

Ana Silvia Lapenta

**Caracterização de Espécies de Drosophila
do Cluster Buzzatii com Base nos
Padrões de Esterases**



ANA SILVIA LAPENTA

**CARACTERIZAÇÃO DE ESPÉCIES DE *Drosophila* DO
"CLUSTER" *buzzatii* COM BASE NOS PADRÕES DE ESTERASES**



848/99

Tese apresentada para obtenção
do Grau de Doutor em Ciências
Biológicas-Genética.

São José do Rio Preto - SP
1998

AGRADECIMENTOS

Ao término deste trabalho quero manifestar minha gratidão a todas as pessoas que colaboraram para a sua concretização, quer ajudando-me diretamente na sua execução, quer ajudando-me indiretamente, incentivando, ou mesmo, tornando os dias mais alegres.

À Profa. Dra. Hermione Elly Melara de Campos Bicudo, pela orientação segura e competente deste trabalho, pela forma carinhosa e atenciosa com que sempre fui tratada e, principalmente, pela confiança em mim depositada.

Ao Prof. Dr. Carlos Roberto Ceron, por ter me acolhido em seu laboratório desde minha graduação, pela transmissão de conhecimento e pela amizade.

Ao Prof. Dr. José Antônio Cordeiro, pela valiosa colaboração na análise estatística, sempre muito atencioso.

Às Professoras Doutoras Eucléia P. B. Contel, Lilian Madi Ravazzi, Maria de Fátima P. S. Machado e Rosana Tidon Sklorz, pela atenção dedicada na análise minuciosa e detalhada deste trabalho e pelas valiosas sugestões. À Profa. Dra. Lilian Madi Ravazzi, quero agradecer também, pela presença amiga e pelos valiosos conselhos em todo esse tempo de pós-graduação.

Ao Prof. Dr. James R. Coleman, pela imediata revisão do Summary.

Aos Professores do Departamento de Biologia deste Instituto, pela transmissão de conhecimento e pelo acolhimento, em especial aos professores doutores Sebastião R. Taboga e Mary M. Itoyama pela amizade e ajuda sempre que solicitados.

Aos Professores do Departamento de Biologia Celular e Genética da UEM, pelo incentivo e apoio, em especial, pelo convívio mais próximo, aos professores Erasmo Renesto, Hélio Conte, Walter A. Della Rosa, Sandra A. Collet, Satiko Nanya, Verônica E. Pimentel e Yoko Terada.

Aos Colegas do Curso de Pós-Graduação deste Instituto, pela convivência agradável e pelas proveitosas trocas de idéias. Em especial a Alba R. de A. Lima Catelani, Fádua R. Coelho Rits, Ana Maria, Rogério P. Mateus, Luciana Machado, Maristela S. Bertasso, Lilian Castiglione, Marcelo F. Lourenço e Sheila A. Vayego.

Aos Funcionários dos Departamentos de Biologia e de Química e Geociências, Bernadete D. Trevisan, Eliani N. I. Ohira, João R. dos Santos, Josué R. dos Santos, Laura N. Pinheiros, Neusa H. Murae, Olga B. Pelicer, Paulo A. Maziero, Rosana S. de Souza, Sebastião D. Barbosa e Simone C. Fernandes, pela colaboração e amizade.

Aos funcionários da Bibliotecas, pela dedicação e paciência.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, pela atenção e constante disponibilidade.

Ao colega de laboratório Rubens T. Honda, pela ajuda nos experimentos sempre que solicitado.

Aos meus colegas, Cláudio e Eloisa, pela amizade. À Eloisa agradeço também a ajuda na confecção da tese.

Aos meus amigos Cláudia, Chopes, Jaqueline, Luciana, Patrícia, Raquel, Ray, Regina, Rita, Rosana e Tio Carlinho, pelos momentos de descontração e alegria que compartilhamos.

Aos meus familiares, tios, tias e primos, pelo incentivo e carinho.

Aos meus pais José e Anadéya, que não pouparam sacrifícios para que tudo desse certo nesse caminho que escolhi, sempre com muita preocupação, muita oração, muito carinho e principalmente com muito amor.

Aos meus irmãos Ana Elisa, Ana Rita, Ana Maria e Angelo Vitor e aos meus cunhados Oswaldo e Laerte, pela constante preocupação em me ajudar, por todo carinho e amor que nos une.

Aos meus queridos e amados sobrinhos Henrique, Ana Heloisa, Ana Beatriz, Carolina, Matheus, Luís Paulo e Bruno, que tornaram meu mundo infinitamente mais bonito e alegre.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa e à **FUNDUNESP,** pelo apoio financeiro.

Termino agradecendo a **Deus** pelo privilégio de ter tido ótimos professores, ótima família e grandes amigos e peço sua luz e benção para que eu consiga retribuir pelo menos parte de tantas graças recebidas.

Muito obrigada .



Orientadora: Prof^a. Dr^a. Hermione Elly Melara de Campos Bicudo



Este trabalho foi realizado nos Departamentos de Química e Geociências e de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, da Universidade Estadual "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP, com auxílios da CAPES e FUNDUNESP.



***Para tudo há um tempo, para cada coisa há um momento
debaixo dos céus:***

*Tempo para nascer, e tempo para morrer;
Tempo para plantar, e tempo para arrancar o que foi plantado;
Tempo para matar, e tempo para sarar;
Tempo para demolir, e tempo para construir;
Tempo para chorar, e tempo para rir;
Tempo para gemer, e tempo para dançar;
Tempo para atirar pedras, e tempo para ajuntá-las;
Tempo para dar abraços, e tempo para apartar-se;
Tempo para procurar, e tempo para perder;
Tempo para guardar, e tempo para jogar fora
Tempo para rasgar, e tempo para costurar;
Tempo para calar, e tempo para falar;
Tempo para amar, e tempo para odiar;
Tempo para guerra, e tempo para a paz.*

Eclesiaste 3, 1- 8.

DEDICO AOS MEUS PAIS:

José e Anadéya



ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO.....	1
II. MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
II.1. As linhagens.....	16
II.2. Manutenção em laboratório	16
II.3. Obtenção de moscas para análise intralinhagem.....	16
II.4. Obtenção dos híbridos.....	16
II.5. Retrocruzamentos para testes de expressão gênica.....	18
II.6. Preparo dos géis.....	18
II.7. Preparo das amostras e condições de eletroforese.....	19
II.8. Identificação das esterases e avaliação da especificidade ao substrato.....	19
II.9. Tratamento com inibidores para caracterização bioquímica das esterases.....	20
II.10. Localização das esterases em diferentes partes do corpo.....	20
II.11. Secagem dos géis.....	20
II.12. Análise estatística.....	20
II.12. 1. Índice de similaridade (IS).....	20
II.12.2. Análise de dependência (ANADEP).....	20
II.12.3. Análise de "cluster"	21
III. RESULTADOS.....	22
III.1. Padrões esterásicos.....	22
III.2. Complementação de dados sobre as linhagens anteriormente analisadas	35
III.3. Utilização de inibidores da atividade enzimática.....	35
III.4. Presença das esterases na cabeça, no tórax e no abdome das moscas.....	37
III.5. Aspectos genéticos das bandas esterásicas.....	45

III.6. Padrões esterásicos dos híbridos.....	51
III.7. Análise da isoenzima EST-11.....	56
III.8. Análise de similaridade interlinhagens.....	67
IV. DISCUSSÃO.....	74
V. RESUMO E CONCLUSÕES.....	89
VI. SUMMARY AND CONCLUSIONS.....	91
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	93

I. INTRODUÇÃO

O termo esterase engloba um conjunto de enzimas geneticamente distintas que podem desempenhar funções diversificadas em um organismo e possuem, em comum, a propriedade de catalisar a hidrólise de ésteres. O conhecimento da especificidade ao substrato, *in vivo*, é bastante restrito, mas uma ampla variedade de substratos são hidrolisados *in vitro*, propriedade que dificulta a classificação dessas enzimas. A classificação mais amplamente aceita é baseada na sua sensibilidade a três grupos de inibidores da atividade enzimática (Holmes & Master, 1967 *apud* Oakeshott *et al.*, 1993), incluindo os reagentes sulfidrílicos (como exemplo o para-cloromercuriobenzoato - pCMB), os organofosforados (exemplo: malathion) e carbamatos (como exemplo o sulfato de eserina). Com base nesse critério, quatro classes de esterases são diferenciadas:

.acetilesterases (EC 3.1.1.6) - não são afetadas pelos inibidores e geralmente têm maior afinidade por substratos alifáticos, envolvendo derivados do ácido acético.

