EST-6, as quais têm afinidade pelo substrato β -naftil acetato e coram-se em tom magenta, foram classificadas em três fenótipos: fast (*F/F*), slow (*S/S*) e fast/slow (*F/S*) entre os indivíduos resistentes e susceptíveis de ambas as espécies.

Em uma análise geral da frequência dos fenótipos *S/S*, *F/F* e *S/F*, foi verificada uma alta variação entre as linhagens de *D. melanogaster* e *D. simulans* e destacamos abaixo os principais resultados, contidos nas tabelas 4 e 5.

Nas linhagens brasileiras resistentes de *D. melanogaster*, o fenótipo mais comum nas fêmeas foi o *F/F* (41%) seguido pelo *S/F* (32%), destaca-se que a linhagem de BG apresentou 100% de frequência do fenótipo *F/F*. Nas linhagens FLO, RP e *Canton-S* não foi observado o fenótipo *S/S* e 100% das fêmeas de UBA foram *S/S* (tabela 4).

As fêmeas resistentes da linhagem africana, TANA, mostraram frequências semelhantes para os fenótipos *S/S* (60%) e *S/F* (40%)

Diferentemente das fêmeas, o fenótipo mais comum dos machos das linhagens brasileiras foi o *S/F* (58%). Os machos BG apresentaram 100% do fenótipo *S/F*, nas linhagens RP e MUC houve ausência do fenótipo *S/S* e em FLO e *Canton-S* ausência do fenótipo *F/F*.

Os machos resistentes da linhagem africana, TANA, mostraram uma frequência aumentada para o fenótipo *S/S* (70%) e ausência do fenótipo *F/F*.

Nas fêmeas suscetíveis das linhagens brasileiras de *D. melanogaster*, o fenótipo mais comum foi o S/S (46%). As fêmeas da linhagem *Canton-S* foram 100% F/F. Em TANA, foi observada uma frequência maior do fenótipo S/S (66,7%) e ausência de F/F.

Nos machos susceptíveis das linhagens brasileiras de *D. melanogaster* o fenótipo mais comum foi S/F (61%). Para *Canton-S* e TANA, o fenótipo mais frequente foi S/F, respectivamente, 100 e 66,7%.

Com relação a todos os indivíduos resistentes das linhagens brasileiras de *D. melanogaster* foi observado que o fenótipo S/F apresentou a maior porcentagem (46%) seguida pelo fenótipo F/F (30%). A maior frequência de S/F também foi observada em *Canton-S* (52,6%). Já para a linhagem TANA, os fenótipos S/F e S/S foram os mais frequentes, respectivamente 55 e 40%.

Com relação a todos os indivíduos suscetíveis das linhagens brasileiras de *D. melanogaster* os fenótipos S/F (46,9%) e S/S (40,5%) foram os mais comuns. Para *Canton-S* os fenótipos F/F e S/F apresentaram 50% de frequência cada. E na linhagem africana, TANA, o fenótipo S/S foi o mais comum, com 60% de frequência.

Na avaliação de todas as linhagens de *D. melanogaster* quanto aos fenótipos, verifica-se uma maior porcentagem do fenótipo S/F para as resistentes (45,8%) e suscetíveis (45,7%), embora para as suscetíveis o fenótipo S/S também tenha mostrado uma porcentagem equivalente (37,7%) ao heterozigoto.

Nas linhagens brasileiras resistentes de *D. simulans* (tabela 5), o fenótipo mais comum nas fêmeas foi o F/F (50%) semelhante ao observado para *D. melanogaster*. Para a linhagem africana, TANA-4, e a francesa, GIF-2, o fenótipo S/S foi o mais comum, respectivamente, 60 e 66,7%.

O fenótipo mais comum dos machos resistentes das linhagens brasileiras de *D. simulans* foi o S/F (60,5%), semelhante ao observado para os machos de *D. melanogaster*. Para os machos de TANA-4, e para os de GIF-2 o fenótipo mais frequente foi o S/F, respectivamente, 80 e 60%.

Nas fêmeas suscetíveis das linhagens brasileiras de *D. simulans*, o fenótipo mais comum foi o F/F (70%), para a linhagem TANA-4 e GIF-2 o fenótipo S/S foi o mais comum, 66,7 e 100% respectivamente.

Nos machos suscetíveis de *D. simulans*, o fenótipo F/F foi o mais comum (62,2%) semelhante ao observado nas fêmeas suscetíveis. Em TANA-4, os

fenótipos S/S e S/F foram igualmente frequentes (44,4%). E para GIF-2, F/F, foi o mais comum (60%).

Com relação a todos os indivíduos resistentes das linhagens brasileiras de *D. simulans* foi observado que o fenótipo S/F apresentou a maior porcentagem (55,9%), semelhante ao observado em *D. melanogaster*. Para TANA-4 os fenótipos S/F e S/S foram semelhantes em frequência, 55 e 40% respectivamente. Em GIF-2 o fenótipo mais comum foi o S/S (60%).

Com relação a todos os indivíduos suscetíveis das linhagens brasileiras de *D. simulans* foi observado que o fenótipo F/F apresentou a maior porcentagem (66,2%). Para TANA-4 os fenótipos S/S e S/F foram semelhantes em frequência, 55 e 40% respectivamente. Em GIF-2 o fenótipo mais comum foi o S/S (60%), semelhante ao observado nas linhagens resistentes desta linhagem.

Na avaliação de todas as linhagens de *D. simulans* quanto aos fenótipos, verifica-se uma maior porcentagem do fenótipo S/F para as resistentes (51%) e para as suscetíveis uma maior porcentagem para F/F (48,1%), embora para as suscetíveis o fenótipo S/F também tenha mostrado uma frequência equivalente (30,6%).

Na tabela 7 encontram-se o número total e a porcentagem quanto aos fenótipos S/S F/F e S/F da β esterase-6, de todos os indivíduos analisados das espécies *D. melanogaster* e *D. simulans*.

Para *D. melanogaster* foram analisados 296 indivíduos, sendo 144 fêmeas e 152 machos. Para as fêmeas a frequência dos fenótipos foi equivalente, mas para os machos o fenótipo S/F apresentou maior frequência (61,2%) do que ambos os homozigotos.

Para *D. simulans* foram analisados 206 indivíduos, sendo 91 fêmeas e 115 machos. As fêmeas mostraram maior frequência do fenótipo S/S (48,3%) e os machos o fenótipo S/F foi o mais frequente (50,4%).

Tabela 3. Número total de indivíduos controle analisado e porcentagem (%) quanto aos fenótipos S/S, F/F, S/F da EST-6 em linhagens brasileiras, africanas e francesa de *D. melanogaster* e *D. simulans*. F= fêmeas, M= machos aster. F= fêmeas, M= machos.

Linhagens	<i>D.melanogaster</i>								<i>D.simulans</i>							
	F				M				F				M			
	F/F	S/S	F/S	0	F/F	S/S	F/S	0	F/F	S/S	F/S	0	F/F	S/S	F/S	0
Brasileiras																
FLO	3	5	2	10	9	15	6	10	6	1	3	-	12	5	4	-
BG	9	1	-	20	16	16	4	4	-	-	-	-	-	-	-	-
RP	10	-	3	7	24	4	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MUC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	8	7	4	6	3
UBA	3	-	1	16	3	13	8	16	-	-	-	-	-	-	-	-
Total (%)	25 (27,7)	6 (6,7)	6 (6,7)	53 (58,9)	52 (32,5)	48 (30)	30 (18,7)	30 (18,7)	6 (30)	1 (5)	5 (25)	8 (40)	19 (46,3)	9 (21,9)	10 (24,4)	3 (7,31)
Africana																
TANA	3	1	1	25	8	9	16	7								
TANA-4									-	-	-	20	13	-	1	25
Francesa																
GIF-2									-	2	-	8	6	2	8	14
Total Geral (%)	28 (23,3)	7 (5,8)	7 (5,8)	78 (65)	60 (30)	57 (28,5)	46 (23)	37 (18,5)	12 (19,3)	4 (6,4)	10 (16)	36 (58)	38 (34,5)	11 (10)	19 (17,3)	42 (38,2)

Linhagens	Resistentes						Suscetíveis						Total (%)					
	F			M			F			M			Resistentes			Susceptíveis		
	F/F	S/S	S/F	F/F	S/S	S/F	F/F	S/S	S/F	F/F	S/S	S/F	F/F	S/S	S/F	F/F	S/S	S/F
Brasileiras																		
FLO	6	-	4	-	3	7	2	4	3	1	2	7	6(30)	3(15)	11(55)	3(15)	6(30)	10(50)
BG	10	-	-	-	-	10	6	-	-	-	2	8	10(50)	-	10(50)	6(37,5)	2(12,5)	8(50)
RP	5	-	2	7	-	3	-	6	3	1	5	3	12(71)	-	5(29)	1(5,5)	11(61)	6(33)
MUC	1	2	7	2	-	8	4	-	6	-	1	9	3(15)	2(10)	15(75)	4(20)	1(5)	15(75)
SE	1	4	5	1	3	6	-	4	4	-	1	9	2(10)	7(35)	11(55)	-	5(28)	13(72)
UBA	-	9	-	2	7	1	-	10	-	-	10	-	2(10,5)	16(84)	1(5)	-	20(100)	-
Total (%)	23 (41)	15 (27)	18 (32)	12 (20)	13 (22)	35 (58)	12 (23)	24 (46)	16 (31)	2 (3)	21 (36)	36 (61)	35 (30)	28 (24)	53 (46)	14 (12,6)	45 (40,5)	52 (46,9)
Canton-S	6 (60)	-	4 (40)	-	3 (33,3)	6 (66,7)	10 (100)	-	-	-	-	10 (100)	6(31,6)	3(15,8)	10(52,6)	10(50)	-	10(50)
Africana																		
TANA	1 (10)	4 (40)	5 (50)	-	7 (70)	3 (30)	-	4 (66,7)	2 (33,3)	1 (11,1)	5 (55,5)	3 (33,3)	1(5)	11(55)	8(40)	1(6,7)	9(60)	5(33,3)
Total Geral (%)	30 (39)	19 (25)	27 (36)	12 (15)	23 (29)	44 (56)	22 (32,3)	28 (41,2)	18 (26,5)	3 (3,8)	26 (33,3)	49 (62,8)	42 (27,1)	42 (27,1)	71 (45,8)	25 (17,1)	54 (36,9)	67 (45,9)

Tabela 5. Número de indivíduos machos e fêmeas analisados quanto ao fenótipo da EST-6 em linhagens resistentes e suscetíveis de *D. simulans*. F= fêmeas, M= machos

Linhagens	Resistentes						Suscetíveis						Total (%)					
	F			M			F			M			Resistentes			Susceptíveis		
	F/F	S/S	S/F	F/F	S/S	S/F	F/F	S/S	S/F	F/F	S/S	S/F	F/F	S/S	S/F	F/F	S/S	S/F
Brasileiras																		
FLO	1	2	7	-	4	6	10	-	-	10	-	-	1(5)	6(30)	13(65)	20(100)	-	-
BG	5	-	5	5	-	5	6	-	2	9	1	-	10(50)	-	10(50)	15(83,3)	1(5,6)	2(11,1)
RP	-	-	-	-	3	5	-	-	-	2	1	5	-	3(37,5)	5(62,5)	2(25)	1(12,5)	5(62,5)
MUC	2	5	3	1	2	7	3	1	5	2	-	8	3(15)	7(35)	10(50)	5(26,3)	1(5,3)	13(68,4)
Total (%)	8 (26,7)	7 (23,3)	15 (50)	6 (15,8)	9 (23,7)	23 (60,5)	19 (70)	1 (4)	7 (26)	23 (62,2)	2 (5,4)	12 (32,4)	14 (20,6)	16 (23,5)	38 (55,9)	45 (66,2)	3 (4,4)	20 (29,4)
Africana																		
TANA-4	1 (10)	6 (60)	3 (30)	-	2 (20)	8 (80)	-	6 (66,7)	3 (33,3)	1 (11,1)	4 (44,4)	4 (44,4)	1(5)	8(40)	11(55)	1(5)	10(55)	7(40)
Francesa																		
GIF-2	-	4 (66,7)	2 (33,3)	-	4 (40)	6 (60)	-	9 (100)	-	6 (60)	-	4 (40)	-	8(50)	8(50)	6(30)	9(45)	4(25)
Total (%)	9 (19,5)	17 (37)	20 (43,5)	6 (10,3)	15 (26)	37 (63,7)	19 (43,2)	16 (36,4)	9 (20,4)	30 (53,6)	6 (10,7)	20 (35,7)	15 (14,4)	32 (30,8)	57 (54,8)	52 (49,5)	22 (20,9)	31 (29,5)

Tabela 6. Frequência total dos alelos *F* e *S* da esterase-6 de todas as linhagens brasileiras e africanas de *D. melanogaster* e *D. simulans* e da francesa de *D. simulans*.

Linhagens	<i>D.melanogaster</i>		Linhagens	<i>D.simulans</i>	
	<i>F</i>	<i>S</i>		<i>F</i>	<i>S</i>
Brasileiras			Brasileiras		
SE	0,369	0,632	MUC	0,499	0,499
MUC	0,550	0,450	RP	0,437	0,562
RP	0,528	0,471	FLO	0,680	0,312
UBA	0,064	0,949	BG	0,526	0,474
FLO	0,5	0,5			
BG	0,694	0,555			
Canton-S	0,666	0,333			
Africana			Africana		
TANA	0,242	0,756	TANA-4	0,290	0,711
			Francesa		
			GIF-2	0,342	0,830

Tabela 7. Número total de indivíduos analisados e porcentagem (%) quanto aos fenótipos S/S, F/F, S/F da esterase-6 em linhagens brasileiras, africanas e francesa de *D. melanogaster* e *D. simulans*. F= fêmeas, M= machos

Linhagens	<i>D.melanogaster</i>						<i>D.simulans</i>					
	F			M			F			M		
	F/F	S/S	S/F	F/F	S/S	S/F	F/F	S/S	S/F	F/F	S/S	S/F
Brasileiras												
FLO	8	4	7	1	5	14	11	2	7	10	4	6
BG	16	-	-	-	2	18	-	11	7	14	1	5
RP	5	6	5	8	5	6	-	-	-	2	4	10
MUC	5	2	13	2	1	17	5	6	8	3	2	15
SE	1	8	9	1	4	15						
UBA	-	19	-	2	17	1						
Total (%)	35 (32,4)	39 (36,1)	34 (31,5)	14 (11,8)	34 (28,5)	71 (59,7)	16 (28,1)	19 (33,3)	22 (38,6)	29 (38,1)	11 (14,5)	36 (47,4)
Canton-S	16	-	4	-	3	16	-	-	-	-	-	-
Africana												
TANA	1	8	7	1	12	6	-	-	-	-	-	-
TANA-4	-	-	-	-	-	-	1	12	6	1	6	12
Francesa												
GIF-2	-	-	-	-	-	-	-	13	2	6	4	10
Total Geral (%)	52 (36,11)	47 (32,64)	45 (31,25)	15 (9,6)	49 (31,2)	93 (59,2)	17 (18,7)	44 (48,3)	30 (33)	36 (31,3)	21 (18,3)	58 (50,4)

4.2.2 α - Esterases

Uma banda denominada de α -2 no presente estudo esteve presente em 100% dos indivíduos de todas as linhagens resistentes e suscetíveis de *D. melanogaster* e *D. simulans* analisadas. Foi observada também uma diferença na expressão desta banda que foi maior para machos do que para as fêmeas (Figura 1-17).

Outra banda α identificada nos géis foi denominada de α -1, e apresentou frequência variável entre as diferentes linhagens analisadas de ambas as espécies (Tabelas 8 e 9).

Não foi observada diferença significativa na frequência de α -1 entre machos e fêmeas resistentes das linhagens brasileiras de *D. melanogaster*. Na comparação entre os sexos das linhagens susceptíveis os machos mostraram uma frequência maior (73,3%) do que as fêmeas (61,5%). Também não foi observada diferença na frequência desta banda na comparação entre os sexos para *Canton-S* suscetível, TANA resistente e suscetível. A banda α -1 esteve presente em 44,4% dos machos resistentes de *Canton-S* e ausente nas fêmeas resistentes desta linhagem (Tabela 8).

Na comparação quanto à frequência de α -1 entre machos e fêmeas de todas as linhagens resistentes e suscetíveis foi observado valores equivalentes (Tabela 8).

Ao avaliarmos todos os indivíduos resistentes e suscetíveis quanto à frequência de α -1 para as linhagens brasileiras e africanas também não foi verificada diferença significativa entre estes fenótipos. Para *Canton-S*, entretanto, houve uma frequência de 100% desta banda para os indivíduos suscetíveis contra 21,1% dos resistentes. Destaca-se aqui que esta diferença pode ser atribuída à ausência desta banda nas fêmeas resistentes e baixo número de machos resistentes analisados no presente trabalho.

Na comparação da porcentagem total dos indivíduos resistentes e suscetíveis de todas as linhagens verificou-se uma maior frequência para os suscetíveis (75%) do que os resistentes (61,9%), entretanto esta diferença pode estar sendo indiretamente influenciada pelos altos valores obtidos para *Canton-S*. A amostra de *Canton-S* deve ser ampliada para podermos avaliar melhor este resultado.

Na comparação, entre os sexos, da frequência da α esterase-1 das linhagens brasileiras de *D. simulans*, foi verificada uma maior frequência para os machos resistentes (66,7%) e machos suscetíveis (31,6%) do que para as fêmeas, respectivamente 33,3 e 10,3%. Já para a linhagem africana TANA-4 a frequência foi maior para as fêmeas resistentes e suscetíveis do que para os machos. Isto também foi observado para GIF-2 suscetível, enquanto para GIF-2 resistente esta banda não foi observada (Tabela 9).

Na comparação quanto à frequência de α -1 entre machos e fêmeas de todas as linhagens resistentes de *D. simulans* foi observada uma frequência maior para machos (54,2%) do que para as fêmeas (43,5%). Mas, para as linhagens suscetíveis, a frequência entre fêmeas e machos foi equivalente (35,4 x 33,3%) (Tabela 9).