.arilesterases (EC 3.1.1.2) - são inibidas somente por reagentes sulfidrílicos e atuam preferencialmente sobre substratos aromáticos.

.carboxilesterases (EC 3.1.1.1) - são inibidas somente por organofosforados e sua maior afinidade é por ésteres alifáticos, geralmente ácidos de cadeias longas.

.colinesterases - são inibidas por organofosforados e carbamatos e atuam preferencialmente sobre substratos como ésteres de colina a outros ésteres alifáticos e aromáticos. Podem ser separadas em acetilcolinesterases (EC 3.1.1.7) e pseudocolinesterases (EC 3.1.1.8).

Os organismos multicelulares utilizam um amplo conjunto de enzimas para desempenhar as mais diversas funções bioquímicas, enzimas estas produzidas por meio da evolução de famílias de multigenes. É suposto que a evolução dessas famílias tenha ocorrido por meio da duplicação gênica e posterior divergência do gene duplicado, adotando novas funções. As esterases compreendem um sistema isoenzimático que exemplifica esse processo. Há uma significativa similaridade entre as carboxilesterases e colinesterases de eucariotos já sequenciadas, que podem ser agrupadas em uma família multigênica

denominada carboxil/colinesterase. Essa família engloba todas as esterases de *Drosophila* sequenciadas até o momento. A família carboxil/colinesterase pode ser incluída dentro de uma superfamília chamada α/β hidrolases. Esta inclui também as lipases e algumas arilesterases de bactérias, que apresentam algumas semelhanças na estrutura terciária e na sequência de aminoácidos (revisão em Oakeshott *et al.*, 1993) e parecem apresentar um ancestral comum. Algumas acetilesterases também foram identificadas em *Drosophila*, mas estas não foram sequenciadas e não é conhecido se elas podem ser incluídas dentro da família multigênica das carboxil/colinesterases (Russel *et al.*, 1996).

Em *Drosophila*, dois grupos de esterases podem ser distinguidos com base no substrato hidrolisado *in vitro*, o grupo das α esterases e o grupo das β esterases, que hidrolisam preferencialmente substratos como α -naftil e β -naftil acetato (ou butirato e propionato), respectivamente. O grupo das α -esterases inclui carboxilesterases, colinesterases e acetilesterases. O grupo das β -esterases incluía somente carboxilesterases; entretanto, recentemente, Mateus (1997) detectou a presença de acetilesterases características da fase larval em espécies do complexo *mulleri*. Os genes para β -esterases parecem ter se diferenciado rapidamente entre os grupos de *Drosophila*, uma vez que evidências sugerem que o número, a organização e a expressão desses genes podem variar entre esses grupos. As α e β -esterases têm sido caracterizadas genética e bioquimicamente em várias espécies, como em *Drosophila melanogaster* (Wright, 1963; Healy *et al.*, 1991), *D. pseudoobscura* (Narise & Hubby, 1966), *D. virilis* (Narise, 1973), *D. mojavensis* (Pen *et al.*, 1984), *D. mulleri* (Ceron, 1988), *D. arizonae* (Ceron, 1988), *D. dunni* (Carrasco *et al.*, 1984), *D. serido*, *D. seriema*, *D. koepferae* (Lapenta 1992; Lapenta *et al.*, 1995) e *D. buzzatii* (East, 1982; East *et al.*, 1990; Lapenta 1992; Lapenta *et al.*, 1995).

O grupo das α -esterases tem sido estudado em uma série de espécies de *Drosophila*. Uma das α -esterases melhor caracterizadas é a acetilcolinesterase (AChE). Em *Drosophila*, estudos moleculares têm demonstrado que a AChE é específica do sistema nervoso central e é codificada por um único loco gênico, Ace. Em *D. melanogaster*, Ace foi localizado na posição 87E3 do cromossomo III R. O RNAm correspondente a esse gene é de 4,3 kb, sendo que a

proteína precursora é processada em uma enzima dimérica e glicosilada que irá se ligar à membrana via uma âncora lipídica (Hall & Kankel, 1976 e Hall & Spierer, 1986 *apud* Fournier *et al.*, 1993).

Os genes das α -esterases apresentam uma organização em "cluster". Em *D. melanogaster*, genes de 11 α -esterases, incluindo um possível pseudogene dentro de um intron, foram mapeados na posição 84D3-5 no cromossomo III R, formando um "cluster" (Russel *et al.*, 1996). As esterases deste "cluster" têm divergido substancialmente uma das outras, cerca de 37 a 66% na seqüência de aminoácidos, que é a variação correspondente à observada entre enzimas da família das carboxil/colinesterases. Contudo, têm mantido preservadas, regiões importantes que caracterizam a família, como algumas pontes salinas e pontes de cisteínas, fato que sugere que as enzimas correspondentes a esses genes sejam ativas. Uma análise filogenética sugeriu que esse "cluster" deve ter surgido por três eventos de duplicação (Robin *et al.*, 1996). Nesse "cluster" estão incluídos os genes Est-23, Mce, Ali e Est-9. A EST-23 é uma carboxilesterase, que mostra uma grande homologia com E-3 da mosca *Lucilia cuprina* envolvida na resistência aos inseticidas, nesta espécie. A MCE também é uma carboxilesterase que hidrolisa organofosforados, como o malathion, *in vitro*, mas sua função *in vivo* é desconhecida. A ALI não foi relacionada a uma esterase específica e sua função *in vivo* também é desconhecida (Spackman *et al.*, 1994). Já a EST-9, equivalente à EST-C de *D. melanogaster* (Beckman & Johnson, 1964), é uma colinesterase e é predominantemente encontrada no intestino (Healy *et al.*, 1991).

Esterases específicas de machos que hidrolisam o α -naftil acetato foram observadas somente em espécies do grupo *repleta*. *Drosophila mulleri* e *D. arizonae* apresentam duas dessas esterases, EST-10 e EST-12 (Ceron, 1988). No "cluster" *D. buzzatii*, as espécies *D. serido*, *D. seriema* e *D. koepferae*, foram identificadas cinco bandas para α -esterases específicas de machos que foram atribuídas a três locos gênicos distintos (Lapenta *et al.*, 1995).

A análise das α -esterases em *D. borealis*, *D. flavomontana* e *D. montana* mostrou a presença de um, dois e quatro locos organizados em "tandem", respectivamente. Baseado na hipótese de que esses quatro locos gênicos em *D. montana* originaram-se por dois eventos de duplicação, esse estudo evidenciou

que *D. borealis* e *D. flavomontana* não derivam de *D. montana*, como indicado por outros estudos (Baker, 1980).

O grupo das β -esterases tem sido intensivamente estudado no gênero *Drosophila*, desde a estrutura e função das enzimas até a estrutura, organização e regulação de seus genes. 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 à fase larval, como EST-6 (todo o ciclo) e EST-P (larval) de *D. melanogaster* (Wright, 1963; Dumancic *et al.*, 1997), EST-1 (todo o ciclo) e EST-J (larval) em *D. buzzatii* (East, 1982) e EST-8 (todo o ciclo) e EST-L (larval) de *D. mojavensis*, *D. arizonae*, *D. wheeleri*, *D. navojoa*, *D. aldrichi* (Ceron, 1988; Mateus, 1997). As esterases correspondentes, em *D. mojavensis* e *D. arizonae*, são denominadas EST-4 (larval) e EST-5 (todo o ciclo) (Zouros *et al.*, 1982) e, em *D. aldrichi*, são denominadas EST-D (todo o ciclo) e EST-G (larval) (Kambysellis *et al.*, 1968, Johnson & Bealle, 1968). *Drosophila pseudoobscura* apresenta somente uma β -esterase, presente em larvas e adultos, denominada EST-5; entretanto, um gene homólogo ao gene da esterase larval (Est-P) de *D. melanogaster*, foi mapeado adjacente ao gene para EST-5, mas seu produto ainda não foi encontrado (Brady *et al.*, 1990). Algumas espécies apresentam também β -esterases específicas de machos no bulbo ejacatório, como a EST-S de *D. virilis* (Korochkin *et al.*, 1976 *apud* Oakeshott *et al.*, 1995) e EST-F de *D. aldrichi* (Kambysellis *et al.*, 1968).