Ao avaliarmos todos os indivíduos resistentes e suscetíveis quanto à frequência de α -1 para as linhagens brasileiras e africanas de *D. simulans*, diferentemente do que observamos para *D. melanogaster*, houve uma frequência aumentada desta banda para os fenótipos resistentes (49,5%) em relação aos suscetíveis (34,3%) (Tabela 9).

4.2.3 Testes com Inibidor

Nos testes com os inibidores diazon e prostigmina foi verificado em todas as linhagens analisadas de ambas as espécies que a esterase α -2 é uma acetil-colinesterase e a EST-6, pelo inibidor diazon, foi classificada como uma carboxilesterase

Tabela 8. Número total de indivíduos analisados e porcentagem (%) quanto à banda da α -esterase 1 em *D. melanogaster*. F= fêmeas, M= machos.

Linhagens	Total				Total	
	Resistentes		Susceptíveis		Resistentes	Susceptíveis
	F	M	F	M	Bandas α	Bandas α
Brasileiras						
FLO	10 (90)	10 (60)	9 (77,8)	10 (50)	20 (75)	19 (63,2)
BG	10 (0)	10 (0)	6 (0)	10 (100)	20 (0)	16 (62,5)
RP	7 (85,7)	10 (70)	9 (77,8)	10 (100)	17 (76,5)	19 (89,5)
MUC	10 (70)	10 (70)	10 (80)	10 (100)	20 (70)	20 (90)
SE	10 (100)	10 (100)	8 (0)	10 (20)	20 (100)	18 (11,1)
UBA	9 (44,4)	10 (60)	10 (100)	10 (70)	19 (52,6)	20 (85)
Total (%)	56 (64,3)	60 (60)	52 (61,5)	60 (73,3)	116 (62,1)	112 (67,8)
Canton-S	10 (0)	9 (44,4)	10 (100)	10 (100)	19 (21,1)	20 (100)
Africana						
TANA	10 (100)	10 (100)	10 (90)	10 (90)	20 (100)	20 (90)
Total Geral (%)	76 (60,5)	79 (63,3)	72 (70,8)	80 (78,7)	155 (61,9)	152 (75)

Tabela 9. Número total de indivíduos analisados e porcentagem (%) quanto à banda da α -esterase 1 em *D. simulans*. F= fêmeas, M= machos.

Linhagens	Total				Total	
	Resistentes		Susceptíveis		Resistentes	Susceptíveis
	F	M	F	M	Bandas α	Bandas α
Brasileiras						
FLO	10 (20)	10 (100)	10 (0)	10 (100)	20 (60)	20 (50)
BG	10 (0)	10(0)	10 (0)	10 (0)	20 (0)	20 (0)
RP	-	9 (100)	-	8 (0)	9 (100)	8 (0)
MUC	10 (80)	10 (70)	9 (33,3)	10 (20)	20 (75)	19 (26,3)
Total (%)	30 (33,3)	39 (66,7)	29 (10,3)	38 (31,6)	69 (52,2)	67 (22,4)
Africana						
TANA-4	10 (100)	10 (60)	9 (44,4)	9(0)	20 (80)	18 (22,2)
Francesa						
GIF-2	6 (0)	10 (0)	10 (100)	10 (70)	16 (0)	20 (85)
Total Geral (%)	46 (43,5)	59 (54,2)	48 (35,4)	57 (33,3)	105 (49,5)	105 (34,3)

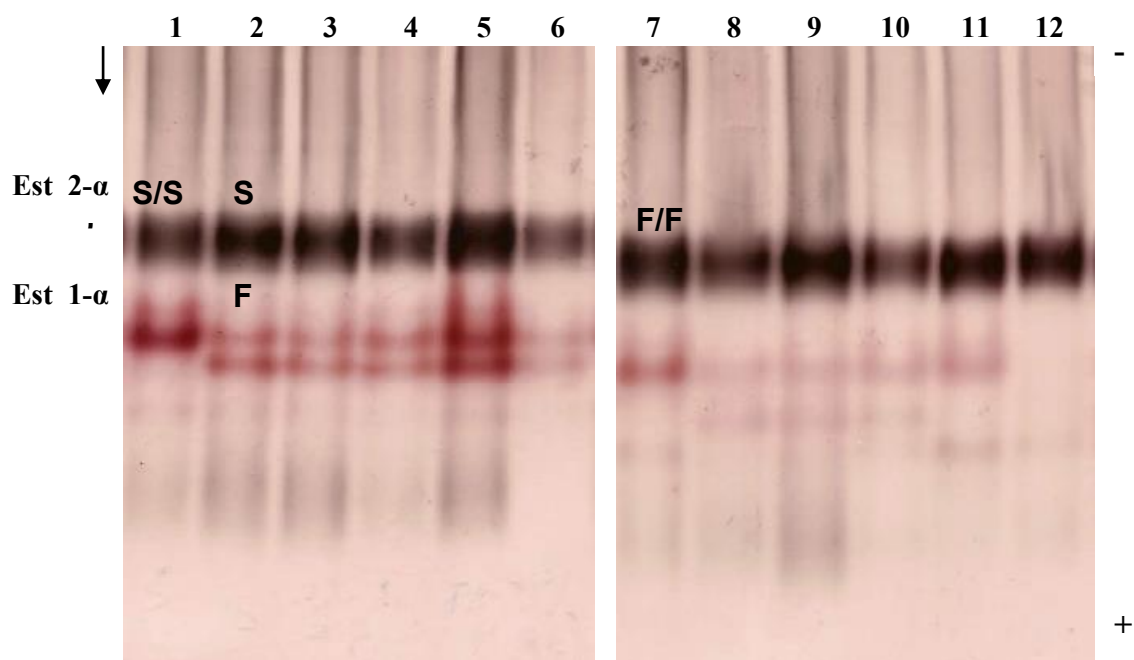


Figura 1. Padrão da alfa e beta esterases da linhagem Floripa susceptível (FLO-S) de *D. melanogaster*. Machos = 1-6; Fêmeas = 7-12; F/F(fast/fast)= 7,8,9,10,11; S/S(slow/slow)= 1; S/F(slow/fast)= 2,3,4,5,6; Z(zero)=12; * = variante não analisada.

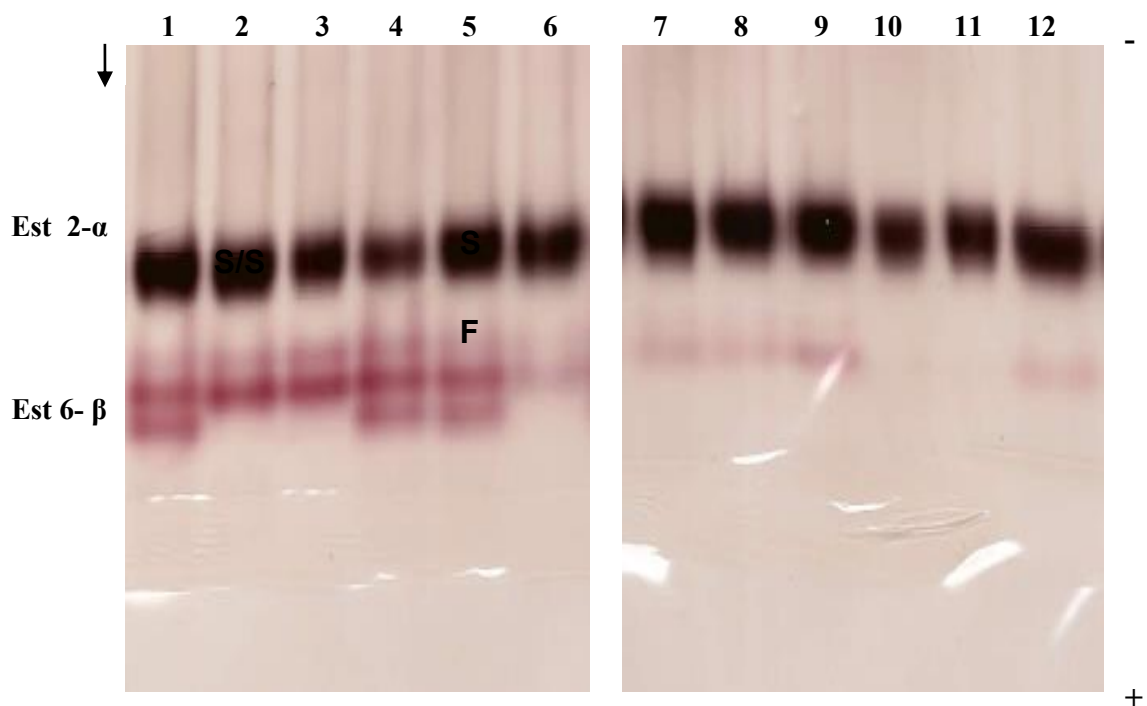


Figura 2. Padrão da alfa e beta esterases da linhagem Bento Gonçalves resistente (BG-R) de *D. melanogaster*. Machos=1-6; Fêmeas=7-12; S/S(slow/slow) =2,3,6,7,8,9,12; S/F(slow/fast)=1,4,5; Zero=10,11.

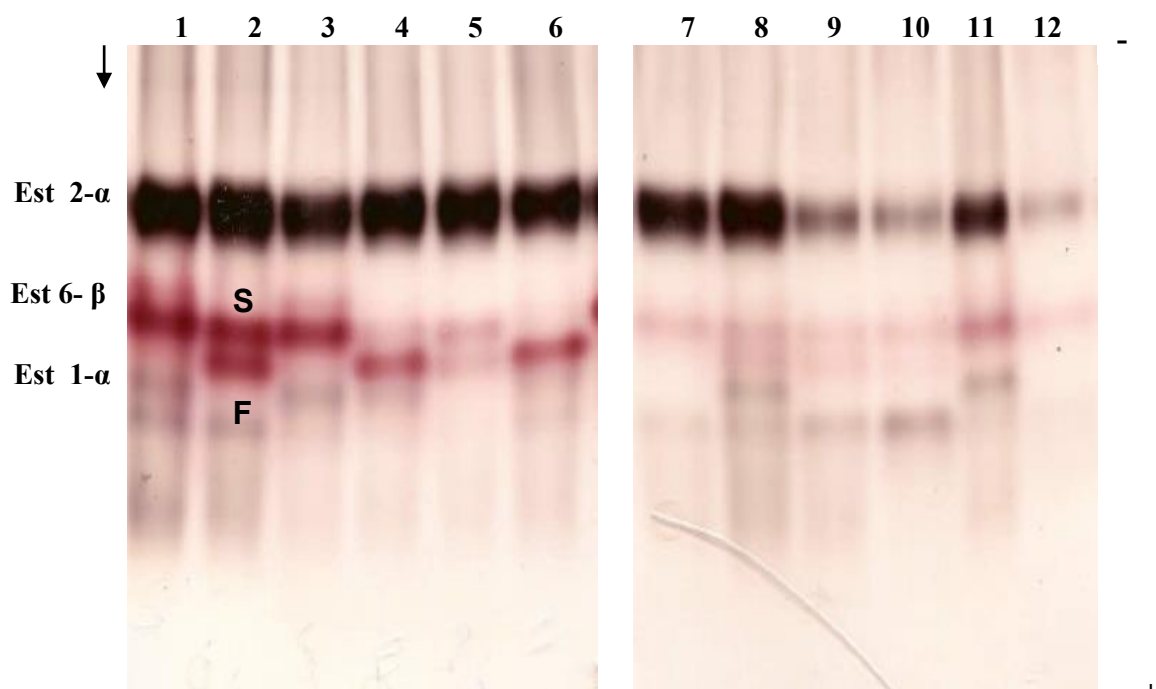


Figura 3. Padrão da alfa e beta esterases da linhagem Rio Preto resistente (RP-R) de *D. melanogaster*. Machos= 1-6; Fêmeas= 7-12; S/F(slow/fast)= 2,5,8,9,10; F/F(fast/fast)= 4,6; S/S(slow/slow)= 1,3,7,11,12.

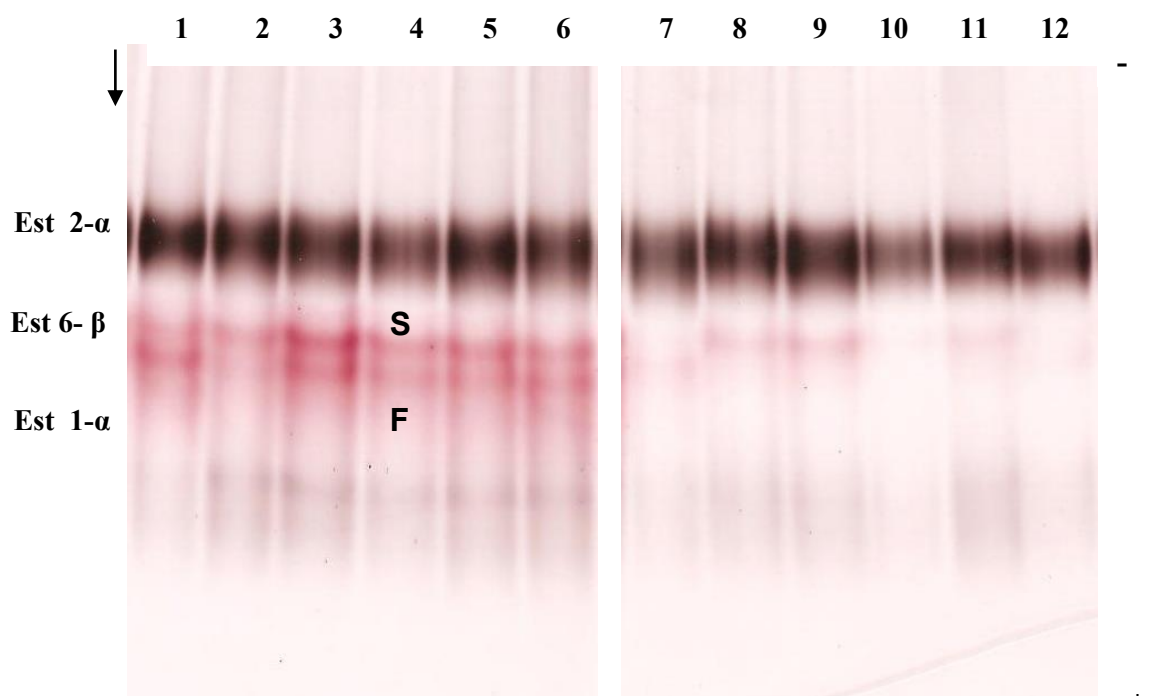


Figura 4. Padrão da alfa e beta esterases da linhagem Rio Preto susceptível (RP-S) de *D. melanogaster*. Machos= 1-6; Fêmeas= 7-12; F/F(fast/fast)= 4,6; S/S(slow/slow)= 1,3,7,11,12; S/F(slow/fast)= 2,5,8,9,10.

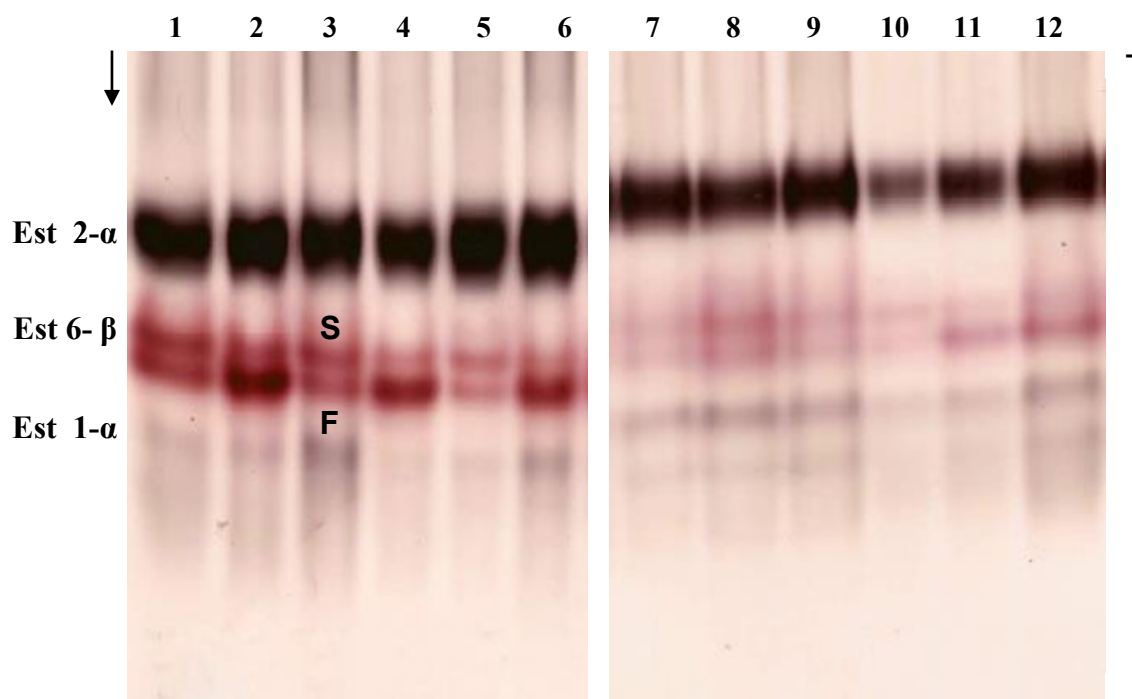


Figura 5. Padrão de alfa e beta esterases da linhagem Mucuri resistente (MUC-R) de *D. melanogaster*. Machos= 1-6; Fêmeas= 7-12; S/F(slow/fast)=1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12.

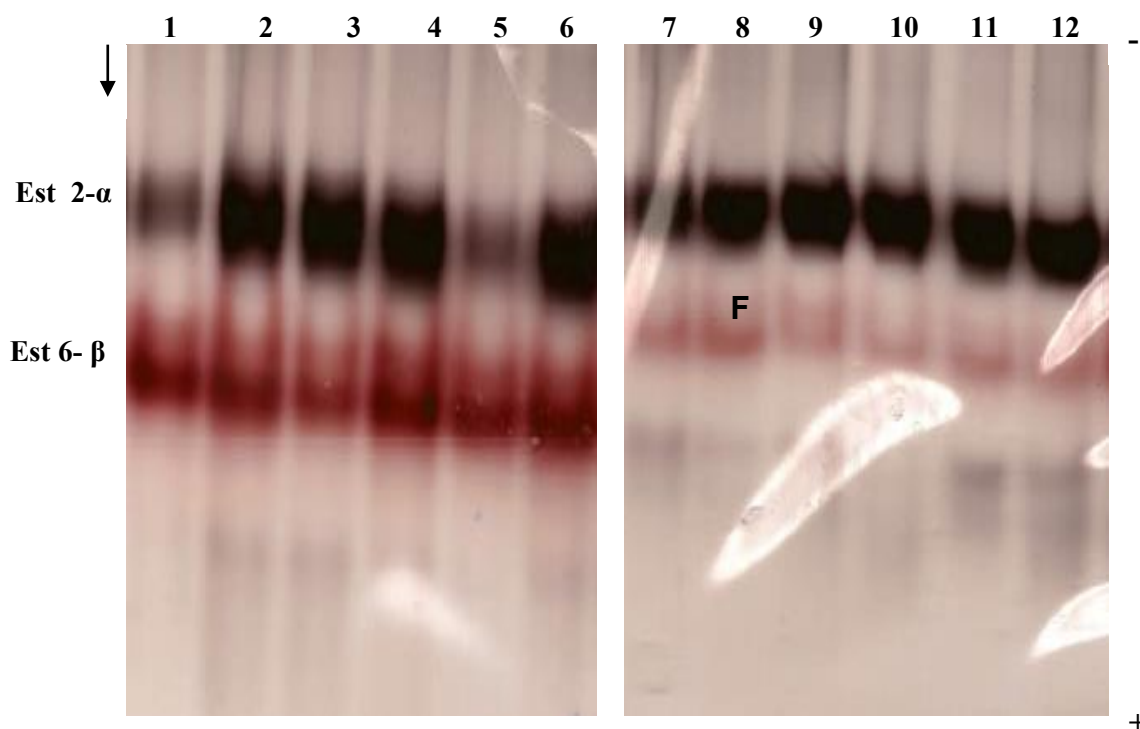


Figura 6. Padrão da alfa e beta esterases da linhagem Sergipe susceptível (SE-S) de *D. melanogaster*. Machos= 1-6; Fêmeas= 7-12; S/F(slow/fast)= 1,2,3,4,5,6; F/F(fast/fast)= 7,8,9,10,11,12.

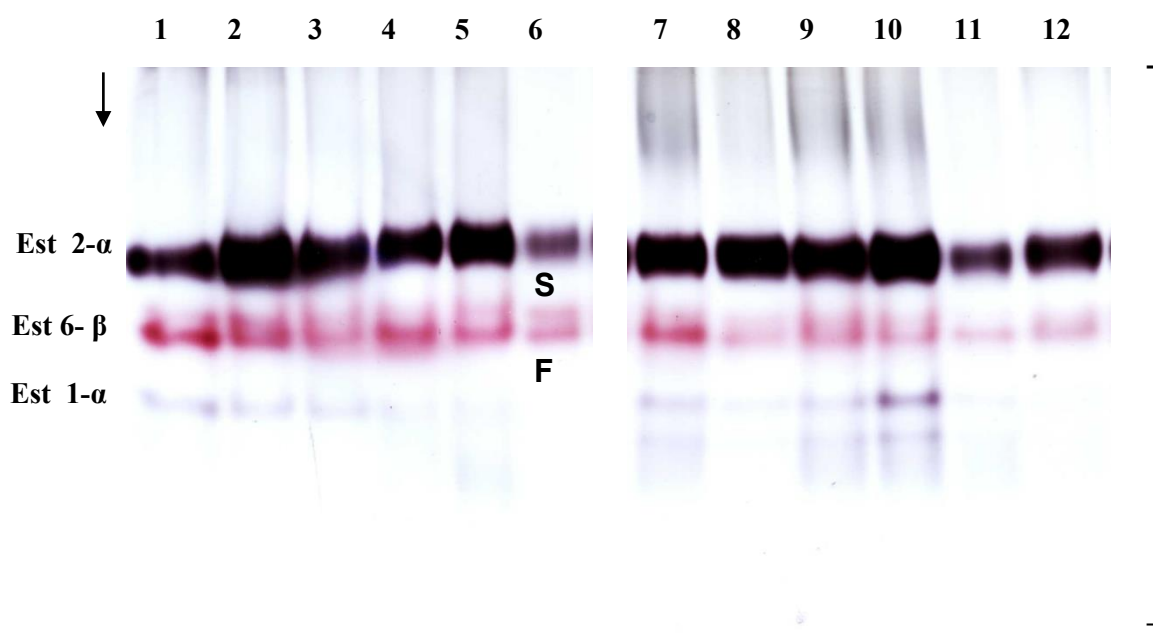


Figura 7. Padrão da alfa e beta esterases da linhagem Ubatuba susceptível (UBA-S) de *D. melanogaster*. Machos= 1-6; Fêmeas= 7-12; S/S (slow/slow)= 1,3,4,5,7,8,9,10,11,12; S/F (slow/fast)= 2,6.

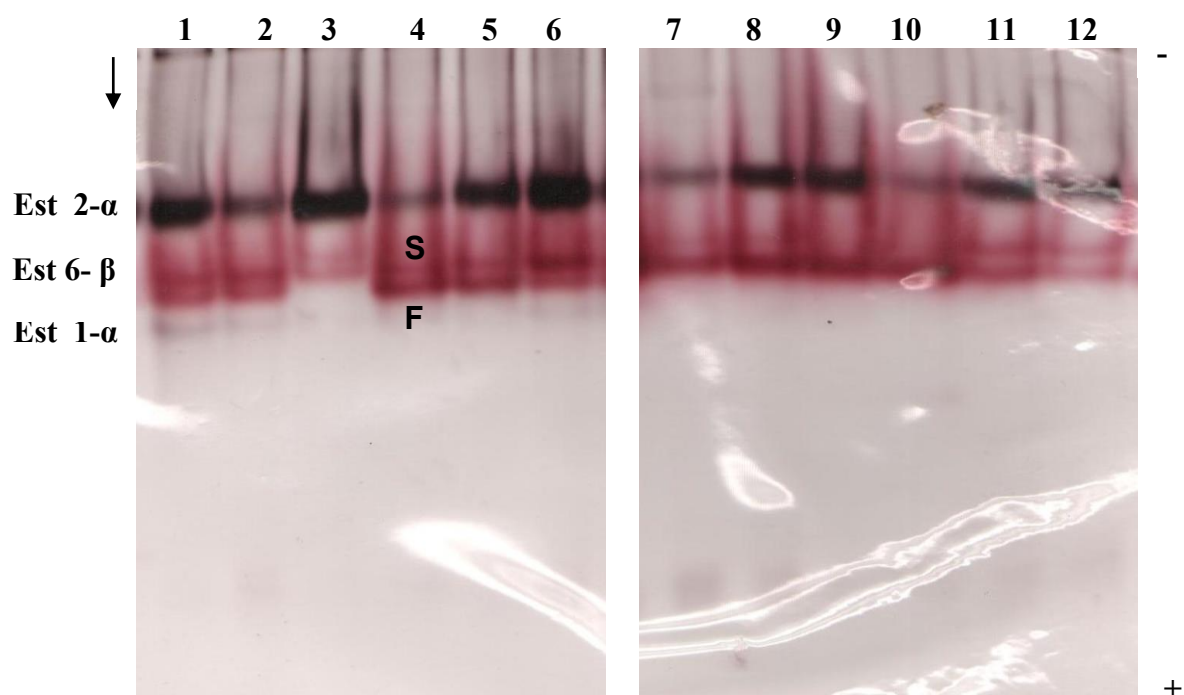


Figura 8. Padrão de alfa e beta esterase da linhagem *Canton-S* resistente (*Canton-S*) de *D. melanogaster*. 1-6= machos; 7-12= fêmeas; F/F(fast/fast)=7,8,9,10,11,12; S/F(fast/slow)=1,2,3,4,5,6.

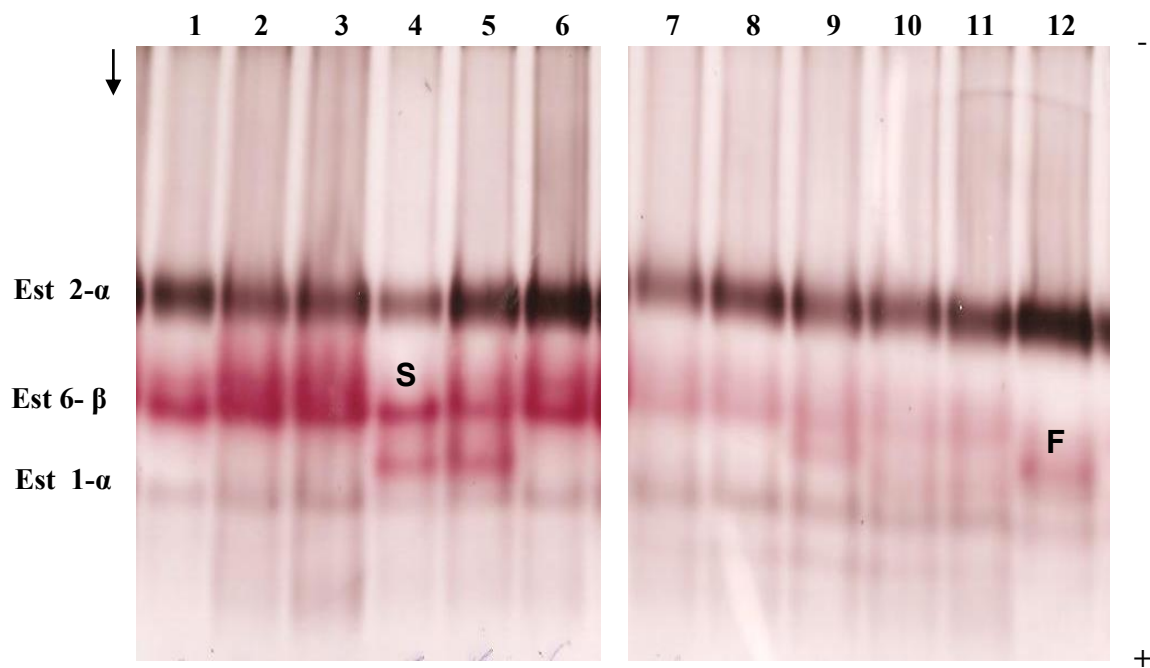


Figura 9. Padrão da alfa e beta esterases da linhagem TANA resistente (TANA-R) de *D. melanogaster*. Machos= 1-6; Fêmeas= 7-12; *F/F*(fast/fast)= 12; *S/S* (slow/slow)= 1,2,3,6,7,8; *S/F*(slow/fast)= 4,5,9,10,11

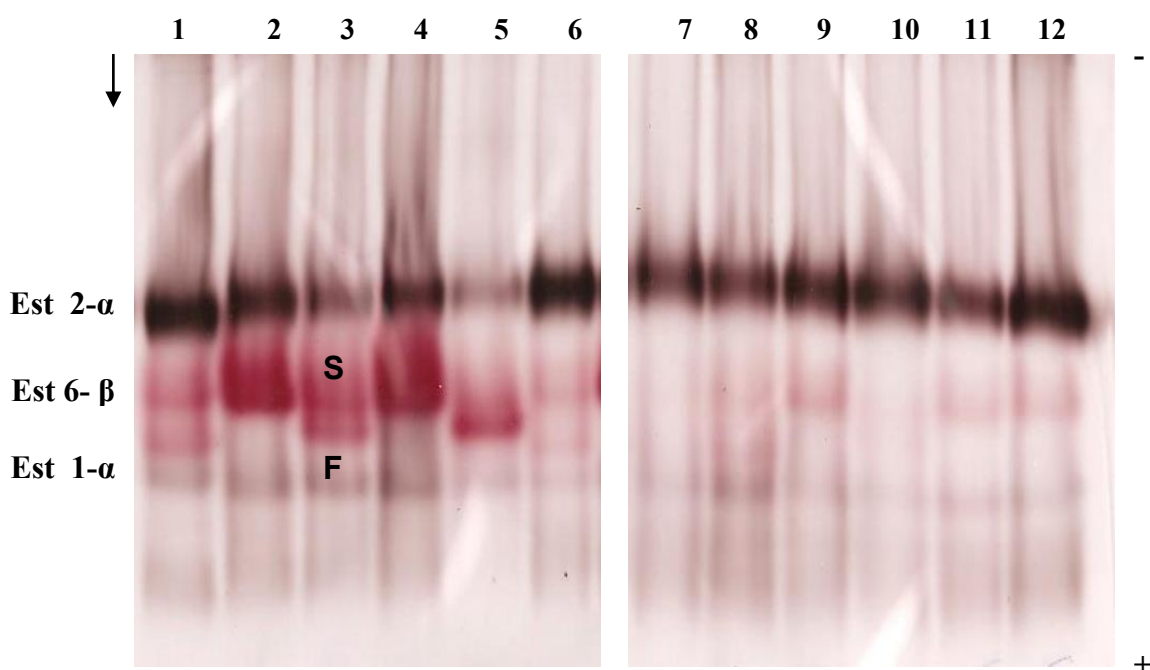


Figura 10. Padrão da alfa e beta esterases da linhagem TANA susceptível (TANA-S) de *D. melanogaster*. Machos= 1-6; Fêmeas= 7-12; *F/F*(fast/fast) = 5; *S/S* (slow/slow)= 2,4,9,10,11,12; *S/F* (slow/fast)= 1,3,6,8; Zero= 7

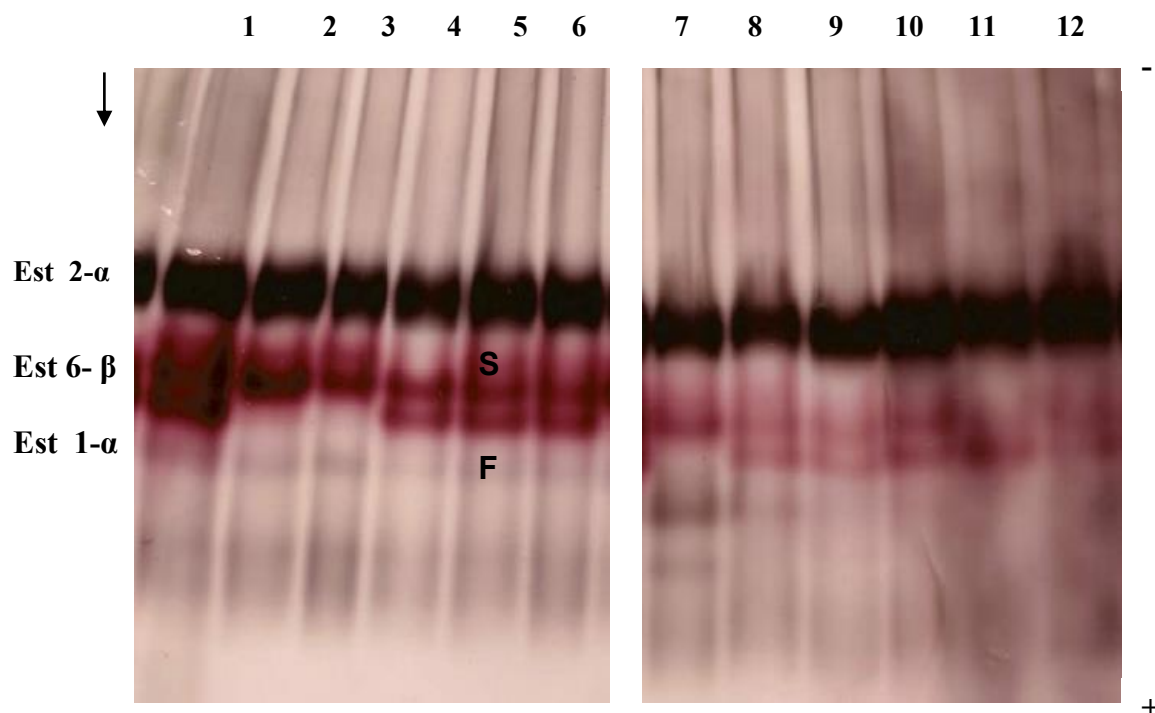


Figura 11. Padrão da alfa e beta esterases da linhagem Floripa resistente (FLO-R) de *D. simulans*. Machos= 1-6; Fêmeas= 7-12; F/F (fast/fast)= 11; S/S (slow/slow)= 2,3,7; S/F (slow/fast)= 1,4,5,6,8,9,10,12

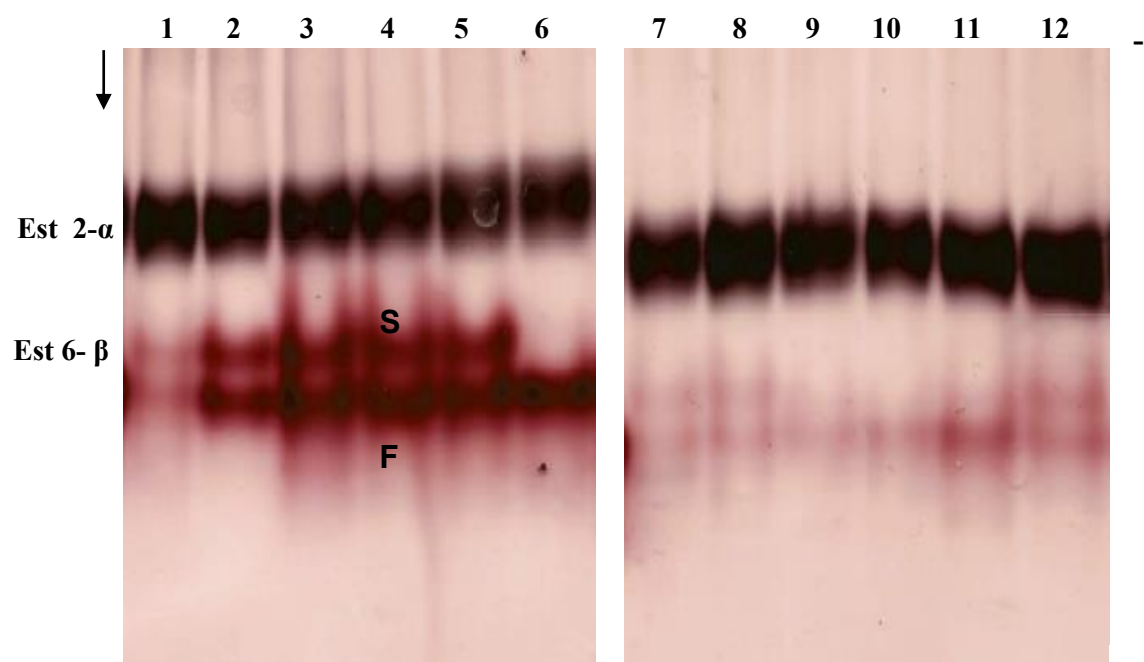


Figura 12. Padrão da alfa e beta esterases da linhagem Bento Gonçalves resistente (BG-R) de *D. simulans*. Machos = 1-6; Fêmeas = 7-12; F/F (fast/fast)= 6,9,10,11; S/F (slow/fast)= 1,2,3,4,5,7,8,12.