As β -esterases são representadas principalmente pelas carboxilesterases. Uma comparação entre as β -carboxilesterases EST-5 de *D. pseudoobscura* e EST-6 de *D. melanogaster*, cujas seqüências de aminoácidos estão identificadas (para *D. melanogaster*, Oakeshott *et al.*, 1987; Collet *et al.*, 1990 e para *D. pseudoobscura*, Brady *et al.*, 1990) mostrou grande semelhança estrutural entre ambas, apesar de haver uma considerável troca de aminoácidos. Brady *et al.* (1990) localizaram uma divergência de 138 aminoácidos entre EST-5 e EST-6. Grande parte dessas diferenças são fisicoquimicamente não conservativas, alterando o tamanho e a carga elétrica (39%) ou alterando sua hidrofobicidade (33%). Os sítios ativos de EST-6 e EST-5 apresentam diferenças, mas muitos resíduos aromáticos idênticos estão presentes. Essa similaridade pode explicar a

utilização do mesmo substrato por essas enzimas. Também foram encontradas diferenças quanto aos sítios de glicosilação da molécula.

Uma análise comparativa da estrutura da EST-6, entre *D. melanogaster* e as espécies crípticas *D. simulans* e *D. mauritiana*, revelou que existem mais diferenças no nível de atividade do que mudanças na distribuição tecidual ou temporal dessa enzima (Morton & Singh, 1985; Karotan *et al.*, 1993). As diferenças entre as EST-6 dessas espécies são menores quando comparadas com as diferenças existentes entre a EST-5 de *D. pseudoobscura* e a EST-6 de *D. melanogaster*. Cerca de 30 aminoácidos são diferentes entre as enzimas de *D. melanogaster*, *D. simulans* e *D. mauritiana* e, em termos físico-químicos, essas mudanças são menos radicais. Regiões que variam entre as enzimas dessas três espécies são os elementos de ligação da enzima ao substrato, a folha β principal, as α -hélices e as regiões às quais não estão relacionadas estruturas específicas. Essas diferenças podem ter pouco impacto na função dessas enzimas; entretanto, algumas diferenças no sítio de ligação ao substrato podem afetar a especificidade ao mesmo. O polipeptídeo sinal é também dois resíduos mais curto em *D. simulans* e *D. mauritiana* do que em *D. melanogaster* que apresenta 12 resíduos. Essa diferença pode afetar a secreção de EST-6, embora ambas as formas sejam funcionais. Três sítios de glicosilação na enzima são compartilhados, sendo que somente um sítio de glicosilação encontrado em *D. melanogaster* não ocorre nas enzimas das outras duas espécies. A diferença quanto a esse sítio (resíduo 487) pode afetar a estabilidade da enzima *in vivo*. *Drosophila melanogaster* é polimórfica para essa característica (Myers *et al.*, 1993). Myers *et al.* (1996) estudaram as alterações bioquímicas e fisiológicas que a deleção desses sítios de glicosilação provoca na EST-6 de *D. melanogaster* e foi verificado que a termoestabilidade da enzima é afetada.

A genética clássica e o avanço das técnicas moleculares permitiram a localização cromossômica de genes onde estão codificadas as β -carboxilesterases. Esses genes estão organizados em "clusters", assim como os genes de outras esterases em *Drosophila* e mesmo em outros organismos. Em espécies de *Drosophila*, o grupo das β -carboxilesterases inclui dois ou três genes ligados, organizados em "clusters" (Oakeshott *et al.*, 1993), os quais têm a mesma

direção de transcrição e estrutura exon/intron (Yenikolopov *et al.*, 1983 e 1989 *apud* Brady *et al.*, 1990; Collet *et al.*, 1990; East *et al.*, 1990). Em *D. melanogaster*, são encontrados dois genes (Est-6 e Est-P) que estão localizados na subseção 69 A1 - A3 no braço esquerdo do cromossomo III (Collet *et al.*, 1990), com a mesma orientação 5' → 3'. O gene Est-P está abaixo de Est-6 (Procunier *et al.*, 1991). Ambos os genes compreendem dois exons separados por um curto intron de 51 e 56 pb em Est-6 e Est-P, respectivamente. A distância entre Est-6 e Est-P é de 197 pb (Collet *et al.*, 1990). Na espécie *D. pseudoobscura* são encontrados três genes, Est-5A, Est-5B e Est-5C, estreitamente ligados, localizados no cromossomo X. A distância entre Est-5A e Est-5B é de aproximadamente 1700 pb (Brady *et al.*, 1990).

Há uma grande semelhança entre os genes para as β -esterases de espécies de *Drosophila* (Oakeshott *et al.*, 1993). Na maior parte das vezes, estes genes estão estreitamente ligados e orientados na mesma direção. Assim, admite-se que tenham surgido por duplicação. Um modelo de duplicação foi proposto por Brady *et al.* (1990) e Brady & Richmond (1992) em *D. pseudoobscura* e *D. melanogaster*. Nesse modelo, uma primeira duplicação, no loco, teria ocorrido antes da divergência entre *D. pseudoobscura* e *D. melanogaster*, provavelmente entre 20 e 40 milhões de anos atrás. Essa duplicação teria originado os genes Est-5A e Est-5B em *D. pseudoobscura* e Est-P e Est-6 em *D. melanogaster*, esterase larval e de todo o ciclo, respectivamente em cada espécie. Já Est-5C teria se originado por meio de uma duplicação mais recente de Est-5B em *D. pseudoobscura*. Segundo Brady & Richmond (1992), a duplicação que originou Est-5A e 5B, em *D. pseudoobscura*, e Est-P e Est-6, em *D. melanogaster*, deve ser a mesma que originou os genes para esterase larval e de todo o ciclo, nos outros grupos de espécies de *Drosophila*. Seria improvável que essas duplicações tivessem ocorrido independentemente uma da outra e, portanto, esses dois genes deveriam estar presentes em uma espécie de *Drosophila* ancestral, comum à maioria, senão a todas as espécies com genes duplicados.

Os padrões temporais de atividade das β -esterases têm sido determinados para várias espécies de *Drosophila*. Entretanto, sua distribuição nos vários tecidos é geralmente conhecida somente em adultos. Os principais sítios de

atividade dessas enzimas, no adulto, são a hemolinfa e o aparelho reprodutivo dos machos. A atividade na hemolinfa foi detectada em todas as espécies estudadas do subgêneros *Sophophora* e *Drosophila*, sugerindo ser um sítio de atividade ancestral. Em contraste, a atividade no aparelho reprodutor dos machos é variável, diferindo entre os subgêneros. Há uma atividade relativamente alta no bulbo ejaculatório em muitas espécies do subgênero *Drosophila*, sendo menos freqüente em *Sophophora*. Entretanto, atividade no ducto ejaculatório só ocorre em espécies de *Sophophora* (Healy *et al.*, 1996). Foram observados outros sítios de atividade, como por exemplo, a EST-5 de *D. pseudoobscura*, encontrada em grande quantidade no olho (Lunday & Farmer, 1983; Morton & Singh, 1985).

Dessa forma, pode-se verificar que há grande variabilidade na expressão das β -esterases, ou seja, em diferentes espécies, essas enzimas estão presentes em diferentes tecidos. Além dessa variação tecidual, uma variação temporal é bastante evidente. Esses diferentes padrões de expressão certamente estão sob o comando de seqüências reguladoras e grande parte da atenção neste momento está voltada para elucidar esses mecanismos de regulação gênica.

Os mecanismos de regulação gênica têm sido bastante estudados no complexo *melanogaster*. *Drosophila melanogaster*, *D. simulans* e *D. mauritiana* apresentam a EST-6 com estrutura química bastante semelhante. A estrutura global do gene Est-6 e da região promotora é conservada nessas três espécies. Duas regiões maiores e bem conservadas parecem ser responsáveis pelo nível basal de EST-6, enquanto numerosas substituições nucleotídicas e pequenas inserções e deleções presentes nos próximos 700 pb, à montante, devem proporcionar as divergências reguladoras (Karotan *et al.*, 1993). As duas principais diferenças na expressão, entre essas espécies, são a baixa atividade em fêmeas recém-eclodidas de *D. melanogaster* e a alta atividade em *D. simulans* e *D. mauritiana*. Karotan & Oakeshott (1993), utilizando a técnica da transferência do gene Est-6 de *D. simulans* mais 1,2 kb na extremidade 5' e mais 0,2 kb na extremidade 3', para células da linhagem germinativa de *D. melanogaster*, verificaram que a atividade de Est-6, em fêmeas recém-eclodidas, assemelha-se mais à atividade da espécie doadora (neste caso *D. simulans*), sugerindo que diferenças nesse aspecto da expressão são devidas a fatores de ação *cis*. Por

outro lado, a atividade aumentada de EST-6 em adultos de cinco dias, característica de *D. simulans*, não ocorre, assemelhando-se, assim, à da espécie hospedeira (neste caso *D. melanogaster*), sugerindo que diferenças entre *D. melanogaster* e *D. simulans*, nesse aspecto da expressão, são devidas a fatores de ação *trans*.