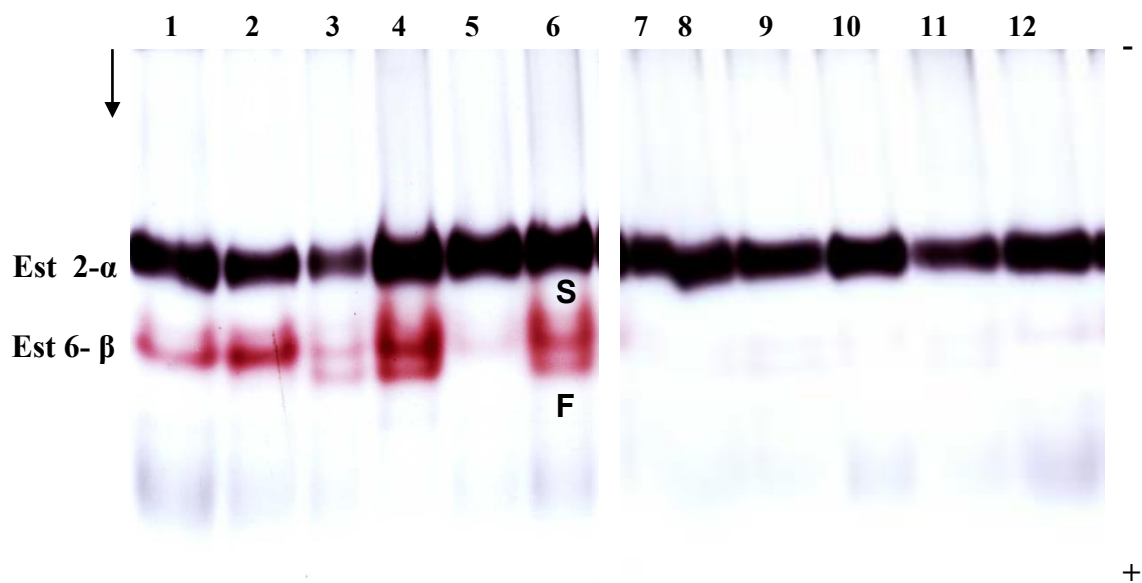


Figura 13. Padrão da alfa e beta esterases da linhagem Rio Preto susceptível (RP-S) de *D. simulans*. Machos = 1-6; Fêmeas = 7-11; *F/F* (fast/fast)= 1,2,5; *S/F* (slow/fast) = 3,4,6.

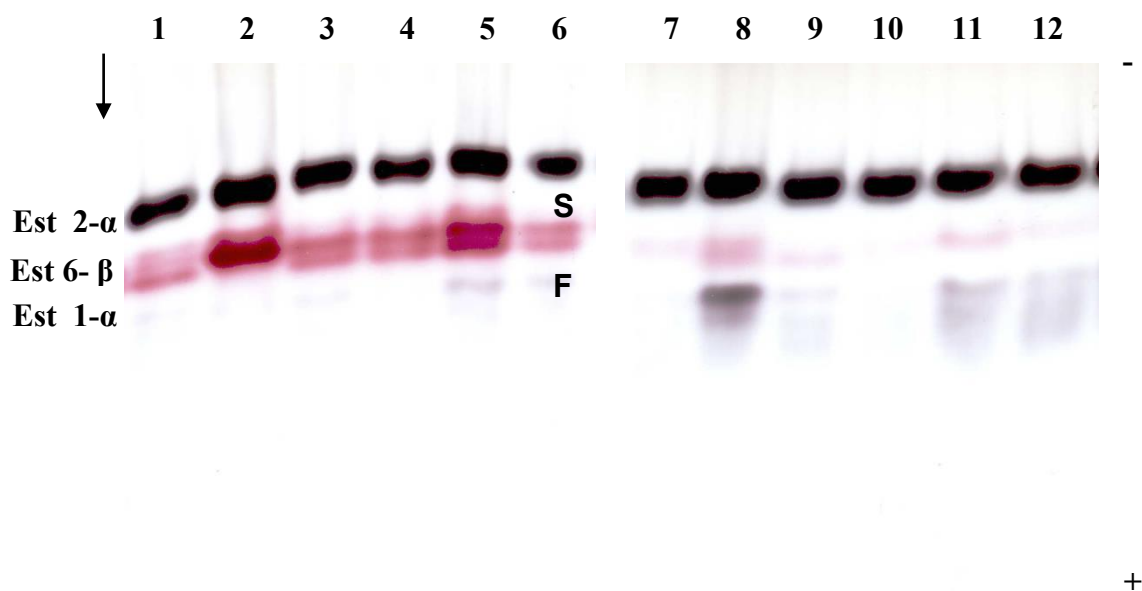


Figura 14. Padrão da alfa e beta esterases da linhagem Mucuri susceptível (MUC-R) de *D. simulans*. Machos = 1-6; Fêmeas = 7-12; *F/F* (fast/fast)= 7,11; *S/S* (slow/slow) = 9; *S/F* (slow/fast) = 1,2,3,4,5,6,8; Zero = 10,12.

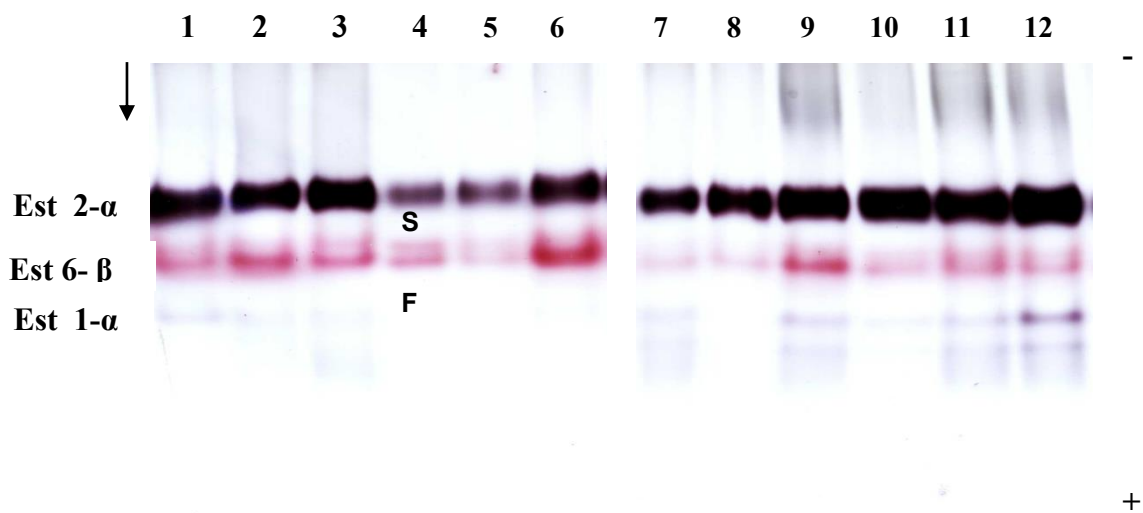


Figura 15. Padrão da alfa e beta esterases da linhagem TANA-4 resistente (TANA4-R) de *D. simulans*. 1-6= machos; 7-12= fêmeas; *F/F* (fast/fast)= 7,8; *S/F*(slow/fast) = 1,2,3,4,5,6,9,10,11,12.

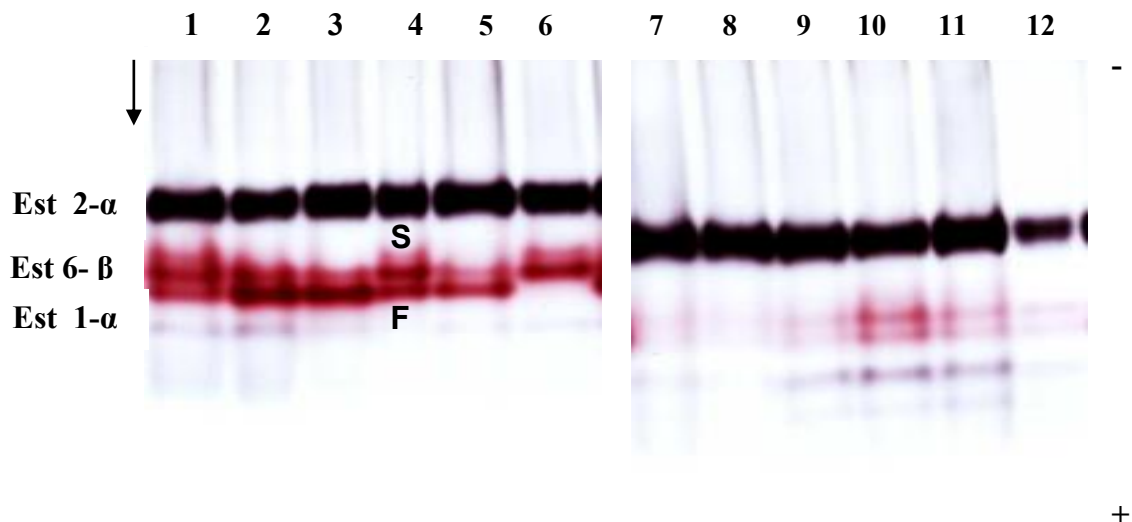


Figura 16. Padrão da alfa e beta esterases da linhagem TANA-4 susceptível (TANA4-R) de *D. simulans*. Machos = 1-6; Fêmeas = 7-12s; *S/S* (slow/slow) = 6; *S/F*(slow/fast) = 1,2,3,4, 9,5,7,8,9,10,11,12.

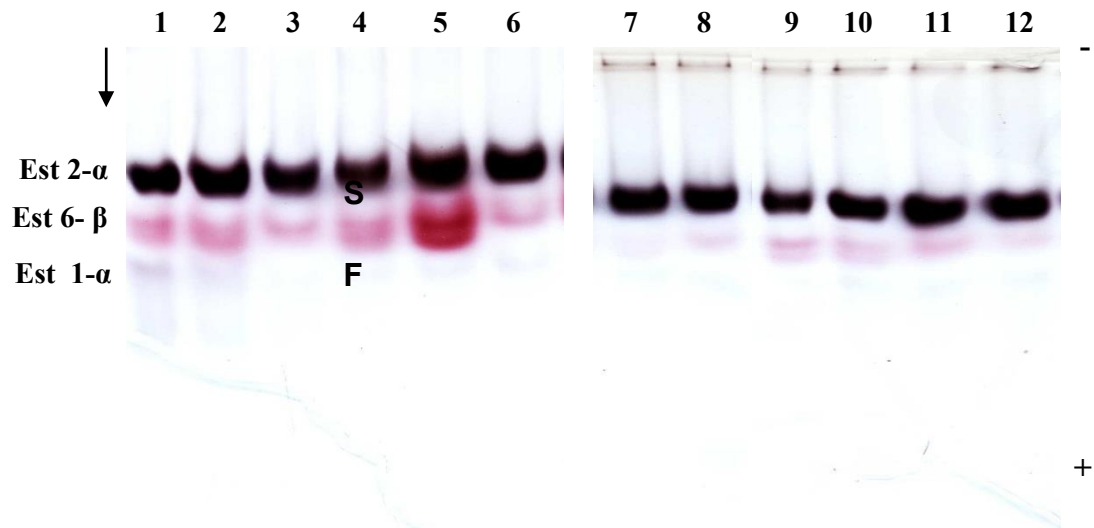


Figura 17. Padrão de alfa e beta esterase da linhagem GIF-2 resistente de *D. simulans*. 1-6= machos; 7-12= fêmeas; S/S (slow/slow)= 3,6,7,8,11,12; S/F (fast/slow)=1,2,4,5,9,10,

4.3 Avaliação dos níveis da atividade da GST

A atividade enzimática de GST das fêmeas resistentes de todas as linhagens brasileiras de *D. melanogaster* em relação às fêmeas susceptíveis foi maior, com exceção da linhagem MUC que mostrou o mesmo valor em fêmeas resistentes e susceptíveis. As fêmeas resistentes de *Canton-S* também mostraram maior atividade da GST ($0,513 \pm 0,06$) em relação às susceptíveis ($0,407 \pm 0,11$). Na comparação dos machos resistentes e susceptíveis de *D. melanogaster* (linhagens brasileiras) foi observado uma maior atividade de GST nos resistentes em duas linhagens (UBA e MUC) e em três linhagens nos susceptíveis (SE, BG e RP). Nas fêmeas e machos controle a atividade enzimática da GST foi numericamente maior para as fêmeas do que para os machos com exceção de MUC e *Canton-S* (Tabela 9 e Figura 18).

A linhagem TANA, africana, mostrou valores mais baixos de GST do que as linhagens brasileiras e valores maiores da atividade de GST nas fêmeas susceptíveis do que nas resistentes.

Nas linhagens brasileiras de *D. simulans* observou-se maior grau de atividade da GST das fêmeas susceptíveis em relação às fêmeas resistentes. Os machos resistentes apresentaram uma atividade da GST levemente maior do que os susceptíveis para as linhagens FLO e RP. Nas fêmeas e machos controle a atividade da GST foi maior para machos nas linhagens FLO e BG e maior para as fêmeas na linhagem RP. Na linhagem TANA-4, africana, as fêmeas resistentes mostraram valores significativamente maiores da atividade de GST do que as susceptíveis ($p < 0,05$) e o inverso foi observado para a linhagem GIF-2, procedente da França (Tabela 9 e figura 20).

Em uma análise geral da atividade da GST nas fêmeas e machos de todas as linhagens de *D. melanogaster* e *D. simulans*, observou-se uma alta variabilidade intralinhagem e entre as espécies, havendo uma tendência para maior atividade da GST em *D. melanogaster* do que em *D.*

simulans. Esta atividade foi maior nas fêmeas de *D. melanogaster* e nos machos de *D. simulans*.

Destaca-se a maior atividade de GST observada na linhagem *Canton-S*, nas amostras resistentes, suscetíveis e controle.

As linhagens africanas de *D. melanogaster* (TANA) e de *D. simulans* (TANA-4) mostraram valores da atividade de GST equivalentes aos menores valores obtidos nas linhagens brasileiras destas espécies. A linhagem francesa, GIF-2, de *D. simulans* apresentou valores equivalentes aos das linhagens brasileiras com os maiores valores de atividade da GST, embora ainda em níveis relativamente baixos (Tabela 9, figuras 19-G e 20-E-F).

Foi realizada uma comparação da atividade da GST utilizando a média total das linhagens brasileiras, africanas e francesa, quanto os fenótipos resistentes, suscetíveis e o controle de *D. melanogaster* e *D. simulans* (Tabela 10). Nesta análise onde retiramos o efeito da variabilidade intralinhagem das brasileiras, foi verificado, à vista dos números, que em relação às linhagens brasileiras *D. melanogaster* resistentes mostram atividade maior da GST que *D. simulans*; o inverso foi verificado para o fenótipo suscetível. No controle também observamos maiores valores para *D. melanogaster* do que para *D. simulans*. As linhagens africanas das duas espécies mostraram os menores valores de atividade da GST e a linhagem africana de *D. simulans* mostrou valores maiores do que as linhagens brasileiras desta espécie. Algumas destas comparações foram significativas e estão destacadas na figura 21 A-B.

Tabela 9. Médias e desvios padrões das comparações do grau de atividade enzimática da GST das linhagens de *D. melanogaster* e *D. simulans*. Dados expressos em U mg⁻¹ de proteína. F= fêmeas, M= machos

Espécie	Linhagem	Resistentes		Susceptíveis		Controle	
		F	M	F	M	F	M
<i>D. melanogaster</i>	SE	0,103 ± 0,06	0,021 ± 0,03	0,082 ± 0,09	0,077 ± 0,04	0,354 ± 0,16	0,02 ± 0,01
	FLO	0,162 ± 0,12	0,011 ± 0,01	0,036 ± 0,02	0	0,069 ± 0,06	0,053 ± 0,05
	BG	0,115 ± 0,06	0,032 ± 0,01	0,052 ± 0,07	0,049 ± 0,02	0,025 ± 0,01	0,021 ± 0,01
	RP	0,034 ± 0,03	0,013 ± 0,01	0,027 ± 0,03	0,022 ± 0,02	0,068 ± 0,04	0,008 ± 0,01
	UBA	0,048 ± 0,03	0,055 ± 0,03	0,014 ± 0,03	0,024 ± 0,01	0,182 ± 0,03	0,039 ± 0,03
	MUC	0,011 ± 0,02	0,007 ± 0,01	0,011 ± 0,02	0,001 ± 0	0,024 ± 0,03	0,119 ± 0,08
	CANTON	0,513 ± 0,06	0,476 ± 0,03	0,407 ± 0,11	0,474 ± 0,04	0,446 ± 0,11	0,493 ± 0,02
	Africana						
TANA	0,0003 ± 0,0004	0,004 ± 0,005	0,006 ± 0,005	0,012 ± 0,01	0,011 ± 0,005	0,017 ± 0,002	
<i>D. simulans</i>	FLO	0,001 ± 0,002	0,027 ± 0,01	0,002 ± 0,01	0,008 ± 0,01	0	0,019 ± 0,004
	BG	0,076 ± 0,02	0,038 ± 0,005	0,094 ± 0,03	0,105 ± 0,03	0,012 ± 0,01	0,039 ± 0,01
	RP	0,051 ± 0,03	0,112 ± 0,01	0,101 ± 0,02	0,099 ± 0,09	0,031 ± 0,04	0,02 ± 0,03
	MUC	0,004 ± 0,005	0,018 ± 0,01	0,011 ± 0,02	0,005 ± 0,01	0,004 ± 0,005	0,005 ± 0,005
	Africana						
	TANA-4	0,033 ± 0,01	0,018 ± 0,005	0	0,004 ± 0,01	0	0,01 ± 0,009
	Francesa						
GIF-2	0,067 ± 0,04	0,105 ± 0,03	0,097 ± 0,02	0,133 ± 0,02	0,046 ± 0,05	0,1 ± 0,07	

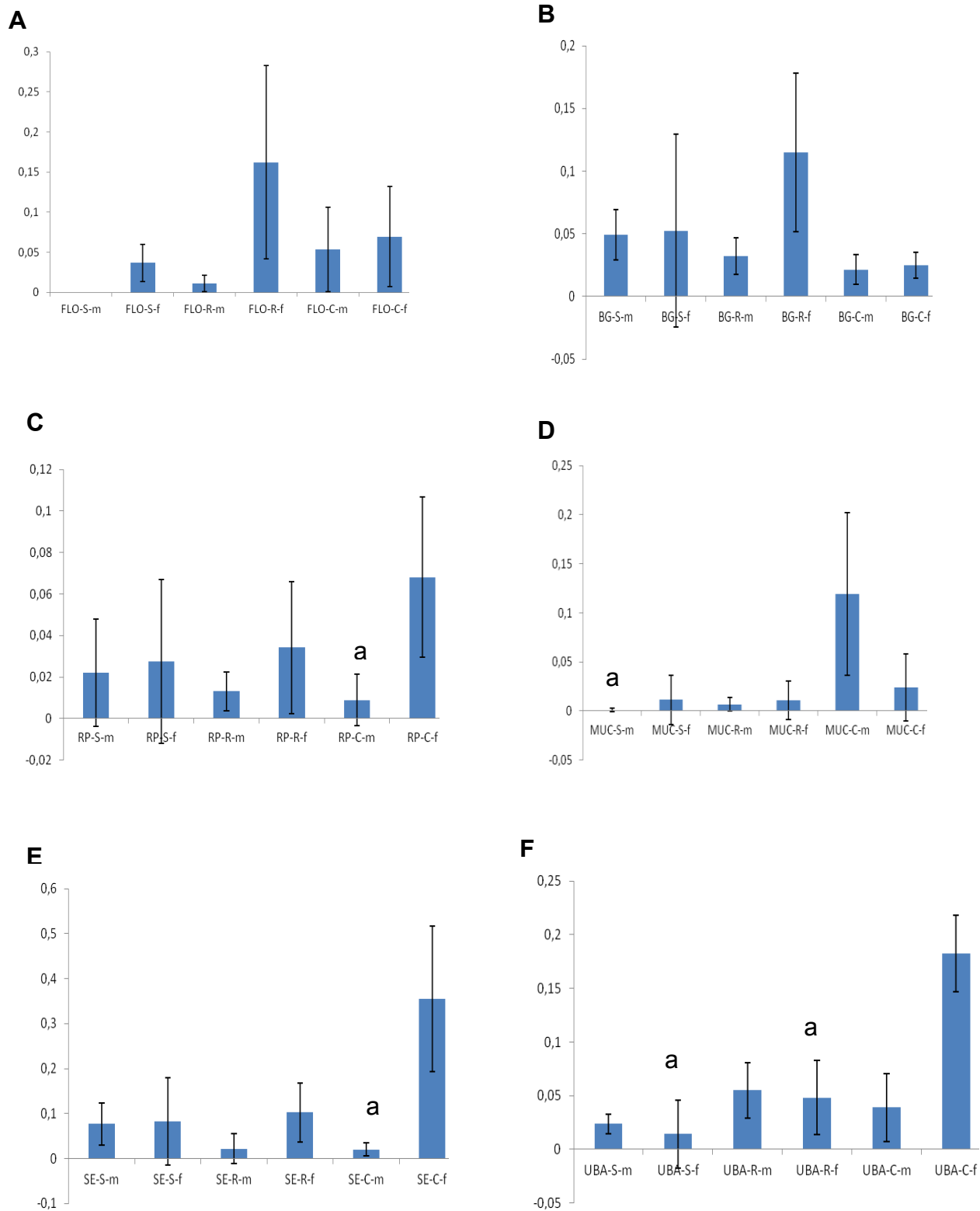


Figura 18 A-F. Média total e desvio padrão da atividade da GST das linhagens brasileiras de *D. melanogaster*. Floripa (A); Bento Gonçalves (B); Rio Preto (C); Mucuri (D); Sergipe (E); Ubatuba (F). Em C diferença significativa com RP controle (a). Em D diferença significativa com MUC controle (a), Em E diferença significativa com SE controle. Em F diferença significativa com UBA resistente e susceptível $p < 0,05$.

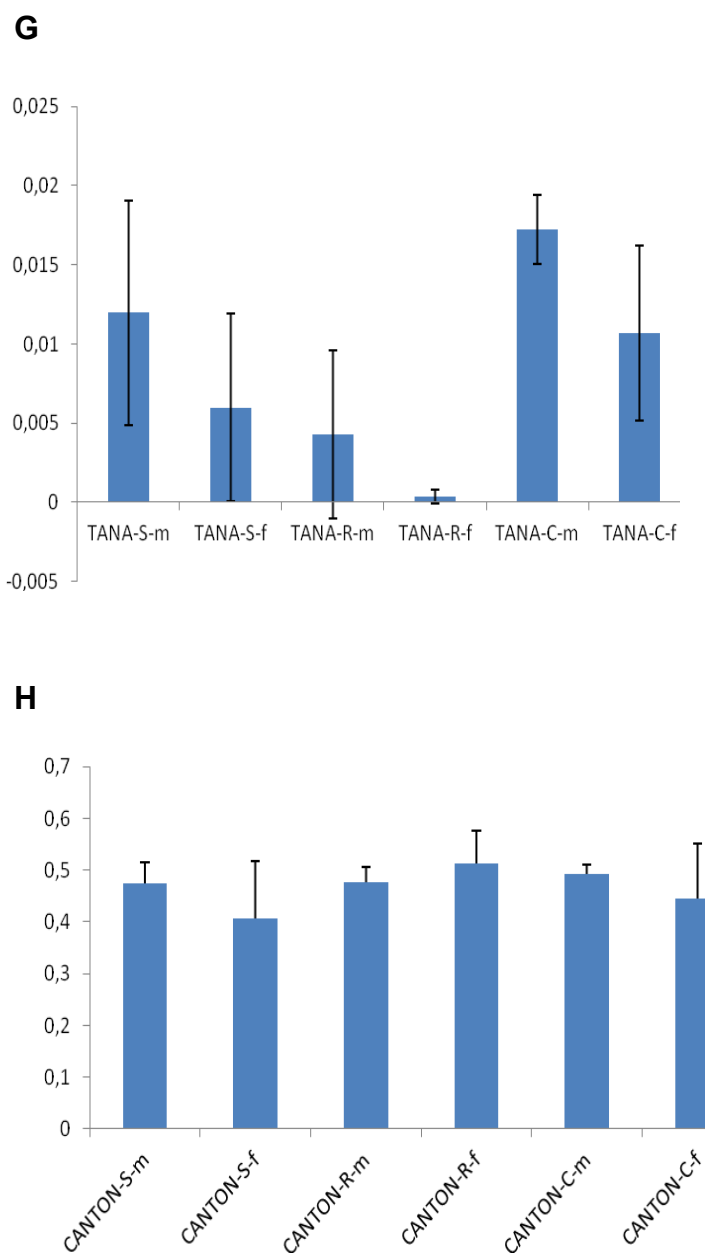


Figura 19 G-H. Média total e desvio padrão da atividade da GST das linhagens Africanas e Brasileiras de *D. melanogaster*. TANA (G) ; Canton-S (H).

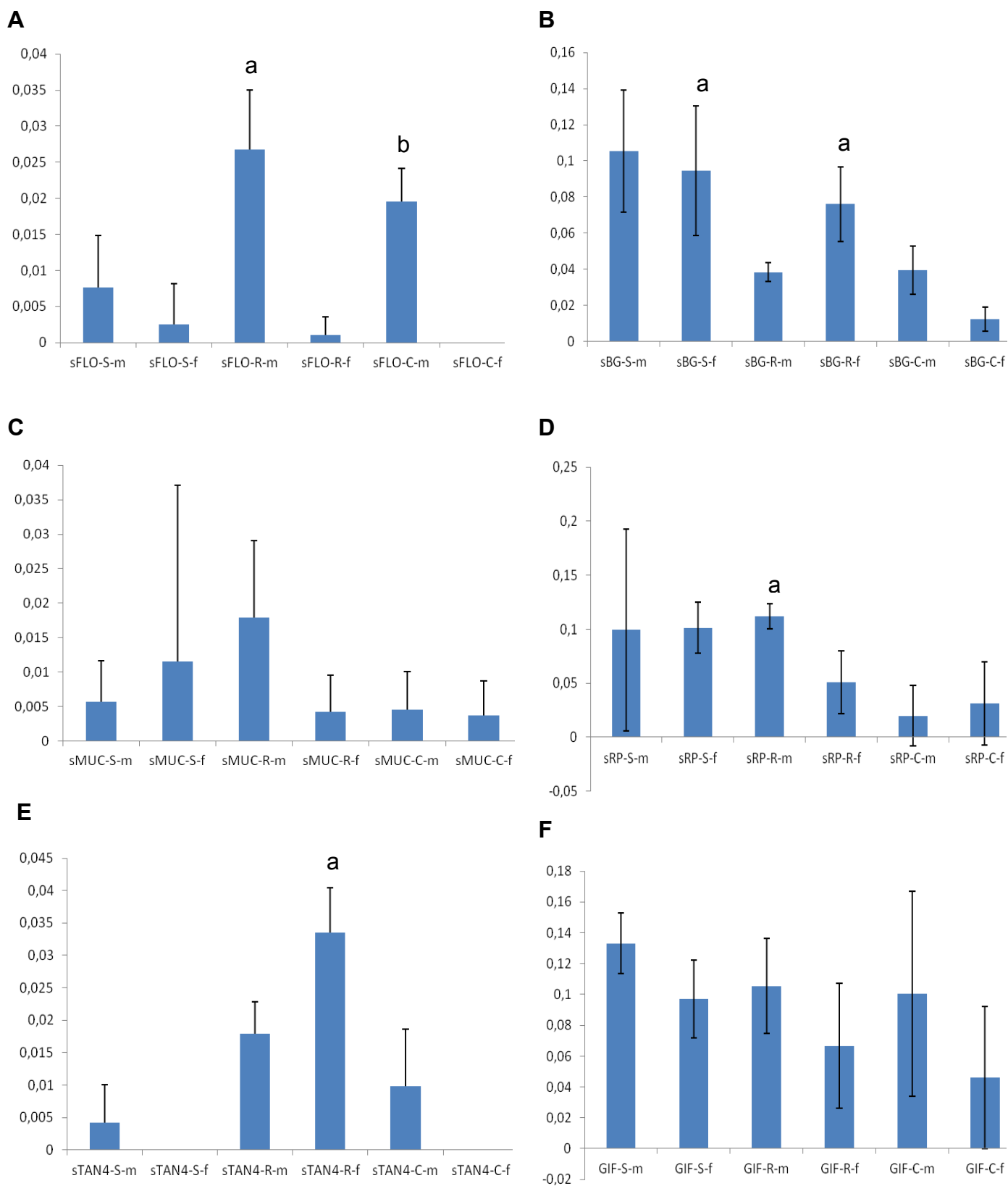
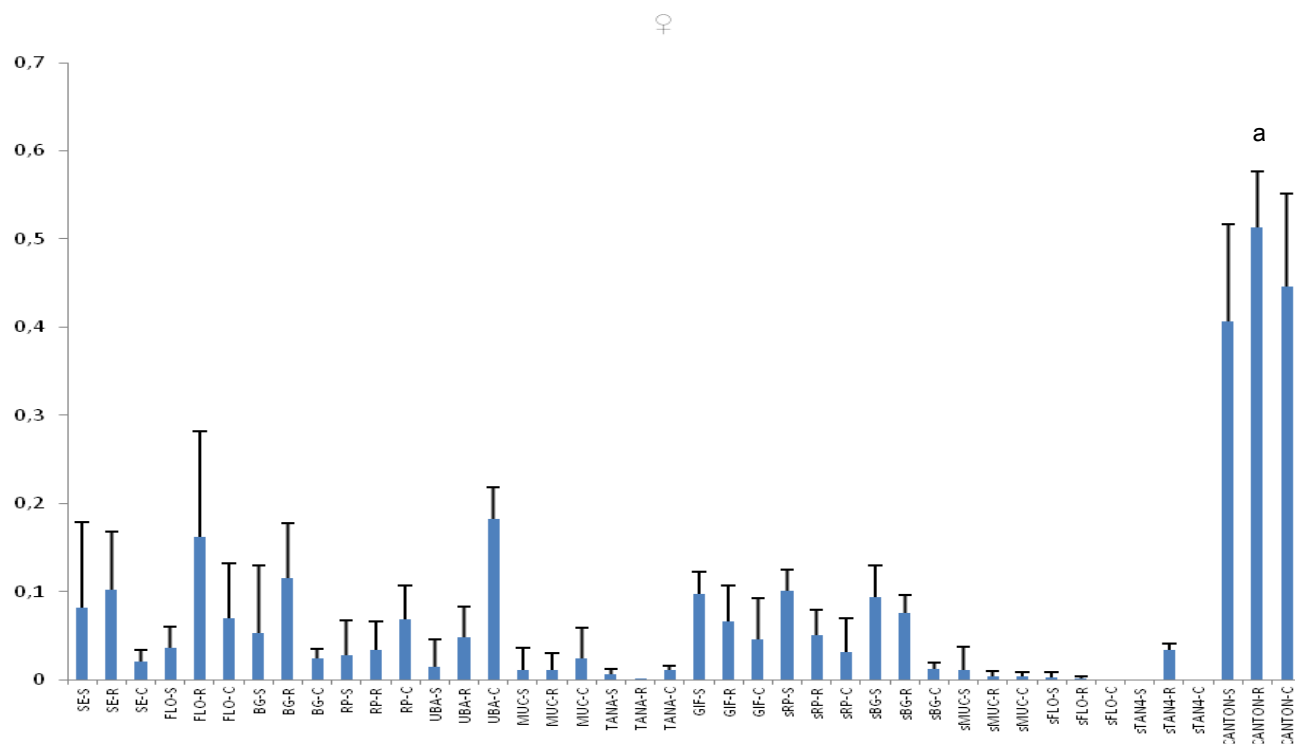


Figura 20 A-F. Média total e desvio padrão da atividade da GST das linhagens brasileiras, africana e francesa de *D. simulans*. Floripa (A); Bento Gonçalves (B); Mucuri (C); Rio Preto (D); TANA-4 (E); GIF-2 (F). Em A diferença significativa com FLO resistente (a) e controle (b). Em B diferença significativa com BG susceptíveis e resistentes (a). Em D diferença significativa com RP controle. Em E diferença significativa com TANA-4 susceptíveis e controle (a), $p < 0,05$.

A



B

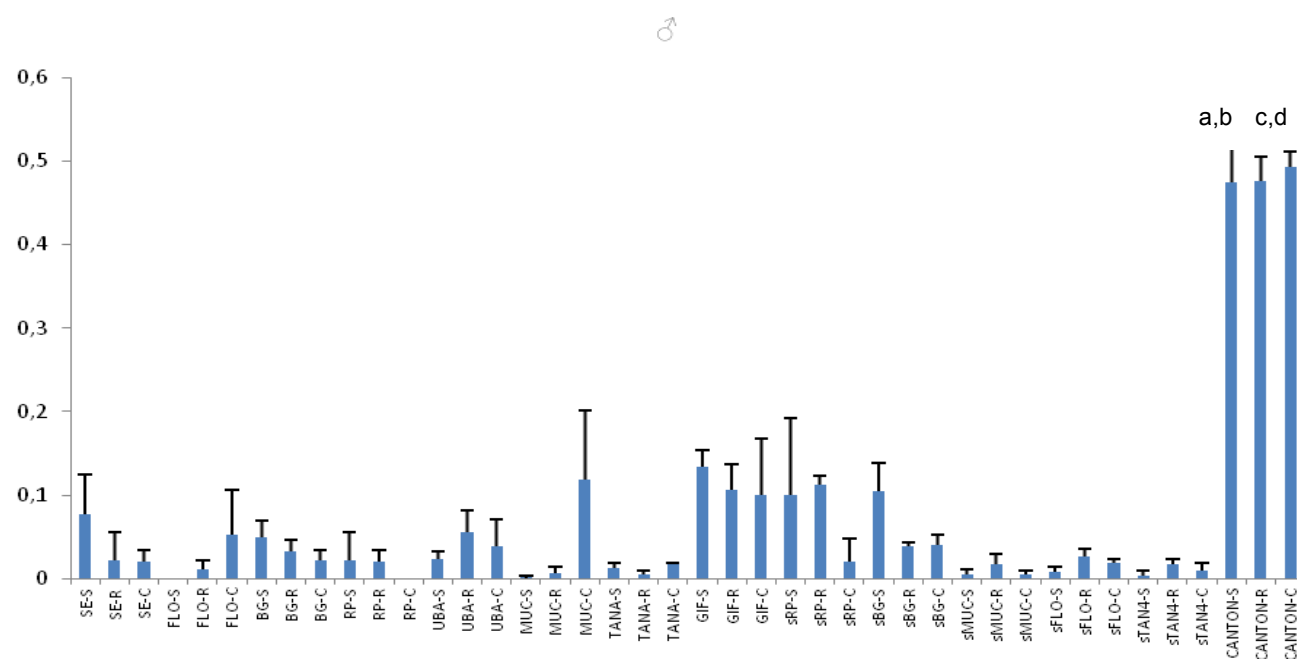


Figura 21A-B. Media total e desvio padrão da atividade da GST das linhagens brasileiras, africanas e francesa. Em A diferença estatisticamente significativa em relação ao TANA resistente. Em B diferença estatisticamente significativa com FLO susceptível (a); diferença estatisticamente significativa com MUC susceptível (b); diferença estatisticamente significativa com MUC resistente (c); diferença estatisticamente significativa com TANA resistente(d), $p < 0,05$.