Evidências para um controle de ação *cis* na expressão das β -carboxilesterases foram obtidas através da transformação de células da linhagem germinativa de *D. melanogaster* com o gene Est-5B de *D. pseudoobscura*. A expressão de Est-5B no adulto transgênico, ocorreu no olho e na hemolinfa, como em *D. pseudoobscura*, e não no ducto ejaculatório como ocorre em *D. melanogaster*. As seqüências similares entre as regiões promotoras de Est-6 e Est-5B estão confinadas aos primeiros 174 pb, na extremidade 5' do gene (Brady *et al.*, 1990).

A localização das regiões reguladoras de Est-6 de *D. melanogaster* foi obtida por Ludwig *et al.* (1993). Eles "construíram" genes Est-6 com diferentes deleções na região promotora e ligaram-nos com genes da β -galactosidase, retornaram esse segmento construído para a mosca, através da transformação de células da linhagem germinativa mediada pelo elemento P. Quatro regiões reguladoras independentes dirigiram a expressão de Lac Z no (I) ducto ejaculatório, (II) glândulas salivares, (III) sistema respiratório, antenas e palpos maxilares e (IV) bulbos ejaculatórios.

Healy *et al.* (1996) realizaram um estudo mais detalhado sobre regiões que regulam a atividade de Est-6 nos vários tipos de tecidos de *D. melanogaster*. A técnica utilizada foi a transformação mediada por elemento P, com segmentos gênicos construídos que continham diferentes deleções ou substituições na extremidade 5' ou 3' do DNA. Embora a região que controla a atividade gênica na hemolinfa esteja a -171 e -25 pb em relação ao início do sítio de iniciação da tradução, quatro outras regiões mais distais modulam a expressão de Est-6 na hemolinfa. Três na extremidade 5' e uma na extremidade 3', das quais duas com efeito positivo e duas com efeito negativo. A atividade no bulbo ejaculatório (que é um sítio ancestral de atividade) é conferida por uma seqüência entre -273 e -172 pb, enquanto que a atividade de Est-6 no ducto ejaculatório (sítio

de atividade mais recente e restrito ao subgrupo *melanogaster*) é conferida por uma região entre -844 e -614 pb. Outras regiões, mais distais, controlam quantitativamente a expressão gênica no aparelho reprodutivo dos machos. Portanto, esses dados sugerem que a atividade de Est-6 é regulada principalmente por seqüências próximas ao gene, enquanto que seqüências mais distais regulam sítios de expressão mais recentemente adquiridos.

Algumas das funções das esterases, nos insetos, estão bem esclarecidas. Entretanto, ainda não se conhece a função da grande maioria dessas enzimas.

Vários trabalhos têm demonstrado que determinadas esterases desempenham um importante papel no controle dos níveis de hormônio juvenil (HJ). Os níveis do HJ, nos insetos, são regulados, principalmente, pela existência de dois sistemas dinâmicos que controlam sua biossíntese e degradação. A degradação do HJ é obtida, basicamente, por dois caminhos: pela hidrólise de seu grupo metil-éster ou do seu grupo epóxido, realizados, respectivamente, pela esterase do hormônio juvenil (EHJ) e pela epóxido hidrolase do hormônio juvenil (EHHJ).

O HJ sintetizado pela corpora allata, a partir de unidades de acetilcoenzima A, tem importante papel na regulação do desenvolvimento do inseto, tanto nos estádios larvais quanto na fase adulta. Esse hormônio controla o processo de metamorfose, principalmente na transição larva-pupa (Coundron *et al.*, 1981). No adulto, o HJ está envolvido em vários outros processos como a regulação da produção de ovos (Bownes, 1989) e desenvolvimento de órgãos gonadotróficos, em ambos os sexos (Yamamoto *et al.*, 1988).

Conforme revisado por Rits (1997), há duas classes de esterases capazes de hidrolisar o HJ. Uma delas, constituída pelas carboxilesterases inespecíficas, presentes na hemolinfa e tecidos de larvas e adultos, apresenta baixa afinidade pelas moléculas do hormônio ligado às proteínas, mas é capaz de hidrolisá-lo, em solução. Essas enzimas são inativadas pelo diisopropilfluorofosfato (DFP). A segunda classe é composta pelas esterases específicas para o hormônio juvenil, que aparecem na hemolinfa, no último estágio larval, e são capazes de hidrolisar o HJ livre ou conjugado a proteínas. Estas enzimas não apresentam



atividade frente ao naftil acetato, são insensíveis ao DFP e inibidas pelo Triton X-100, um detergente não iônico.

Campbell *et al.* (1992) demonstraram a existência das enzimas EHJ e EHHJ em *D. melanogaster* e verificaram que a atividade hidrolítica, nessa espécie, está inversamente correlacionada aos títulos de HJ. Os picos de EHJ ocorrem nos períodos de pré-pupa inicial e final. Em um estudo recente, Khlebodarova *et al.* (1996) evidenciaram que, em *D. virilis*, as mudanças na titulação de HJ durante o desenvolvimento pupa-adulto são principalmente devidas à atividade de EHJ. Em *D. melanogaster*, essas mudanças no desenvolvimento, relacionadas às mudanças de HJ, são devidas, basicamente, à atividade hidrolítica de EHHJ.

Alguns trabalhos, em insetos, têm demonstrado que a queda na titulação do HJ em fêmeas adultas é necessária para o término da maturação dos ovos e oviposição. Este aspecto pode ser observado em insetos cuja oviposição é cíclica, como em *Aedes aegypti* (Shapiro *et al.*, 1986). Nessa espécie, a oviposição está associada a um aumento na atividade de EHJ e à correspondente diminuição de HJ. Já em *Drosophila*, a maturação dos ovos e oviposição são contínuas. Desta forma, em um mesmo indivíduo existem óvulos imaturos e também óvulos em final de maturação. Entretanto, um suporte para a hipótese de que a EHJ esteja relacionada com a oviposição foi obtido por Khlebodarova *et al.* (1996), estudando as linhagens 101 e 147 de *D. virilis*. Nas duas linhagens, o início da oviposição de ovos fertilizados ocorreu no primeiro dia após o nível máximo para EHJ, isto é, dois dias após a emergência para a linhagem 101 e sete dias para a linhagem 147.

O uso abusivo de inseticidas organofosforados tem causado, em *Drosophila*, assim como em outros insetos, o desenvolvimento de resistência a esses compostos. Mecanismos de resistência metabólica, mediados por esterases, têm evoluído em muitas espécies de insetos. Uma das esterases envolvidas nesse processo é a acetilcolinesterase. Essa enzima atua nos terminais do impulso nervoso, catalisando a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina. No sistema nervoso do inseto, a acetilcolinesterase é uma enzima chave, uma vez que o sistema colinérgico é essencial para esses organismos. Os organofosforados e carbamatos ligam-se covalentemente ao sítio ativo dessa enzima (Aldrige, 1953), causando a morte do inseto.

Uma linhagem de *D. melanogaster*, denominada MH19 foi selecionada para resistência aos inseticidas (Singh & Morton, 1981 *apud* Fournier *et al.*, 1992). A acetilcolinesterase desta linhagem apresentou alterações cinéticas ($V_{\max}$ e K_M). Fournier *et al.* (1992) verificaram que a resistência a inseticidas, dessa linhagem, é devida a uma mutação em ponto, na qual ocorreu uma substituição de uma timina por uma adenina, resultando na troca de uma fenilalanina da proteína tipo "selvagem" por uma tirosina na proteína da linhagem MH19. Esse aminoácido está localizado no sítio onde a enzima interage, diretamente, com o grupo acetil do substrato acetilcolina. Além dessa alteração, outras variações dessa enzima foram observadas em outras linhagens resistentes. Fournier *et al.* (1993) identificaram mais três alterações: Phe¹¹⁵ para Ser, Ile¹⁹⁹ para Val, e Gly³⁰³ para Ala. Cada uma destas mutações leva a diferentes padrões de resistência e a combinação entre essas mutações, por meio de recombinação intracistrônica, leva a enzimas que conferem resistência. Além dessas variações qualitativas na enzima, a resistência aos organofosforados pode ser alcançada por alterações quantitativas, uma vez que moscas que apresentaram uma superprodução de AchE foram mais resistentes que as moscas selvagens (Fournier *et al.*, 1993).

Outras esterases, além das AchE, parecem desempenhar um papel na resistência aos organofosforados. A EST-23, identificada em *D. melanogaster*, compartilha semelhanças de mobilidade eletroforética, propriedades bioquímicas e localização fisiológica com a E-3, envolvida na resistência aos organofosforados em *Lucilia cuprina*. Assim como E-3, a EST-23 é uma α -esterase ligada à membrana e, uma vez que ela é altamente sensível à inibição pelo paraoxon e insensível a eserina, ela pode ser classificada como uma carboxilesterase. Em *L. cuprina* a resistência aos organofosforados é sempre associada com o aparecimento da banda referente a E-3 em gel de eletroforese (Russel, 1990 *apud* Spackman *et al.*, 1994)

Algumas esterases parecem estar envolvidas com processos reprodutivos, nos insetos. A β -carboxilesterase EST-6 de *D. melanogaster* e de outras espécies relacionadas, como *D. simulans* e *D. mauritiana*, é um exemplo bem estabelecido, desse envolvimento. Nestas espécies, o maior pico de expressão ocorre no ducto espermático de adultos. A EST-6 é um componente do

fluido seminal de machos adultos, capaz de hidrolisar o cis-vacênil acetato (um éster lipídico sintetizado somente pelos machos) em cis-vacênol (Mane *et al.*, 1983). A EST-6 proveniente do macho é transferida para a fêmea durante os três primeiros minutos de cópula, sendo que o macho leva de 24 a 48 horas para recuperar o nível de EST-6 (Richmond & Senior, 1981). Na fêmea, essa enzima proveniente do macho é transferida para a hemolinfa onde permanece até quatro dias (Meikle & Richmond, 1990). A reação para produção de cis-vacênol ocorre no aparelho reprodutivo das fêmeas e completa-se seis horas após a cópula (Mane *et al.*, 1983). Recentemente, Myers *et al.* (1996) demonstraram que a glicosilação de EST-6 é muito importante para manter ativa, na hemolinfa da fêmea, a enzima proveniente do macho.

A EST-6, transferida para as fêmeas durante a cópula, parece promover um grande decréscimo na atratividade das fêmeas, dentro de seis horas após o cruzamento (Mane *et al.*, 1983). Esse fato sugere um aumento no valor adaptativo do macho, uma vez que um outro cruzamento desta fêmea poderia levar à perda de 40 a 90% do esperma do primeiro macho (Gromko *et al.*, 1984 apud Scott, 1986). Mane *et al.* (1983) demonstraram que tanto o cis-vacênol, como o cis-vacênil acetato, diminuem o número de cruzamentos entre casais com fêmeas virgens, quando estas são tratadas topicamente. Portanto, o éster ou o álcool são considerados como anti-afrodisíacos, promovendo menores freqüências de corte em fêmeas inseminadas, reduzindo assim a probabilidade de novos cruzamentos.

O papel das esterases restantes, ainda é especulativo. É provável que algumas possuam função nos processos digestivos. As esterases 9 e 10 de *D. melanogaster*, classificadas como colinesterases não específicas (pseudocolinesterases), possuem grande similaridade com as pseudocolinesterases de vertebrados, apresentando características estruturais conservadas. Devido a essa similaridade, foi sugerido que a EST-9 e a EST-10 exercem sua função de pseudocolinesterase nos tecidos digestivos (Healy *et al.*, 1991).

O "cluster" *buzzatii* juntamente com os "clusters" *martensis* e *stalker* compõem o complexo *buzzatii*, pertencentes ao subgrupo *mulleri*. O

subgrupo *mulleri* é um dos subgrupos que compõem o grupo *repleta* (Ruiz & Wasserman, 1993). Atualmente cinco espécies fazem parte do “cluster” *buzzatii*: *Drosophila buzzatii*, *D. serido*, *D. borborema*, *D. koepferae* e *D. seriema*. Com exceção de *D. buzzatii*, que se dispersou por outros continentes, como Austrália e Europa, esse “cluster” é endêmico da América do Sul, ocorrendo no Brasil, Argentina e Bolívia.

As espécies desse “cluster”, assim como as demais espécies do subgrupo *mulleri*, utilizam cladódios de cacto em decomposição como alimento e local de oviposição (Pereira *et al.*, 1983). As exigências ecológicas dos cactos, como tipo de solo e umidade têm permitido deduzir sua distribuição no passado e conhecê-la nas condições atuais. Durante as glaciações do período quaternário, sucessivas mudanças climáticas ocasionaram retrações e expansões das regiões secas (Ab'Saber, 1977 e Bigarella & Andrade-lima, 1982 *apud* Tidon-Sklorz, 1992). Essas retrações e expansões das regiões secas afetaram diretamente a presença das cactáceas e, conseqüentemente, toda a história evolutiva do “cluster” *D. buzzatii* (Sene *et al.*, 1982 e 1988; Ruiz *et al.*, 1982).

Linhagens pertencentes às espécies desse “cluster” têm sido estudadas sob vários aspectos, como isolamento reprodutivo (Bizzo 1983; Moraes, 1991 e Madi-Ravazzi *et al.*, 1997), fertilidade, ou seja, porcentagem de cruzamentos férteis (Madi-Ravazzi *et al.*, 1997), padrões de esterases (Lapenta *et al.*, 1995), inversões cromossômicas em cromossomos politênicos (Tosi & Sene, 1989; Kuhn *et al.*, 1996), cariótipo (Baimai *et al.*, 1983; Kuhn *et al.*, 1996), morfologia do edeago (Silva & Sene, 1991; Tidon-Skorz, 1992 e 1995b; Monteiro, 1997) e seqüências de DNA mitocondrial (Manfrin, 1997). Essas análises têm permitido verificar as diferenças e semelhanças entre as espécies e mesmo entre linhagens de diferentes localidades, de mesma espécie.

Um cladograma hipotético ilustrando a história evolutiva do “cluster” (Tidon-Sklorz, 1995b; Monteiro, 1997) foi elaborado com base nas inversões cromossômicas (Tosi & Sene, 1989), nos cinco tipos diferentes de edeago (Silva & Sene, 1991) e nos seis tipos de cariótipos (Baimai *et al.*, 1983). Segundo esses estudos, no final do plioceno e começo do pleistoceno, populações ancestrais polimórficas adaptadas a uma variedade de cactos teriam invadido o Brasil chegando até a Argentina. A fixação da inversão 5g nas populações argentinas

deu origem a *D. buzzatii*. Dessa forma, dois ramos filéticos iniciais principais se originaram, de um lado *D. buzzatii* e de outro lado formas ancestrais das demais espécies desse "cluster", que hoje estão agrupadas formando o subcluster *serido* (Monteiro, 1997).

Três inversões diferentes separaram essas formas ancestrais. A inversão $2j^9$ ocorreu em populações do Chaco Argentino, caracterizando *D. koepferae* que posteriormente adquiriu tipo de edeago e cariótipo específicos. A inversão $2x^7$ ocorreu em populações da região centro-sul e litoral do Brasil, que posteriormente se diferenciaram dando origem a *D. serido* D e a *D. serido* A, assim denominadas de acordo com o tipo de edeago apresentado. *Drosophila serido* A apresenta cariótipo específico (met 5). A inversão $2e^8$ é compartilhada por moscas adaptadas ao cactos *Pilosocereus*. Houve uma diferenciação nas populações com essas inversões, verificada pela diferenciação quanto à morfologia do edeago. Essa diferenciação deu origem, nas populações do Brasil-central, à *D. serido* B (edeago do tipo B), nas populações do nordeste brasileiro, à *D. seriema* (edeago do tipo C) e a *D. borborema* (edeago do tipo bo).

Dessa forma, dentro desse "cluster", temos entidades bem definidas e isoladas que são as espécies já descritas e, por outro lado, existem populações também diferenciadas em alguns aspectos, mas, talvez não o suficiente para o "status" de espécie. É o caso de *D. serido*, no qual temos as entidades *D. serido* A, *D. serido* B e *D. serido* D. *Drosophila serido* A, holótipo da espécie, apresenta a inversão fixa $2x^7$ e cariótipo met1 e é encontrada no nordeste do Brasil até o Estado do Rio Grande do Sul. *Drosophila serido* B, apresenta o tipo metafásico 1 e é encontrada na caatinga e região centro-sul do Brasil, associada ao cacto *Pilosocereus machrisis*, em afloramentos rochosos. *Drosophila serido* D apresenta a mesma inversão $2x^7$ de *D. serido* A, mas, cariótipo específico (met 5). Estas populações ocorrem nas regiões sul e sudeste do Brasil e ao norte da borda leste do chaco argentino, associadas ao cacto *Cereus hidemannianus* em florestas mesófilas e de galerias ao longo dos vales dos rios pertencentes à Bacia do Rio Paraná. Monteiro (1997) sugeriu que *D. serido* B e *D. serido* D podem ser elevadas à categoria de espécie. O trabalho, descrevendo-as como novas espécies encontra-se no prelo (Tidon-Sklorz, R. comunicação pessoal)

O estudo realizado por Lapenta (1992) e Lapenta *et al.* (1995), mostrou que as esterases constituem uma ferramenta importante no estabelecimento das relações de proximidade entre as linhagens de *D. serido*, identificando diferenças existentes entre as espécies e identificando também, diferenças entre a linhagem A95, que na época era classificada como *D. serido*, e as demais linhagens desta espécie. Posteriormente, uma nova espécie foi descrita como *D. seriema*, na qual essa linhagem A95 é atualmente incluída (Tidon-Sklorz & Sene, 1995a).