Tabela 10. Média e desvio padrão das comparações da atividade enzimática da GST entre as linhagens das espécies de *D. melanogaster* e *D. simulans*.

Espécies e linhagens			
	Resistentes	Susceptíveis	Controle
Brasileira			
<i>D. melanogaster</i>	0,051 ± 0,06	0,033 ± 0,04	0,082 ± 0,11
Africana			
TANA	0,002 ± 0,004	0,008 ± 0,006	0,013 ± 0,005
Brasileira			
<i>D. simulans</i>	0,041 ± 0,03	0,053 ± 0,05	0,016 ± 0,02
Africana			
TANA-4	0,025 ± 0,01	0,002 ± 0,004	0,004 ± 0,007
Francesa			
GIF-2	0,086 ± 0,03	0,115 ± 0,02	0,073 ± 0,06

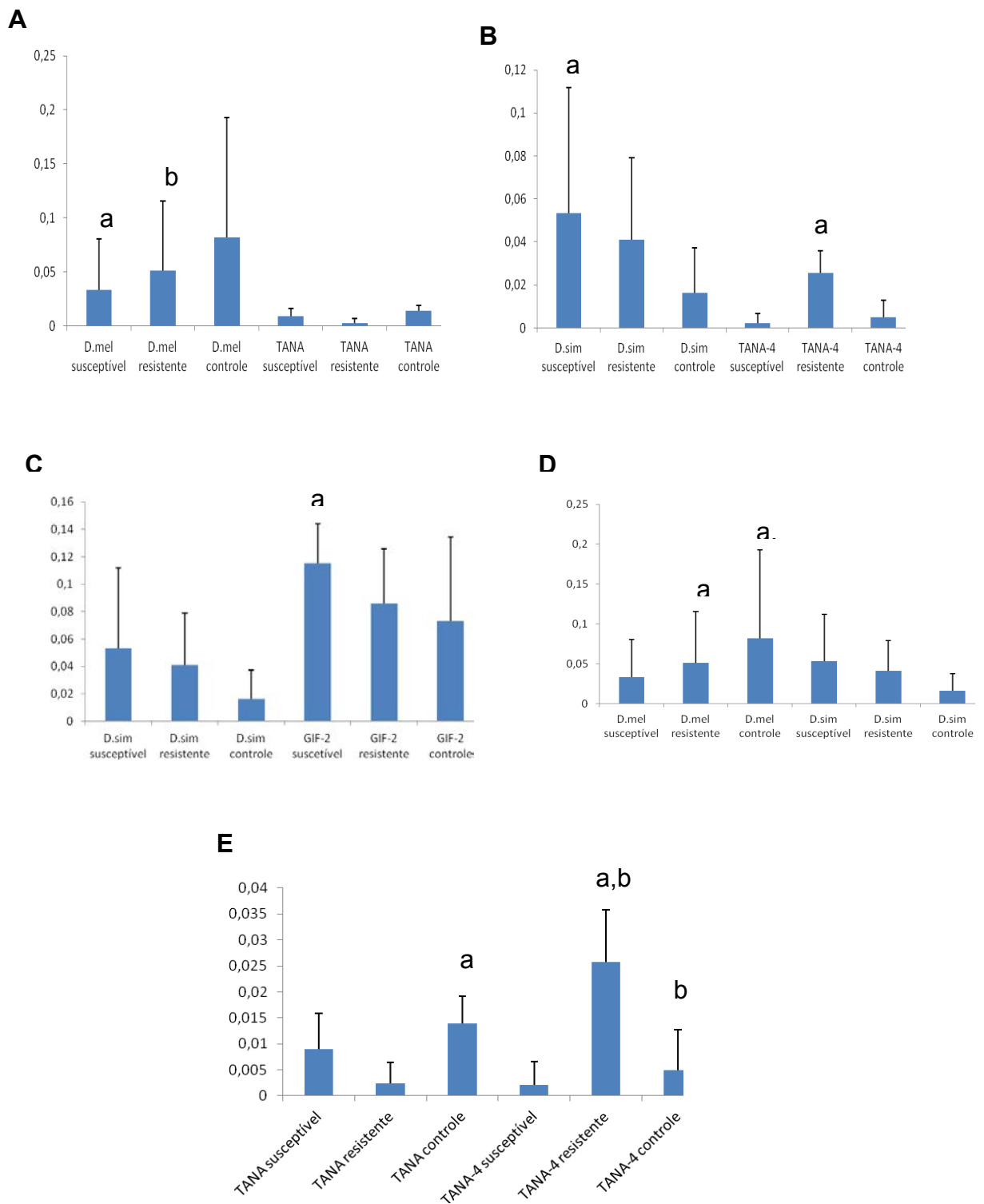


FIGURA 22A-E. Média total e desvio padrão da atividade da GST das linhagens brasileiras e africana de *D. melanogaster*. (A); das linhagens brasileiras e africana de *D. simulans* (B); das linhagens brasileiras e francesa de *D. simulans* (C); das linhagens brasileiras de *D. melanogaster* e de *D. simulans* (E). Em A diferença significativa com *D. mel* resistente e controle (a) e diferença significativa com TANA resistente (b). Em B diferença significativa com TANA-4 susceptível (a). Em C diferença significativa com *D. sim* susceptível (a). Em D diferença significativa em relação a *D. mel* susceptível (a), diferença significativa em relação ao *D. sim* controle (b). Em E diferença significativa em relação a TANA resistente (a), diferença significativa em relação a TANA-4 susceptível, $p < 0,05$.

5. DISCUSSÃO

Drosophila melanogaster e *D. simulans* são duas espécies intimamente relacionadas, com uma área de distribuição similar. Elas são particularmente intrigantes, pois embora estejam entre as espécies mais comuns de *Drosophila*, o local exato de sua origem e de seu ancestral ainda não foi satisfatoriamente explicado.

O presente trabalho teve por objetivo caracterizar linhagens geográficas destas espécies quanto à variabilidade genética da resistência ao inseticida DDT, do padrão de esterases, (em particular da β esterase-6) e da atividade da glutathione S-transferase, em linhagens com fenótipos resistentes e suscetíveis.

Foi verificado nos bioensaios que as linhagens de *D. melanogaster* e *D. simulans* tiveram diferenças significantes da frequência de alelos para a resistência ao inseticida DDT, sendo muito maior para *D. melanogaster* do que para *D. simulans*.

A linhagem brasileira UBA de *D. melanogaster* foi a que apresentou a maior CL_{50} (263,70 $\mu\text{g/mL}$) e para *D. simulans* a maior CL_{50} foi obtida com FLO (94,60 $\mu\text{g/mL}$). Evidenciando uma resistência três vezes maior para *D. melanogaster* do que para *D. simulans*. A linhagem MUC de *D. mel* que apresentou a menor CL_{50} (53,87 $\mu\text{g/mL}$) também foi a que apresentou a menor em *D. simulans*, só que com valor cinco vezes menor ($CL_{50} = 10,58 \mu\text{g/mL}$). A linhagem *Canton-S* de *D. melanogaster* é uma linhagem de laboratório caracterizada como sendo suscetível e o valor obtido de $CL_{50} = 2,99 \mu\text{g/mL}$ esta dentro do esperado. Os altos valores de CL_{50} obtidos para as linhagens africanas de *D. melanogaster* e *D. simulans*, TANA e TANA-4, respectivamente 447,89 $\mu\text{g/mL}$ e 920 $\mu\text{g/mL}$ é indicativo de que estas linhagens estão sendo selecionadas na sua região de origem, pelo DDT, que ainda continua sendo utilizado em regiões geográficas menos desenvolvidas ou outro inseticida que apresenta

resistência cruzada com o DDT, como por exemplo, o imidaclopride (Le GOFF et al., 2003).

A resistência a inseticidas foi encontrada em populações naturais de *D. melanogaster* logo no início do uso difundido e sistemático de inseticidas sintéticos na década de 50. A resistência ao DDT tem persistido em populações naturais de *D. melanogaster* por longo tempo, mesmo após a retirada desse inseticida em muitos locais e mesmo em linhagens de laboratório, a resistência tem persistido na ausência da pressão de seleção do inseticida (WILSON et al., 2005). Existe pouca evidência de que a resistência é “perdida” em estoques de laboratório (ao menos que haja uma introdução acidental de um alelo suscetível na cultura). Desde que a resistência resulta de uma ou mais mutações gênicas, esta estabilidade no fenótipo resistente não é surpreendente e de fato é esperada.

Muitos estudos têm examinado a resistência em *D. simulans*, uma espécie simpátrica e críptica de *D. melanogaster*, tendo se separado evolutivamente há somente 2-3 milhões de anos (LACHAISE et al., 2004). A distribuição geográfica dessas espécies se sobrepõe, e ambas ocorrem em locais onde o uso de inseticidas tem sido contínuo.

Windelspencht et al. (1995) verificaram que uma linhagem de *D. simulans* da Flórida foi 100 vezes mais resistente ao malation do que *D. melanogaster* da mesma localidade. Em outro trabalho, foi observado que a resistência ao malation é espalhada em *D. simulans*, mas varia consideravelmente em *D. melanogaster*, e o padrão de tolerância à avermectina é significativo em ambas as espécies, mas apresenta significativa variação nesses níveis, entre as diferentes regiões geográficas. Os autores atribuem essas diferenças à estrutura populacional e à história de exposição a inseticidas (WINDELSPENCHT et al., 1995)

No trabalho de Granzoto e Madi-Ravazzi (2007) em que foi analisada a suscetibilidade para o inseticida imidaclopride, o qual tem resistência

cruzada com o DDT (LE GOFF et al., 2003), de linhagens geográficas de *D. melanogaster* e *D. simulans*, também foi verificado valores da CL_{50} maiores para as linhagens de *D. melanogaster* comparadas com as de *D. simulans*. Para linhagens de *D. mel*, RP foi a que apresentou o maior valor (49,27 $\mu\text{g/mL}$) seguido por SM (26,99 $\mu\text{g/mL}$) e LE (14,53 $\mu\text{g/mL}$), sendo que o menor valor foi obtido para SE (0,11 $\mu\text{g/mL}$). Para *D. simulans*, os maiores valores foram obtidos para BO (8,12 $\mu\text{g/mL}$) e BG (6,06 $\mu\text{g/mL}$).

Valores maiores da CL_{50} para as linhagens de *D. melanogaster* pode estar associada ao custo adaptativo da resistência que é diferente em ambas as espécies.

A resistência ao DDT (DDT-R) está se aproximando de uma fixação global em *D. melanogaster*, mesmo após ter sido abolido o uso intenso do DDT em atividades agrícolas, embora ainda seja utilizado no controle de insetos vetores (CATANIA et al., 2004). Isso pode ser devido a outro inseticida que continuou a seleção, por resistência cruzada ou porque esse loco parece ter pouco ou nenhum efeito sobre o valor adaptativo das moscas que o transportam (WILSON, 2005; McCART; BUCKLING; FFRENCH-CONSTANT, 2005).

McCart et al. (2005) demonstraram que o loco DDT-R, ou um modificador ligado próximo ao gene, quando herdado via fêmea, aumenta a fecundidade do adulto e a viabilidade de ovos e larvas, bem como a velocidade do desenvolvimento de larvas e pupas em linhagens de *D. melanogaster*. O que pode explicar em parte a não existência de custo adaptativo para as populações de *D. melanogaster* mas não de *D. simulans* cujos valores das CL_{50} são mais baixos. Pode ser que para *D. simulans* o genótipo resistente seja custoso, o que explicaria valores de CL_{50} .

D. melanogaster e *D. simulans* são polimórficas para as duas principais aloenzimas da EST6 (CABRERA et al, 1982) e as frequências relativas destas variantes, EST6-F e EST6-S, evidenciam um cline latitudinal (OAKESHOTT et al., 1981; BUBLIY et al., 1999). A EST6-F

torna-se rara e a EST6-S mais frequente com o aumento da distância do equador. Um padrão semelhante é encontrado para *D. simulans* (ANDERSON; OAKESHOTT; 1984). O fato que este cline ocorre nos quatro continentes sugere que estão sob um forte processo seletivo (COPPIN et al., 2007).

Cooke et al. (1987) detectaram 10 classes eletroforéticas da *Est-6* em 157 linhagens isoalélicas de *D. melanogaster*. Entretanto, somente quatro variantes: *Est6-VF*, *Est6-F'*, *Est6-F* e *Est6-S*, têm sido mais evidentes usando o procedimento padrão de eletroforese para esterases.

No presente estudo foram detectadas mais visivelmente nos géis analisados, duas bandas β -esterásicas (vermelhas), as quais foram reconhecidas como as variantes alélicas da *Est-6*, *S (slow)* e *F (fast)*. E também analisamos a frequência de duas bandas α esterásicas (pretas), as quais denominamos $\alpha-1$ e $\alpha-2$, sendo que a banda $\alpha-2$ foi observada em 100% dos indivíduos analisados de ambas as espécies. Em alguns géis, mas com frequência bem menor, outras bandas, β e α , apareceram em algumas linhagens, mas como a qualidade dos géis não estava adequada para a análise, estas bandas não foram consideradas.

A frequência dos três fenótipos da EST6 foi diferente entre fêmeas e machos resistentes das linhagens brasileiras de *D. melanogaster* e *D. simulans*. Para *D. melanogaster* a maior diferença foi para os fenótipos *F/F* e *S/F*. As fêmeas resistentes tiveram maior frequência do fenótipo *F/F* e *S/F* e nos machos os heterozigotos foram mais frequentes. Para *D. simulans*, as fêmeas e machos resistentes, das linhagens brasileiras, tiveram maior frequência para o fenótipo *S/F*.

Para as linhagens brasileiras suscetíveis de ambas as espécies também houve diferença na frequência dos fenótipos de EST6 na comparação entre os sexos, que diferiram das linhagens resistentes. Para as fêmeas suscetíveis de *D. melanogaster* os fenótipos *S/S* e *F/F* foram os mais frequentes e para os machos foram *S/F* e *S/S*. Para *D. simulans*,

as fêmeas e machos mostraram frequências altas para o fenótipo *F/F*, seguida por uma frequência moderada do fenótipo *S/F*.

O baixo número de indivíduos analisados nas linhagens *Canton-S*, *TANA*, *TANA-4* e *GIF-2*, bem como a qualidade dos géis, fez com que incluíssemos os resultados na avaliação do total geral das frequências dos fenótipos da *EST6*, e assim não destacamos estas linhagens individualmente na discussão.

Na comparação do total geral da frequência dos fenótipos da *EST6* observa-se uma maior frequência de *S/F* para os indivíduos resistentes de ambas as espécies e para os suscetíveis de *D. melanogaster*, embora nesta espécie o fenótipo *S/S* também tinha apresentado uma diferença de frequência significativa, que precisa ser testada estatisticamente. Os indivíduos suscetíveis de *D. simulans*, apresentaram o fenótipo *F/F*, como o mais frequente.

Linhagens brasileiras de ambas as espécies não haviam sido estudadas anteriormente em relação à frequência destes fenótipos da *EST6*. Considerando o fato da distribuição clinal dos alelos *S* e *F* em várias populações do mundo (WHITE et al., 1988), era esperado que as linhagens brasileiras e africanas mostrassem uma frequência maior do alelo *S* do que do alelo *F* e para a linhagem francesa, a frequência seria do alelo *F*.

Pelos dados do total de indivíduos analisados nas linhagens brasileiras de *D. melanogaster* (227), a frequência obtida para o alelo *S*, foi de 0,55 contra 0,46 do alelo *F*. Esta frequência para o total de indivíduos de *D. simulans* (133) foi de 0,54 para o alelo *F* e 0,43 para o alelo *S*. Embora a frequência do alelo *S* tenha sido ligeiramente maior que a de *F* em *D. melanogaster*, para ambas as espécies a frequência dos alelos está equitativa, assim não esta de acordo com o esperado pelos dados da literatura, segundo os quais o alelo *S* deveria ser o mais frequente para as populações brasileiras próximas ao equador (norte e nordeste) e o alelo *F* mais frequente nas populações da região centro-

oeste, sudeste e sul (WHITE, et al., 1988). Esta diferença pode estar relacionada a manutenção das linhagens em laboratório que podem ter sofrido algum gargalo genético, ou a submissão das moscas ao bioensaio com o inseticida DDT o qual pode ter favorecido alguns genótipos, desviando da proporção esperada, ou seja, de maior frequência para o alelo *S* em relação ao *F* para populações distantes do equador, ou ainda outro fator da história de vida das linhagens que escaparam à nossa análise.

A frequência dos alelos *S* e *F* nas linhagens resistentes de ambas as espécies também foram equivalentes, entretanto nas linhagens suscetíveis de *D. melanogaster* o alelo *S* apresentou uma frequência maior que *F*, sendo que o inverso foi obtido para *D. simulans*.

Quando comparamos o total de indivíduos analisados (*R* + *S*) das linhagens africanas de ambas as espécies, o alelo *S* foi mais frequente que o alelo *F*, para a linhagem TANA de *D. melanogaster* (0,75) e para a linhagem TANA-4 de *D. simulans* (0,70), embora o número de indivíduos analisados destas espécies tenha sido pequeno, 35 e 38, respectivamente. Destaca-se que estas foram as linhagens que apresentaram os maiores valores da CL_{50} , e também foram mais recentemente coletadas que as linhagens brasileiras, assim, podem ter sofrido menos a influência da manutenção em laboratório ou do tratamento com o inseticida, e mantido as frequências de suas populações naturais.

A linhagem GIF-2 de *D. simulans*, procedente da França, também teve um número pequeno de indivíduos analisados e neste caso o alelo *S* apresentou maior frequência (0,65) que o alelo *F* (0,34), o que também não está de acordo com dados da literatura, pois nesta latitude a maior frequência deveria ser de *F*. A explicação dada aqui é a mesma que já apresentamos para as outras linhagens: o tamanho amostral e o efeito do bioensaio com o DDT podem ter enviesado as frequências.