Nesse contexto, procurou-se, no presente estudo, caracterizar os padrões de esterases em linhagens de quatro espécies do "cluster" *buzzatii*, investigando algumas características bioquímicas das esterases detectadas (velocidade de migração no gel, afinidade pelos substratos α e β -naftil acetato e comportamento na presença de inibidores), sua distribuição em diferentes partes do corpo, em fêmeas e machos e, para algumas esterases, sua presença em descendentes de intercruzamentos. Procurou-se também, usar a variabilidade observada para discutir a proximidade filogenética entre as linhagens e detectar a presença de mecanismos de regulação interespecífica, atuando no controle da expressão gênica.



II. MATERIAIS E MÉTODOS

II.1. As linhagens

Dez novas linhagens foram analisadas no presente trabalho, sendo oito linhagens classificadas como *D. seriema* e duas como *D. serido*. Foram incluídas também, para reavaliação e análise global, as oito linhagens previamente estudadas por Lapenta *et al.* (1995). Na tabela 1 estão indicadas as linhagens utilizadas e suas respectivas procedências. Essas linhagens foram obtidas nos estoques do Departamento de Biologia do IBILCE, UNESP, e originariamente cedidas pelo Dr. Fábio de Melo Sene, do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP.

II.2. Manutenção em laboratório

As linhagens e os experimentos de cruzamentos foram mantidos, em laboratório, em câmaras de temperatura constante de $20 \pm 1^\circ\text{C}$, em meio de cultura preparado com a mistura de meios de banana e cacto (Madi-Ravazzi & Bicudo, 1992).

II.3. Obtenção de moscas para análise intralinhagem

Moscas recém-nascidas foram obtidas diretamente do estoque e transferidas para tubos com meio de cultura onde permaneciam até completarem 10 dias. Após esse tempo, as moscas eram imediatamente analisadas, individualmente, ou congeladas a -20°C , para análise a ser realizada no máximo em 30 dias.

II.4. Obtenção dos híbridos

Os híbridos foram obtidos por intercruzamentos das linhagens, realizados em garrafas, utilizando-se 10 a 15 casais com quatro a sete dias de idade. Após 10 dias, os pais eram transferidos para uma nova garrafa. Os híbridos recém-nascidos eram transferidos para tubos e, com 10 dias de idade, eram analisados, individualmente, ou congelados para posterior análise.



Tabela 1. Linhagens e espécies utilizadas no presente trabalho. Os códigos originais foram abreviados (entre parênteses), para facilitar a construção das tabelas e figuras. M= linhagem massal. * = linhagens que já tinham seus padrões esterásicos estabelecidos.

ESPÉCIES	LINHAGENS	PROCEDÊNCIAS	
<i>D. serido</i>	B59Q1 (B59) *	Petrolina – PE	Brasil
	B50Q3 (B50)*	Ibotirama – BA	Brasil
	A55 (A55)*	Bela Vista – MS	Brasil
	B31D1 (B31) *	Puerto Tirol/Chaco	Argentina
	D69R2 (D69A)	----- - BA	Brasil
	D69R5 (D69B)	----- - BA	Brasil
<i>D. seriema</i>	D73C12B (D73A)	Cachoeira do Ferro Doido - BA	Brasil
	D73C5BM (D73B)	Cachoeira do Ferro Doido - BA	Brasil
	A95 (A95)*	Serra do Cipó – MG	Brasil
	D71C1BM (D71)	Morro do Chapéu – BA	Brasil
	D40FM (D40)	Serra do Cipó – MG	Brasil
	D63M (D63)	Mucugê – BA	Brasil
	D62C4BM (D62)	Mucugê – BA	Brasil
	D72M (D72A)	----- - BA	Brasil
	D72R2 (D72B)	Morro do Chapéu – BA	Brasil
<i>D. koepferae</i>	B20D2 (B20) *	Tapia – Tucumam	Argentina
	B25D7 (B25) *	La Rioja	Argentina
<i>D. buzzatii</i>	Buz (Buz)*	Cafarnaum – BA	Brasil

II.5. Retrocruzamentos para testes de expressão gênica

Foram realizados retrocruzamentos envolvendo fêmeas híbridas (os machos são estéreis) descendentes dos cruzamentos entre A95 e B20D2 (nas duas direções) e as linhagens parentais. Esses retrocruzamentos foram realizados em massa, com 10 a 15 casais por garrafa, como descrito no item anterior, e os descendentes analisados individualmente com 10 dias de idade. Em uma segunda etapa, as fêmeas descendentes desses retrocruzamentos (os machos são estéreis) foram cruzadas com os machos das linhagens parentais. Nessa etapa, foram realizados cruzamentos em massa, com a técnica já descrita, e também por casal. Os cruzamentos por casal foram realizados em tubos, com moscas de três dias de idade. Os casais permaneciam nos tubos até completarem 10 dias, quando eram congelados para serem analisados juntamente com seus descendentes. Os descendentes foram coletados ainda recém-nascidos, separados em tubos, por sexo e com 10 dias, congelados para posterior análise.

II.6. Preparo dos géis

Os géis de poliacrilamida, utilizados neste trabalho, foram preparados conforme Lapenta *et al.* (1995), modificado de Ceron (1988), na proporção de 2,6% de ligações cruzadas (C%) e a 10% de concentração (T%). Os volumes de água e demais componentes utilizados para o preparo dos géis foram os seguintes:

Água destilada	10,5 ml
Tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,8	6,3 ml
Solução de acrilamida/bis acrilamida	8,0 ml
Persulfato de amônia a 2%	0,4 ml
TEMED	25 μ l

II.7. Preparo das amostras e condições de eletroforese

Moscas com 10 dias foram maceradas a 0°C em 20 a 30 μ l do tampão de amostra (Tris-HCl 0,1 M pH 8,8, contendo glicerol a 10%). Foi utilizado para cada amostra, o volume de 10 μ l. Após a aplicação das amostras, os géis foram submetidos à eletroforese por três horas e 15 minutos, a uma voltagem

constante de 200 V, utilizando-se para preenchimento dos compartimentos superior e inferior da cuba, um tampão Tris-glicina 0,1 M pH 8,3.

II.8. Identificação das esterases e avaliação da especificidade ao substrato

A identificação das bandas com atividade esterásica, nos géis, foi baseada nos métodos de coloração descritos por Lapenta *et al.* (1995), modificado de Ceron (1988). Nesta técnica os géis são pré-incubados por 30 minutos, à temperatura ambiente, em placas de Petri contendo 50 ml de tampão fosfato 0,1 M pH 6,2. A seguir, o tampão é retirado e adicionada a solução corante constituída de 50 ml de tampão fosfato 0,1 M pH 6,2 contendo 20 mg de α -naftil acetato e 15 mg de β -naftil acetato (previamente solubilizado em 1 ml de acetona ou metanol), 60 mg de Fast Blue RR e 5 ml de N-propanol. Após a coloração por uma hora, no escuro e à temperatura ambiente, as esterases são visualizadas nos géis como bandas de coloração preta ou vermelha, indicativas da presença de α e β -esterases, respectivamente. Após a coloração, os géis foram tratados com 100 ml de uma solução de descoloração contendo álcool etílico comercial, ácido acético e água destilada na proporção de 2:1:8, por 24 a 48 horas.

II.9. Tratamento com inibidores para caracterização bioquímica das esterases

Para o teste com inibidores, os géis foram pré-incubados e depois submetidos à coloração na presença dos mesmos. Foram utilizados iodoacetamida (IAC), para-cloromercuriobenzoato (pCMB), fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) e sulfato de eserina, todos na concentração de 0,1 mM, e malathion (S (1-2 dicarbetoietil) 0-0 dimetiltiofosfato) nas concentrações de 0,8, 1 e 1,6 mM. Os compostos iodoacetamida, pCMB e sulfato de eserina foram dissolvidos diretamente no tampão fosfato 0,1 M pH 6,2; já o PMSF foi dissolvido, previamente, em 1 ml de metanol antes de ser adicionado ao tampão.

Géis tratados e géis controles, contendo a mesma seqüência de amostras, foram feitos, simultaneamente, nestes experimentos. No preparo das amostras, foram utilizadas quatro moscas maceradas em 100 μ l do tampão de amostra (Tris-HCl 0,1 M pH 8,8, contendo glicerol a 10%), desta forma foi mantida a proporção usual de 25 μ l de tampão por mosca. Uma alíquota de 10 μ l dessa solução era aplicada por compartimento, em cada gel.



II.10. Localização das esterases em diferentes partes do corpo

Neste experimento, as moscas eram dissecadas em solução de Demerec (Demerec & Kaufmann, 1945) para separação das partes do corpo (cabeça, tórax e abdome) que eram transferidas para os tubos de amostra. As amostras continham um exemplar ou três de mesma parte, macerados em 25 µl de tampão (Tris-HCl 0,1 M pH 8,8, contendo glicerol a 10%).

II.11. Secagem dos géis

A secagem dos géis foi baseada no método de Ceron et al. (1992). Inicialmente os géis eram tratados em uma solução de ácido acético a 7,5% e glicerol a 10% por duas horas. Em seguida, eram banhados numa solução de gelatina comercial a 5%, prensados em um bastidor entre duas folhas de papel celofane e deixados à temperatura ambiente por três a quatro dias para secagem.

II.12. Análise estatística

II.12. 1. Índice de similaridade (IS)

O índice de similaridade, utilizado neste trabalho, foi o de Whitney et al. (1968).

O IS foi calculado com a seguinte fórmula:

$$IS = \frac{\text{Nº de pares de bandas similares}}{\text{nº de bandas diferente} + \text{nº de pares de bandas similares}}$$

II.12.2. Análise de dependência (ANADEP)

A análise de dependência é uma técnica geométrica para o estudo de associações entre linhas e colunas (neste caso entre bandas e linhagens, respectivamente), de uma tabela de classificação cruzada. Neste trabalho a tabela foi construída com as porcentagens de ocorrência de cada banda esterásica, em cada linhagem.

O método ANADEP, segundo Cordeiro (1987) é, em linhas gerais, o seguinte: cada linhagem, vista como um vetor das proporções das bandas esterásicas nela encontradas, é um ponto (no sentido geométrico) no espaço real de dimensão X (X= nº de bandas); da mesma forma cada banda esterásica, vista

como um vetor das proporções de linhagens em que ela é encontrada, é um ponto no espaço de dimensão N ($N = n^\circ$ de linhagens). Teremos, então, no espaço de dimensão X , uma nuvem de pontos, cada um representando uma linhagem, e no espaço de dimensão N , uma nuvem de pontos, cada um representando uma banda esterásica.

Dadas essas configurações de pontos, o método procura, usando técnicas matemáticas adequadas, direções nos respectivos espaços onde estão as linhagens (dimensão X) e que disponham, para o observador, aqueles objetos ou pontos o mais dispersos possível, isto é, nas direções mais favoráveis para se enxergarem os pontos no sentido de que eles fiquem o mais afastados possível um do outro.

Cada direção é um fator de dependência e estes são ordenados pela ordem decrescente das suas dependências (medidas de quantidade de espalhamento dos pontos ao longo de sua direção no espaço correspondente). O fator de dependência 1 (FT1) é, portanto, aquele que tem a maior dependência, o fator de dependência 2 (FT2) é a segunda maior dependência, e assim por diante. Em cada espaço, a dependência de cada fator é a mesma de seu correspondente, na ordenação no outro espaço. A dependência total é a soma das dependências de todos os fatores. Com isto, representam-se as importâncias dos fatores de dependência, em função dos percentuais da dependência total explicadas.

II.12.3. Análise de "cluster"

A análise de "cluster" (análise de aglomerados) é uma técnica para agrupar indivíduos (ou variáveis) de acordo com uma medida de similaridade ou, complementarmente, de distância (Mardia *et al.*, 1980). Há vários métodos de análise de "cluster", e no presente trabalho foi usado o de ligação simples (single Linkage) e de similaridade por distância Euclidiana. As linhagens foram agrupadas pelos quatro primeiros fatores de dependência da ANADEP.

III. RESULTADOS

III.1. Padrões esterásicos

Para o estudo dos padrões esterásicos de novas linhagens foram analisados fêmeas e machos de oito linhagens de *Drosophila seriema* e de duas linhagens de *D. serido*, totalizando 1447 moscas. A posição das bandas de cada linhagem foi estabelecida por meio de uma análise comparativa entre as linhagens analisadas neste trabalho e as linhagens cujos padrões foram estabelecidos por Lapenta (1992) e Lapenta *et al.* (1995). No total, nas 10 linhagens foram identificadas 48 bandas com atividade esterásica. Entre as linhagens de *D. seriema*, analisadas neste trabalho, foram identificadas 38 bandas, sendo que 12 não haviam sido detectadas nas linhagens analisadas anteriormente, que são as bandas 8, 24, 26, 28, 36, 39, 40, 42, 48, 55, 56 e 58. Já entre as linhagens de *D. serido* foram identificadas 24 bandas, sendo que sete ainda não haviam sido detectadas no trabalho anterior, que são as bandas 9, 26, 27, 32, 35, 38 e 41 (figura 1).

Somente a banda 52 foi comum a todas as linhagens estudadas. Considerando apenas as linhagens classificadas como *D. seriema*, verifica-se que além da banda 52, as bandas 31, 43 e 48 estiveram presentes em todas as linhagens. As bandas 16 e 59 estiveram ausentes em D72R2 e D40FM, respectivamente. O oposto ocorreu com as bandas 8, 36 e 54 que estiveram presentes, cada uma, em apenas uma linhagem. De todas essas bandas, as bandas 8 de D73C5BM e 36 de D73C12B não haviam sido detectadas anteriormente e podem ser consideradas específicas dessas linhagens. Já dentre as linhagens classificadas como *D. serido*, D69R2 apresentou com exclusividade, as bandas 9, 27 e 41. As figuras 2 a 11 apresentam os padrões de bandas detectados nas linhagens estudadas neste trabalho.

Quanto à especificidade ao substrato hidrolisado, foram detectadas nas linhagens das espécies de *Drosophila* estudadas, β -esterases, $\alpha\beta$ -esterases e α -esterases. As β -esterases são enzimas que hidrolisam preferencialmente o β -naftil acetato e apresentam uma coloração vermelha, no gel. Fazem parte do grupo das β -esterases, as enzimas visualizadas nas bandas 8, 24, 26, 36, 39, 40 e 42, em *D. seriema*, e nas bandas 26, 32, 35 e 45 em *D. serido*. As $\alpha\beta$ -esterases