Pelas análises efetuadas na frequência dos fenótipos da EST6 em linhagens resistentes e suscetíveis de *D. melanogaster* e *D. simulans* há indicação de maior frequência dos heterozigotos nestas linhagens, que deverá ser testada com análises estatísticas mais refinadas e também parece não haver diferença na frequência dos alelos *S* e *F* entre os fenótipos resistentes e suscetíveis de ambas as espécies.

A banda α esterase-2 analisada no presente trabalho apresentou uma alta frequência na maioria das linhagens brasileiras, africana e em *Canton-S* de *D. melanogaster*. Em alguns indivíduos testados ela não foi observada, como nos BG resistentes, fêmeas BG suscetíveis, fêmeas SE suscetíveis, fêmeas *Canton-S* resistentes. A baixa frequência desta banda ou mesmo a ausência em algumas linhagens precisa ser reavaliada, pois parece que este resultado pode ser atribuído a uma amostragem não adequada para a análise. Destaca-se a alta frequência (90-100%) na linhagem africana TANA, que apresentou o maior valor de CL_{50} . Em algumas linhagens foi apresentada uma diferença na frequência entre os sexos da banda α -2, mas este dado também precisa ser reavaliado ampliando-se o número de indivíduos analisados.

Esta banda foi menos frequente em *D. simulans* do que em *D. melanogaster*. Também não foi observada uma diferença significativa na comparação entre os sexos e nos indivíduos resistentes a frequência foi maior que os suscetíveis. Destaca-se também a ausência desta banda em todos os indivíduos analisados da linhagem BG, em machos suscetíveis RP e nos indivíduos resistentes de GIF-2. Do mesmo modo que em *D. melanogaster* esta análise será melhor interpretada com a ampliação de amostras mais adequadas para esta análise.

Em relação à análise da GST, em ambas as espécies, destacam-se valores relativamente baixos de atividade para a maioria dos indivíduos fenotipados como resistentes e suscetíveis e mesmo para os indivíduos não submetidos ao bioensaio com o DDT (controle). E a vista dos números não foi possível verificar diferenças na atividade da GST entre

estas espécies, somente alguns casos pontuais nos resultados foram destacados.

As fêmeas controle SE de *D. melanogaster* foram as que apresentaram o maior valor de atividade da GST entre as linhagens brasileiras, seguida pelas fêmeas resistentes de SE, FLO e BG. Os maiores valores de atividade da GST foram obtidos para a linhagem *Canton-S*, a qual apresentou valores correspondentes em ambos os sexos dos indivíduos resistentes, suscetíveis e controle, indicando não haver uma atividade diferencial desta enzima entre estes grupos amostrados.

Como a análise da atividade da GST realizada no presente trabalho envolve um conjunto de GSTs, incluindo vários grupos, e como foi destacado anteriormente, há um grupo específico de GST que tem sido identificado nos processos de detoxificação de xenobióticos (SHI, et al, 2012), a metodologia pode não ter sido sensível o suficiente para destacar este grupo específico. Ou de modo geral podemos inferir que houve um sinergismo negativo entre a atividade da GST e a suscetibilidade ao DDT. Linhagem suscetível, como *Canton-S*, com o menor valor de CL50 obtido ($=2,99\mu\text{g/mL}$) apresentou os maiores valores de atividade da GST, e as linhagens africanas, TANA e TANA-4, com os maiores valores de CL50 (respectivamente, $447,89\mu\text{g/mL}$ e $920\mu\text{g/mL}$), apresentaram valores de atividade da GST extremamente baixos.

Os dados mostram maior variabilidade genética para *D. melanogaster* em relação à resistência ao DDT, alta resistência para as linhagens africanas de ambas as espécies, indicando que estas populações continuam sendo selecionadas por este ou outro inseticida, a inexistência de um cline para os alelos *S* e *F* nas linhagens de ambas as espécies, sugere-se que o tratamento com o DDT pode ter selecionado os indivíduos heterozigotos para algumas linhagens e isto pode ter mascarado o cline destas linhagens, ou mesmo um efeito de gargalo também não pode ser descartado. Quanto à análise da GST observou-se

um sinergismo negativo entre a atividade da GST e o grau de resistência ao inseticida. A linhagem mais suscetível (*Canton S* de *D. melanogaster*) mostrou o nível mais alto de atividade da GST e as linhagens mais resistentes (africanas de ambas as espécies), os níveis mais baixos.

6. CONCLUSÕES ESPECÍFICAS

- As linhagens brasileiras de *D. melanogaster* e *D. simulans* apresentam variabilidade genética quanto à suscetibilidade ao inseticida DDT, avaliada pela CL_{50} ;
- Os maiores valores de CL_{50} obtidos foram para as linhagens de *D. melanogaster*;
- A linhagem Canton-S, suscetível de laboratório, foi a que apresentou o menor valor $CL_{50} = 2,99$;
- As linhagens africanas de *D. melanogaster* (TANA) e *D. simulans* (TANA-4) foram as que apresentaram os maiores valores de CL_{50} respectivamente, $447,89\mu\text{g/mL}$ e $920\mu\text{g/mL}$;
- Para linhagem GIF-2 de *D. simulans*, da França, o valor da CL_{50} foi de $84,64\mu\text{g/mL}$, semelhante ao obtido para linhagens brasileiras desta espécie.
- Na comparação do total geral da frequência dos fenótipos da EST-6 observa-se uma maior frequência de *S/F* para os indivíduos resistentes de ambas as espécies e para os suscetíveis de *D. melanogaster*;
- Os indivíduos suscetíveis de *D. simulans*, apresentaram o fenótipo *F/F*, como o mais frequente;
- Pela análise do total de indivíduos analisados nas linhagens brasileiras de *D. melanogaster* (227), a frequência obtida para o alelo *S*, foi de 0,55 contra 0,46 do alelo *F*. Esta frequência para o total de indivíduos de *D. simulans* (133) foi de 0,54 para o alelo *F* e 0,43 para o alelo *S*;
- Embora a frequência do alelo *S* foi ligeiramente maior que a de *F* em *D. melanogaster*, para ambas as espécies a frequência dos alelos está equitativa;

- A frequência dos alelos *S* e *F* nas linhagens resistentes de ambas as espécies também foram equivalentes, entretanto nas linhagens suscetíveis de *D. melanogaster* o alelo *S* apresentou uma frequência maior que *F*, o inverso foi obtido para *D. simulans*;
- Em relação à análise da GST em ambas as espécies, destacam-se valores relativamente baixos de atividade para a maioria dos indivíduos fenotipados como resistentes e suscetíveis e mesmo para os indivíduos não submetidos ao bioensaio com o DDT (controle);
- Os maiores valores de atividade da GST obtidos foi para a linhagem *Canton-S*, a qual apresentou valores correspondentes em ambos os sexos dos indivíduos resistentes, suscetíveis e controle, indicando não haver uma atividade diferencial desta enzima entre estes grupos amostrados.

7. CONCLUSÃO GERAL

As linhagens brasileiras de *D. melanogaster* apresentaram os maiores valores de CL₅₀ nos bioensaios da resistência ao DDT quando comparadas com as de *D. simulans*. As linhagens africanas de *D. melanogaster* e *D. simulans* foram as mais resistentes apresentando valores até três vezes maiores que as das linhagens brasileiras. A linhagem francesa de *D. simulans* apresentou resistência semelhante às linhagens brasileiras de maior resistência. Não foi observada uma variação clinal das frequências dos alelos *S* e *F* da EST-6 para as linhagens de *D. melanogaster* e *D. simulans*, que foi explicado como uma possível seleção dos diferentes fenótipos ao bioensaio com o DDT ou como um efeito de um gargalo sofrido pelas populações em laboratório. A atividade da GST foi baixa para a maioria das linhagens, com exceção de *Canton-S*, uma linhagem suscetível de laboratório, a qual apresentou os maiores valores de GST, e as linhagens africanas resistentes TANA e TANA-4, respectivamente de *D. melanogaster* e *D. simulans* apresentaram os menores valores. Para explicar estes resultados foi sugerido uma relação sinérgica da atividade da GST e nível de suscetibilidade ao DDT, entretanto, estes dados precisam ser averiguados em maiores detalhes.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSIN, M. Role of microsomal oxidations in insecticide degradations. In: KERKUT, G. A., GILBERT, L. I. (Ed.). **Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology**. Oxford: Pergamon, 1985. v. 12, p. 647-712.

ANDERSON, P. R.; OAKESHOTT, J. G. Parallel geographic patterns of allozyme variation in two sibling *Drosophila* species. **Nature**, v. 308, p. 729–731, 1984.

ARGENTINE, J.A.; JAMES, A. A. Characterization of a salivary gland specific esterase in the vector mosquito, *Aedes aegypti*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 25, n. 5, p. 621–630, 1995.

ARMSTRONG, R.N. Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. **Chemical Research in Toxicology**, v. 10, p. 2–18. 1997.

AQUADRO, C. F.; LADO, K. M.; NOON, W. A. The rosy region of *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans* I. Contrasting levels of naturally-occurring DNA restriction map variation and divergence. **Genetics**, Austin, v. 119, n. 4, p. 875-888, 1988.

AULARD, S.; MONTI, L.; CHAMINADE, N.; LEMEUNIER, F. Mitotic and polytene chromosomes: comparisons between *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans*. **Genetica**, Dordrecht, v. 120, n. 1/3, p. 137-150, 2004.

AYOOLA, J.A.; GARCIA-ALONSO, J.; HARDEGE, J. D. Glutathione-S-transferase in *Nereis succinea* (Polychaeta) and its induction by xeno-estrogen. **Environmental Toxicology**, v. 5, p. 559-565, 2010.

BABA-AISSA, F.; SOLIGNAC, M. La plupart des populations de *Drosophila simulans* ont probablement pour ancêtre une femelle unique dans un passé récent. **Les Comptes Rendus de l'Académie des Sciences**, Paris, v. 299, p. 289-292, 1984.

BALAKIREV, E.S.; BALAKIREV, E. I.; AYALA, F. J. Molecular evolution of the *Est-6* gene in *Drosophila melanogaster*: contrasting patterns of DNA variability in adjacent functional regions. **Gene**. v. 288, p. 167-177, 2002.

BALAKIREV, E. S.; BALAKIREV, E.I.; RODRÍGUEZ-TRELLES, F.; AYALA, F. J. Molecular evolution of two linked genes, *Est-6* and *Sod*, in *Drosophila melanogaster*. **Genetics**, Austin, v. 153, p. 1357–1369.1999.

BRATTSTEN, L. B. et al. Insecticide resistance: challenge to pest management and basic research. **Science**, Washington, v. 231, n. 4743, p. 1255-1260, 1986.

BUBLIY, O.A.; KALABUSHKIN, B.A.; IMASHEVA, A.G. Geographic variation of six allozyme loci in *Drosophila melanogaster*: an analysis of data from different continents. **Hereditas**, v. 130, n. 1, p. 25-32, 1999.

CABRERA, V. M.; GONZALEZ, A. M.; ARRUGA, J. M.; GULLON, A. Electrophoretic variability in natural populations of *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans*. **Genetica**, Dordrech, v.59, p. 191-201, 1982.

CAGGESE, C.; RAGONE, G.; MASSARI, S.; BARSANTI, P. The S-adenosyl-l-homocysteine hydrolase of *Drosophila melanogaster*: a model for the study of an enzyme target for antineoplastic and antiviral drugs. **Europ. Dros. Res.** v. 14, p. 231, 1995.

CARVALHO, V. M.; MARQUES, R. M.; LAPENTA, A. S. Functional classification of esterases from leaves of *Aspidosperma polyneuron* M. Arg. (Apocynaceae). **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 26, n. 2, p. 195-198, 2003.

CATANIA, F. et al. World-wide survey of an *Accord* insertion and its association with DDT resistance in *Drosophila melanogaster*. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 13, n. 8, p. 2491-2504, 2004.

CERON, C.R.; SANTOS, J.R.; BICUDO, H. E. M. C. The use of gelatin to dry cellophane wound slab gels in an embroidering hoop. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 15, n. 1, p. 201–203, 1992.

CERON, C. R. **Padrão de Esterases no Desenvolvimento de *Drosophila mulleri*, *D. arizonensis* e Seus Híbridos**.1988. Dissertação (Doutorado)-Instituto de Biociência, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1988.

CHAKRABORTI, S.; MICHAEL, J. R.; GURTNER, G. H.; GHOSH, S.; DUTTA, S.; MERKER, G. A role of a membrane-associated serine esterase in the oxidant activation of phospholipase A₂ by t-butyl hydroperoxide. **The Biochemical Journal**, London, v. 292, p. 585-589, 1993.

CHEN, B.; ZHOU Y.; YANG, P.; WU, X.T. Glutathione S-transferase M1 gene polymorphism and gastric cancer risk: an updated analysis. **Arch. Med. Res.** v. 41, p. 558–566, 2010.

CHO, Y. G.; EUN, M. Y.; KIM, Y. K.; CHUNG, T. Y. The semidwarf gene, *sd-1*, of rice (*Oriza sativa* L.) I. Linkage with the esterase locus, *Estl-2*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 89, p. 49-53, 1994.

CHOUDHARY, M.; COULTHAT, M. B.; SINGH, R. S. A comprehensive study of genic variation in natural populations of *Drosophila melanogaster*. VI. Patterns and processes of genic divergence between *D. melanogaster* and its sibling species, *Drosophila simulans*. **Genetics**, Austin, v. 130, n. 4, p. 843-853, 1992.

CHOUDHARY, M.; SINGH, R. S. A comprehensive study of genic variation in natural populations of *Drosophila melanogaster* 3. Variations in genetics-structure and their causes between *Drosophila melanogaster* and its sibling species *Drosophila simulans*. **Genetics**, Austin, v. 117, n. 4, p. 697-710, 1987.

COCHRANE, B. J.; RICHMOND, R. C. Studies of esterase-6 in *Drosophila melanogaster*. II. The genetics and frequency distributions of naturally occurring variants studied by electrophoresis and heat stability criteria. **Genetics**, v. 93, p. 461-478, 1979.

COOKE, P. H.; RICHMOND, R. C.; OAKESHOTT, J. G. High resolution electrophoretic variation at the *esterase-6* locus in a natural population of *Drosophila melanogaster*. **Heredity**, London, v. 59, p. 259-264, 1987.

COOKE, P. H.; OAKESHOTT J. G. Amino acid polymorphisms for esterase-6 in *Drosophila melanogaster*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 86, p. 1426-1430, 1989.

COPPIN, C. W.; ODGERS, W. A.; OAKESHOTT, J. G. Latitudinal clines for nucleotide polymorphisms in the Esterase 6 gene of *Drosophila melanogaster*. **Genetica**, Dordrecht, v. 129, p. 259-271, 2007.

COUSTAU C.; CHEVILLON, C.; FFRENCH-CONSTANT, R. H. Resistance to xenobiotics and parasites: can we count the cost? **Trends in Ecology and Evolution**, Amsterdam, v. 15, n. 9, p. 378-383, 2000.

DAVID, J. R.; TSACAS, L. Cosmopolitan, subcosmopolitan and widespread species: different strategies within the *Drosophilid* family

(Diptera). **Compte Rendu des Seances de la Societe de Biogeographie**, Paris, v. 57, p. 11-26, 1981.

DAVID, J. R.; CAPY, P. Genetic variation of *Drosophila melanogaster* natural populations. **Trends in Genetics**, London, v. 4, n. 4, p. 106-111, 1988.

DAVID, J. R.; TSACAS, L. L'evolution des Drosophilides: l'oeil du paléontologiste et l'oeil du biologiste généticien. **Colloques Internationaux du Centre National de la Recherche Scientifique**, Paris, v. 330, p. 249-257, 1983.

DAVIES, A. G.; GAME, A. Y.; CHEN, Z.; WILLIAN, T. J.; GOODAL, S.; YEN, J. L.; MCKENZIE, J. A.; BATTERHAM, P. Scalloped wing is the *Lucilia cuprina* Notch homologue and candidate for the modifier of fitness and asymmetry of diazinon resistance. **Genetics**, Austin, v. 143, p. 1321-1337, 1996.

DING, Y. et al. The *Anopheles gambiae* glutathione transferase supergene family: annotation, phylogeny and expression profiles. **BMC Genomics**, v. 4, p. 35, 2003.

DUMANCIC, M. M.; OAKESHOTT, J. G.; RUSSELL, R. J.; HEALY, M. J. characterization of the estp protein in *Drosophila melanogaster* and its conservation in drosophilids. **Biochemistry Genetics**, v. 35, n. 7-8, p. 251-271, 1997.

ENAYATI, A. A.; RANSON, H.; HEMINGWAY, J. Insect glutathione transferases and insecticide resistance. **Insect Molecular Biology**, v.14, p. 3-8, 2005.

FEYEREISEN, R. Molecular biology of insecticide resistance. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 82-83, p. 83-90, 1995.

FEYEREISEN, R. Insect P450 enzymes. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 44, p. 507-533, 1999.

FFRENCH- CONSTANT, R. H.; ROUSH, R. T.; CARINO, F. A. *Drosophila* as a tool for investigating the molecular genetics of insecticide resistance. In: GEORGHIOU, G. P.; SATIO, T. (Ed.). **Pest resistance to pesticides**. New York, 1993.

GIBERT, P.; CAPY, P.; IMASHEVA, A.; MORETEAU, B.; MORIN, J. P.; PÉTAVY, G.; DAVID, J. R. Comparative analysis of morphological traits among *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*: genetic variability,

clines and phenotypic plasticity. **Genetica**, Dordrecht, v. 120, p. 165-179, 2004.

GILBERT, D. G.; RICHMOND, R.C. Studies of esterase 6 in *Drosophila melanogaster*. XII. Evidence for temperature selection of *Est-6* and *Adh* alleles. **Genetica**, Dordrecht, v. 58, p. 109- 119, 1982.

GILBERT, D. G. Estimating single gene effects on quantitative traits. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 69, p. 625-629, 1985.

GLYNN, P. Neuropathy target esterase and phospholipid deacylation. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1736, p. 87-93, 2005.

GRANZOTTO, A. **Suscetibilidade ao DDT e imidaclopride em espécies invasoras e neotropicais da família Drosophilidae com ênfase na expressão dos genes *Cyp6g1* e *Cyp12d1***. 2007. 51 f. Dissertação (Mestrado)-Instituto de Biociência, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2007.

GUPTA, S. C.; SIDDIQUE, H. R.; SAXENA, D. K.; CHOWDHURI, D. K. Hazardous effect of organophosphate compound, dichlorovos in transgenic *Drosophila melanogaster* (*hsp70-lacZ*): Induction of *hsp70*, anti-oxidant enzymes and inhibition of acetylcholinesterase. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1725, p. 81-92, 2005.

HALE, L. R.; SINGH, R. S. Extensive variation and heteroplasmy in size of mitochondrial DNA among geographic populations of *Drosophila melanogaster*. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, v. 83, p. 8813-8817, 1986.

HASSON, E.; EANES, W. F. Contrasting histories of three gene regions associated with *In(3L)Payne* of *Drosophila melanogaster*. **Genetics**, Austin, v. 144, p. 1565–1575, 1996.

HAYES, J. D.; FLANAGAN, J. U.; JOWSEY, I. R. Glutathione transferases, **Annual Review of Pharmacology Toxicology**, v. 45, p. 51–88, 2005.

HEALY, M. J.; DUMANCIC, M. M.; OAKESHOT, J. G. Biochemical and physiological studies of soluble esterases from *Drosophila melanogaster*. **Biochemical Genetics**, New York, v. 29, p. 365–388, 1991.

HEMINGWAY, J.; KARUNARATNE, S. Mosquito carboxylesterases: a review of the molecular biology and biochemistry of a major insecticide resistance mechanism. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v. 12, p. 1-12, 1998.

HODGSON, E.; KULKARNI, A. P. Characterization of cytochrome P450 in studies of insecticide resistance. In: GEORGHIOU, G. P.; SAITO, Y. (Ed.). **Pest resistance to pesticides**. New York, 1983.

HYYTIA, P.; CAPY, P.; DAVID, J. R.; SINGH, R. S. Enzymatic and quantitative variation in European and African populations of *Drosophila simulans*. **Heredity**, London, v. 54, n. 2, p. 209-217, 1985.

JAKOBSSON, P. J.; MANCINI, J.A.; FORD-HUTCHINSON, A. W. Identification and characterization of a novel human microsomal glutathione S-transferase with leukotriene C4 synthase activity and significant sequence identity to 5-lipoxygenase-activating protein and leukotriene C4 synthase. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 271, p. 22203–22210, 1996..

JOHNSON, F. M.; RICHARDSON, R. H.; KAMBYSELLIS, M. P. An operational classification of *Drosophila* esterases for species comparisons. **Univ. Tex. Publ. Genet.** v. 6615, p. 5 17-532, 1966.

JONES, B. R.; BANCROFT, H. R. Distribution and probable physiological role of esterases in reproductive, digestive, and fat-body tissues of the adult cotton boll weevil, *Anthonomus grandis* Boh. **Biochemical Genetics**, New York, v. 24, n. 5/6, p. 499-508, 1986.

KAPIN, M. A.; AHMAD, S. Esterases in larval tissue of gypsy moth *Lymantria dispar* (L): Optimun assay conditions, quantification and characterization. **Insect Biochemistry**, Bistol, v. 10, p. 331-337, 1980

KETHIDI, D. R.; XI, Z.; PALLI, S. R. Developmental and hormonal regulation of juvenile hormone esterase gene in *Drosophila melanogaster*. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 51, p. 393-400, 2005.

KORT, C. A. D.; GRANGER, N. A. Regulation of the juvenile hormone titer. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 26, p. 1-28, 1981.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. v. 227, p. 680–685, 1970.

LABATE, J.; BORTOLI, A.; GAME, A.Y.; COOKE, P.H.; OAKESHOTT, J.G. The number and distribution of esterase 6 alleles in populations of *Drosophila melanogaster*. **Heredity**, London, v. 63, p. 203–208, 1989.

LACHAISE, D.; SILVAIN, J. F. How two afrotropical endemics made two cosmopolitan human commensals from Africa: the *Drosophila melanogaster*–*D. simulans* riddle. **Genetica**, Dordrecht, v. 120, p. 17-39, 2004.

LAPENTA, A. S.; BICUDO, H. E. M. C.; CERON, C. R. Esterase patterns of species in the *Drosophila buzzatii* cluster. **Cytobios**, Cambridge, n. 84, p. 13-29, 1995.

Le GOFF, G.; BOUNDY, S.; DABORN, P. J.; YEN, J. L., SOFER, L.; LIND, R.; SABOURAULT, C.; MADI-RAVAZZI, L.; FFRENCH-CONSTANT, R. H. Microarray analysis of cytochrome P450 mediated insecticide resistance in *Drosophila*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 33, p. 701-708, 2003.

Le GOFF, G.; HILLIOU, F.; SIEGFRIED, B.; BOUNDY, S.; WAJNBERG, E. Xenobiotic response in *Drosophila melanogaster*: Sex dependence of P450 and GST gene induction. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 36, p. 674-682, 2006.

LEIBOVITCH, B. A.; GLUSHKOVA, I. V.; PASIUKOVA, E. G.; BELIAEVA, E. S.; GYOZDEY, V. A. Comparative analysis of retrotransposon localization and mobility in sibling species *Drosophila simulans* and *Drosophila melanogaster*. **Genetica**, Dordrecht, v. 28, p. 85-97, 1992.

LEMEUNIER, F.; DAVID, J. R.; TSACAS, L.; ASHBURNE, M. The *melanogaster* species group. In: ASHBURNER, M.; CARSON, H. L.; THOMPSON Jr, J. N. (Ed.). **The genetics and biology of drosophila**: evolution and speciation in selected species group. New York: Academic Press, 1986.

LIMA-CATELANI, A. R. A.; CERON, C. R.; BICUDO, H. E. M. C. Variation of genetic expression during development, revealed by esterase patterns in *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). **Biochemical Genetics**, New York, v.42, n. 3/4, p. 69-84, 2004.

LUMJUAN, N.; RAJATILEKA, S.; CHANGSON, D.; WICHEER, J.; LEELAPAT, P.; PRAPANTHADARA, L. A.; SOMBOON, P.; LYCETT, G.; RANSON, H. The role of the *Aedes aegypti* Epsilon glutathione transferases in conferring resistance to DDT and pyrethroid insecticides, **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 41, p. 203–209, 2011.

MATEUS, et al. Molecular weight estimation of esterase isoenzymes in closely related drosophila species (Diptera: Drosophilidae) in non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 5, p. 1083-1089, 2009.

MIEKLE, D. B.; RICHMOND, R. C. Temperature and sex-specific differences in reproduction related to genotypic variation at the esterase 6 locus in *Drosophila melanogaster*. **Amer. Nat.**, v. 138, p. 762-767, 1991.

MIKHAILOV, A. T.; TORRADO, M. Carboxylesterases moonlight in the male reproductive tract: a functional shift pivotal for male fertility. **Reproduction, Fertility and Development**, Collingwood, v. 5, p. 53-62, 2000.

McCARROLL, L.; HEMINGWAY, J. Can insecticide resistance status affect parasite transmission in mosquitoes? **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 32, n. 10, p. 1345-1451, 2002.

McCART, C.; BUCKLING, A.; FFRENCH-CONSTANT, R. H. DDT resistance in flies carries no cost. **Current Biology**, London, v. 9, n. 15, p. 587-589, 2005.

MCKENZIE, J. A.; BATTERHAM, P. The genetics, molecular and phenotypic consequences of selection for insecticide resistance. **Trends Ecology and Evolution**, v. 9, p. 166-169. 1993.

McKENZIE, J. A. **Ecological and evolutionary aspects of insecticide resistance**. Austin: Landes, 1996.

McKENZIE, J. A. Measuring fitness and intergenic interactions: the evolution of resistance to diazinon in *Lucilia cuprina*. **Genetica**, Dordrecht, v. 90, p. 227-237, 1993.

MUTERO, A.; PRALAVORIO, M.; BRIDE, J. M.; FOURNIER, D. Resistance associated with point mutations in insecticide-insensitive acetylcholinesterase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 91, p. 5922-5926, 1994.

NASCIMENTO, A. P.; BICUDO, H. E. M. C. Esterase patterns and phylogenetic relationships of *Drosophila* species in the saltans subgroup (saltans group). **Genetica**, Gravenhage, v. 114, p. 41-51, 2002.

NISHIKAWA, J. I.; IIZUKA, H. Numerical taxonomy of *Monascus* species based on the electrophoretic analysis of intracellular enzymes. **Journal of Basic Microbiology**, Berlin, v. 33, n. 5, p. 331-342, 1993.

NUZDHIN, S. V. The distribution of transposable elements on X chromosomes from a natural population of *D. simulans*. **Genetica**, Dordrecht, v. 66, p. 159-166, 1995.

OAKESHOTT, J. G. et al. Latitudinal relationships of esterase 6 and phosphoglucosmutase gene frequencies in *Drosophila melanogaster*. **Heredity**, v. 47, p. 385-396, 1981.

OAKESHOTT, J. G. et al. Molecular cloning and characterization of esterase 6, a serine hydrolase of *Drosophila*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 84, p. 3359-3363, 1987.

OAKESHOTT, J. G.; COOKE, P. H.; RICHMOND, R.C.; BORTOLI, A.; GAME, A. Y.; LABATE, J. Molecular population genetics of structural variants of esterase 6 in *Drosophila melanogaster*. **Genome**, v. 31, p. 788-797, 1989.

OAKESHOTT, J.G., VAN PAPERRECHT, E.A., BOYCE, T.M., HEALY, M.J., RUSSELL, R.J. Evolutionary genetics of *Drosophila* esterases. **Genetica**, Dordrecht, v. 90, p. 239--268, 1993.

OPPENOORTH, F. J. Biochemistry and physiology of resistance. In: KERKUT, G. A.; GILBERT, L. I. (Ed.). **Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology**. Oxford: Pergamon, v. 12, p. 731-773, 1985.

PARSONS, P.A. The evolutionary biology of colonizing species. **Cambridge University Press**, Massachusetts, 1983.

PEMPLE, S. E.; TAYLOR, J. B. An evolutionary perspective on glutathione transferases inferred from class-theta glutathione transferase cDNA sequences. **The Biochemical Journal**, London, v. 287, p. 957-963, 1992.

PEREZ-LOPES, M.;NOVOA-VALINAS, M. C.; MELGAR-RIOL, M. J. Glutathione S-transferase cytosolic isoforms as biomarkers of polychlorinated biphenyl (Arochlor-1254) experimental contamination in rainbow trout. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 136, p. 97-106, 2002.

PÉTAVY, G.; MORIN, J. P.; MORETEAU, B.; DAVID, J. R. Growth temperature and phenotypic plasticity in two *Drosophila* sibling species: probable adaptive changes in flight capacities. **Journal of Evolutionary Biology**, Basel, v. 10, n. 6, p. 875-887, 1997.

PIMENTEL, D. et al. Conserving biological diversity in agricultural/forestry systems. **BioScience**, Washington, v. 42, n. 5, p. 354-362, 1992.

RANSON, H. et. al. Identification of a novel class of insect glutathione S-transferases involved in resistance to DDT in the malaria vector

Anopheles gambiae. **The Biochemical Journal**, London, v. 359, p. 295–304, 2001.

RICHMOND, R. C.; NIELSEN, K.M.; BRADY, J.P.; SNELLA, E.M. Physiology, biochemistry and molecular biology of the Est-6 locus in *Drosophila melanogaster*. In: Barker JSF, Starmer WT, MacIntyre RJ (eds) Ecological and evolutionary genetics of *Drosophila*. **Plenum Press**, New York, pp 273–292, 1990.

RICHMOND, R. C.; SENIOR, A. Esterase 6 of *Drosophila melanogaster*: Kinetics of transfer to females, decay in females and males recovery. **Journal Insect Physiology**, Oxford, v. 27, p. 849-853, 1991.

ROUAULT, J.; DAVID, J. Evolutionary biology of *Drosophila melanogaster* and *D. simulans* : a behavioral divergence in microhabitat selection. **Acta Oecologica**, Paris, v. 3, n. 3, p. 331–338, 1982.

ROUSH, R. T.; MCKENZIE, J. A. Ecological genetics of insecticide and acaricide resistance. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 32, p. 361-380, 1987.

RUSSELL, R. J.; ROBIN, G. C.; KOSTAKOS, P.; NEWCOMB, R. D.; BOYCE, T. M.; MEDVECZKY, K. M.; OAKESHOTT, J. G. Molecular cloning of an -esterase gene cluster on chromosome 3R of *Drosophila melanogaster*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 26, n. 3, p. 235-247, 1996.

SAAD, M.; GAME, A. Y.; HEALY, M. J.; OAKESHOTT, J. G. Associations of esterase 6 allozyme and activity variation with reproductive fitness in *Drosophila melanogaster*. **Genetica**, Dordrecht, v. 94, p. 43–56, 1994.

SCOTT, D. Inhibition of female *Drosophila melanogaster* remating by a seminal fluid protein (Esterase-6). **Evolution**, Lancaster, v. 40, p. 1084-1091, 1986.

SCOTT, J. G. The molecular genetics of resistance: resistance as response to stress. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 78, p. 399-414, 1995.

SCOTT, J. G.; KASAI, S. Evolutionary plasticity of monooxygenase-mediated resistance. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 78, p. 171-178, 2004.

SCOTT, J. G.; ROUSH, R. T.; LIU, N. Selection of high-level abamectin resistance from field-collected house flies, *Musca domestica*. **Experientia**, Basel, v. 47, n. 3, p. 288-291, 1991.

SHEEHAN, K. B.; RICHMOND, R. C.; COCHRANE, B. J. Studies of esterase-6 in *Drosophila melanogaster*. III. The developmental pattern and tissue distribution. **Insect Biochemistry**, Bristol, v. 9, p. 443-450, 1979.

SHI, H.; PEI, L.; GU, S.; ZHU, S.; WANG, Y.; ZHANG, Y.; LI, B. Glutathione S-transferase (GST) genes in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*, and comparative analysis with five additional insects. **Genomics**, 2012.

SHIMADA, Y.; NAGAO, T.; SUGIHARA, A.; LIZUMI, T.; NAKAMURA, K.; FUKASE, T.; TOMINAGA, Y. Cloning and sequence analysis of an esterase gene from *Pseudomonas* sp. KWI-56. **Biochimica et Biophysica Acta**. Amsterdam, v. 1174, p. 79-82, 1993.

SINGH, R. S.; LONG, A. D. Geographic variation in *Drosophila*: from molecules to morphology and back. **Trends in Ecology & Evolution**, Amsterdam, v. 7, n. 10, p. 340-345, 1992.

SINGH, R.S.; CHOUDHARY, M.; DAVID, J. R. Contrasting patterns of geographic variation in the cosmopolitan sibling species *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans*. **Biochemical Genetics**, New York, v. 25, p. 27-40, 1987.

SOUZA, R.; SCHONS, J.; BRAMER, S. P.; PRESTES, A. M.; SCHEEREN, P. L.; SILVA, M. S.; DELDUCA, L. J. A. Atividade isoenzimática em plantas de trigo infectadas com o vírus SBWMV. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 40, n. 9, p. 845-852, 2005.

STEINER, W. W. M.; JOHNSON, W. C. Techniques for electrophoresis of Hawaiian *Drosophila*. US-IBP. **Island Ecosyst. Tech. Rep** v. 31, p. 1-21, 1973.

VIEIRA, C.; BIÉMONT, C. Selection against transposable elements in *D. simulans* and *D. melanogaster*. **Genetica**, Dordrecht, v. 68, p. 9-15, 1996.

VIEIRA, C.; BIÉMONT, C. Transposable element dynamics in two sibling species: *drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans*. **Genetica**, Dordrecht, v. 120, p. 115-123, 2004.

VRANA, D.; PIKHART, B.; MOHELNIKOVA-DUCHONOVA, I.; HOLCATOVA, R.; STRNAD, A.. The association between glutathione S-

transferase gene polymorphisms and pancreatic cancer in a central European Slavonic population. **Mutat. Res.** v. 680, p. 78–81, 2009.

WALKER, C. H.; MACKNESS, M. I. Esterases: Problems of identification and classification. **Biochemistry Pharmacology**, v. 32, p. 3265-3269, 1983.

WALLACE, B. A survey of wild-type strains of *Drosophila melanogaster* for resistance to malathion and phenylthiocarbamide (PTC). **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, Berlin, v. 24, n. 1, p. 52-58, 1986.

WANG, J. J.; CHENG, W. X.; DING, W.; ZHAO, Z. M. The effect of the insecticide dichloroovos on esterase activity extracted from the psocids, *Liposcelis bostyhopila* and *L. entomophila*. **Journal of Insect Science**, Tucson, v. 4, p. 1-5, 2004.

WILSON, T. G. *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae): a model insect for insecticide resistance studies. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 81, n. 1, p. 22-27, 1988.

WINDELSPECHT, M.; RICHMOND, R. C.; COCHRANE, B. J. Malathion resistance levels in sympatric populations of *Drosophila simulans* and *Drosophila melanogaster* differ by two orders of magnitude. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 88, p. 1138-1143, 1995.

WRIGHT, T. R. F. The genetics of an esterase in *Drosophila melanogaster*. **Genetics**, Baltimore, v. 100, p. 307-314, 1963.

WHITE, M. M.; MANE, S. D.; RICHMOND, R. C. Studies of Esterase 6 in *Drosophila melanogaster*. XVIII. Biochemical Differences between the Slow and Fast Allozymes. **Molecular Biology and Evolution**, New York, v. 5, n. 1, p. 41-62, 1988.

YU, S. J. Insect glutathione S-transferases. **Zoological Studies**, Taipei, v. 35, p. 9-19, 1996.

ZERA, A. J.; HOLTMEIER, C. L. In vivo and in vitro degradation of juvenile hormone-III in presumptive long-winged and short-winged *Gryllus rubens*. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 38, n. 1, p. 61-74, 1992.