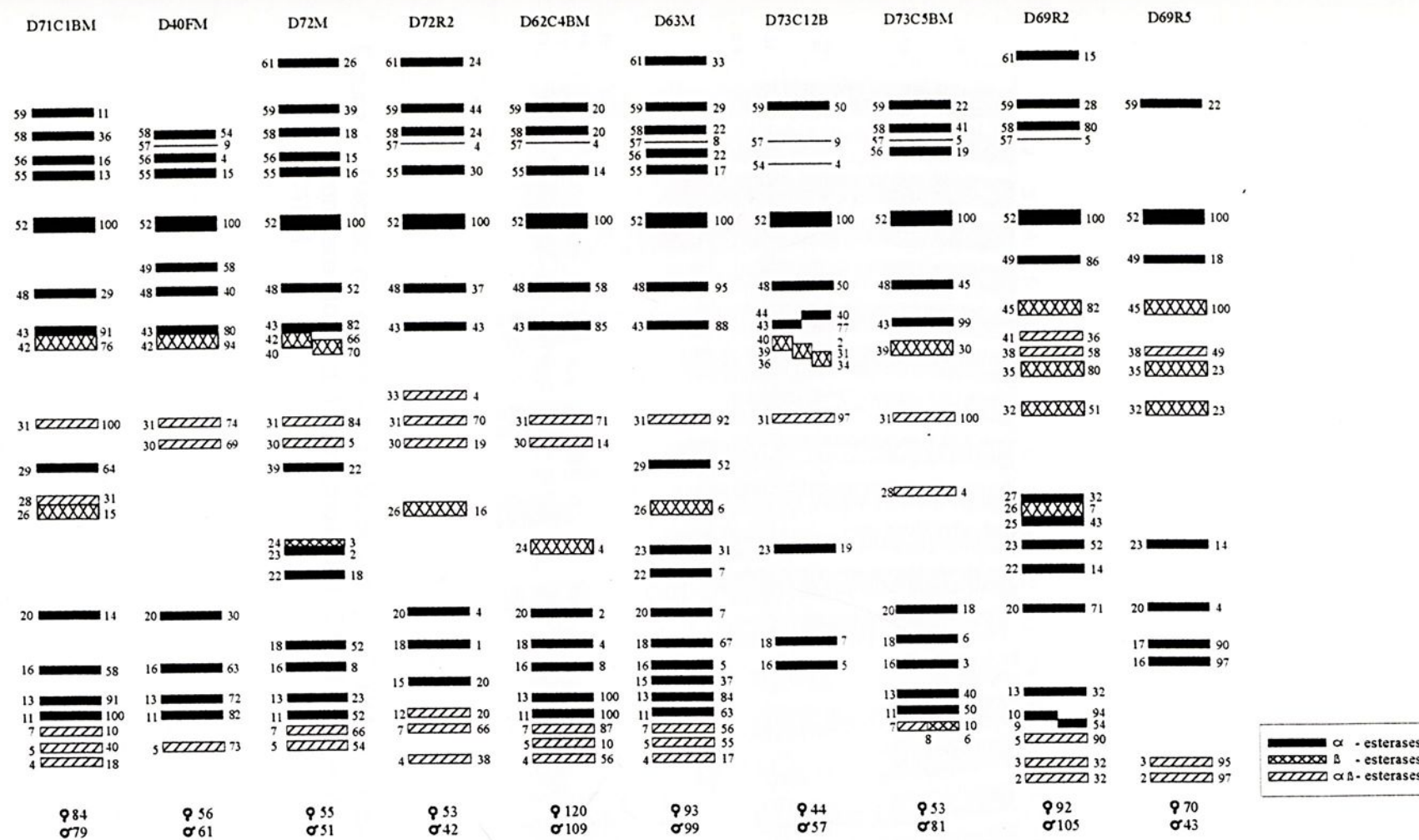


Figura 1. Zimograma representativo dos padrões de esterases das linhagens de *Drosophila seriema* (D71C1BM, D40FM, D72M, D72R2, D62C4BM, D63M, D73C12B e D73C5BM) e das linhagens de *D. serido* (D69R2 e D69R5). A numeração das bandas está representada à esquerda e a freqüência com que a banda ocorreu na linhagem, à direita.

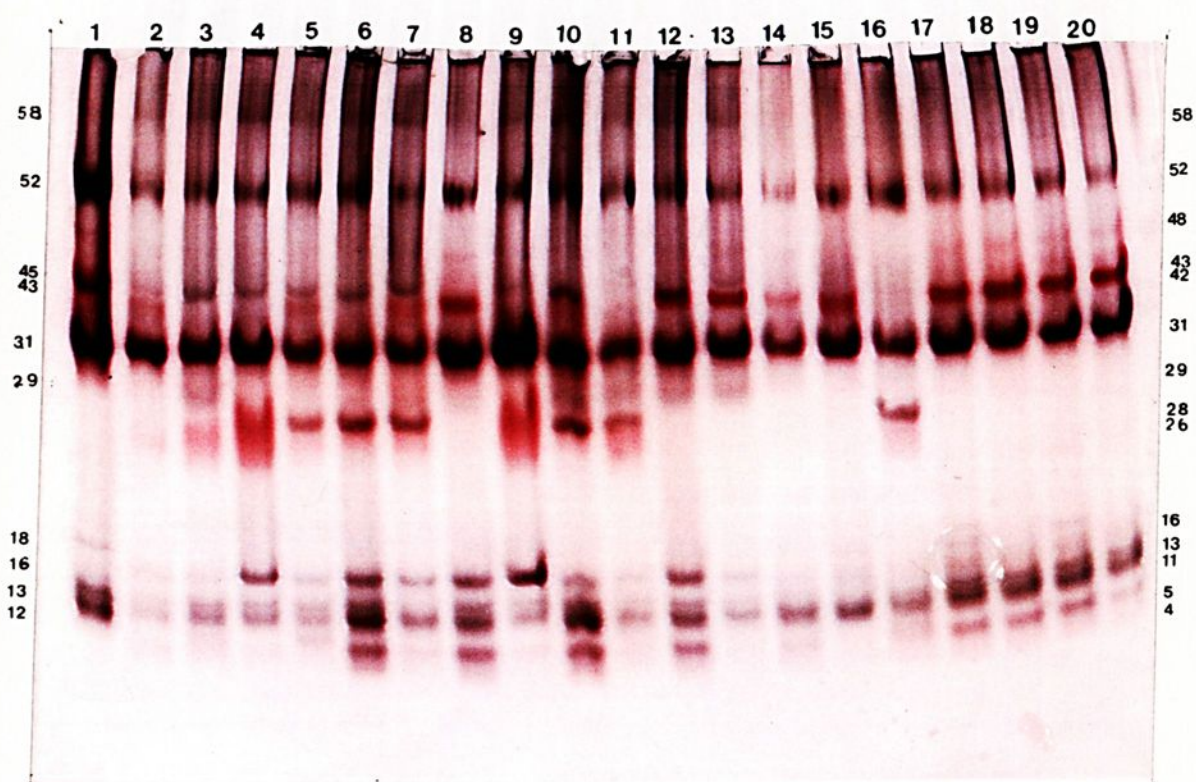


Figura 2. Padrão de esterases da linhagem D71C1BM. 1- macho A95 para comparação, 2 a 13- machos D71 C1BM e 14 a 20- fêmeas D71 C1BM.

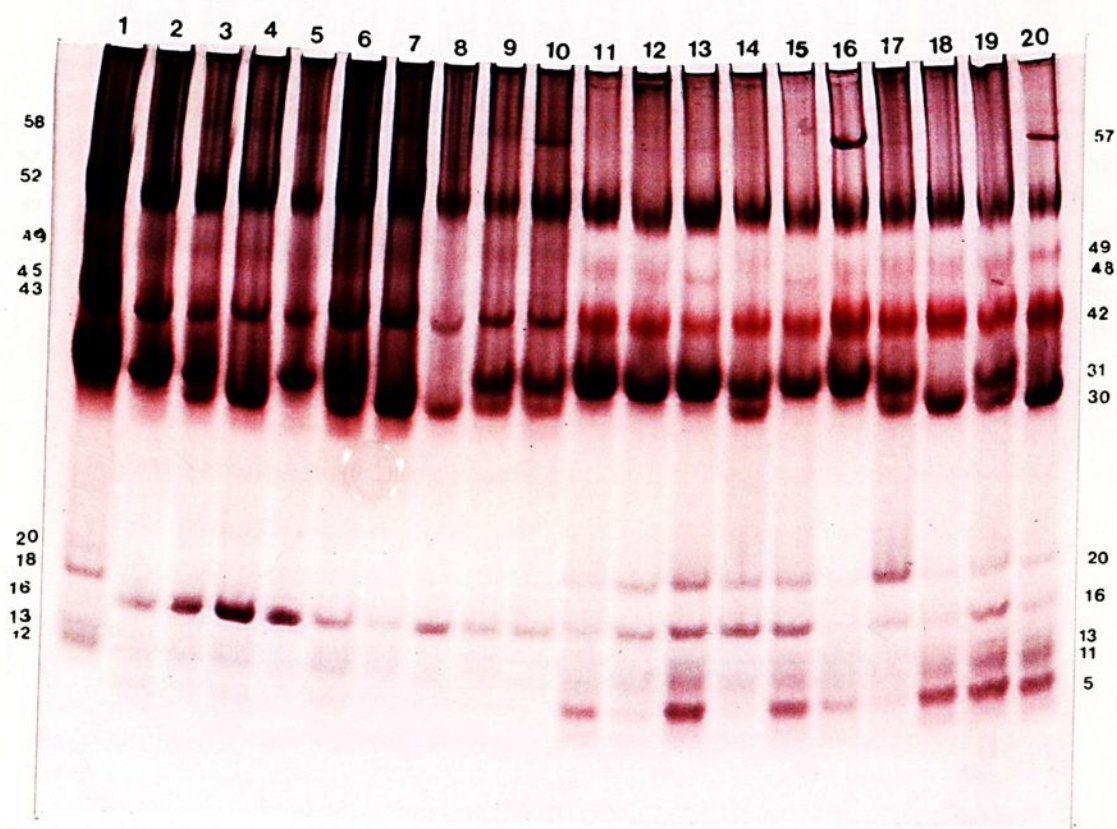


Figura 3. Padrão de esterases da linhagem D40FM. 1- macho A95 para comparação, 2 a 10- machos D40FM e 11 a 20- fêmeas D40FM.

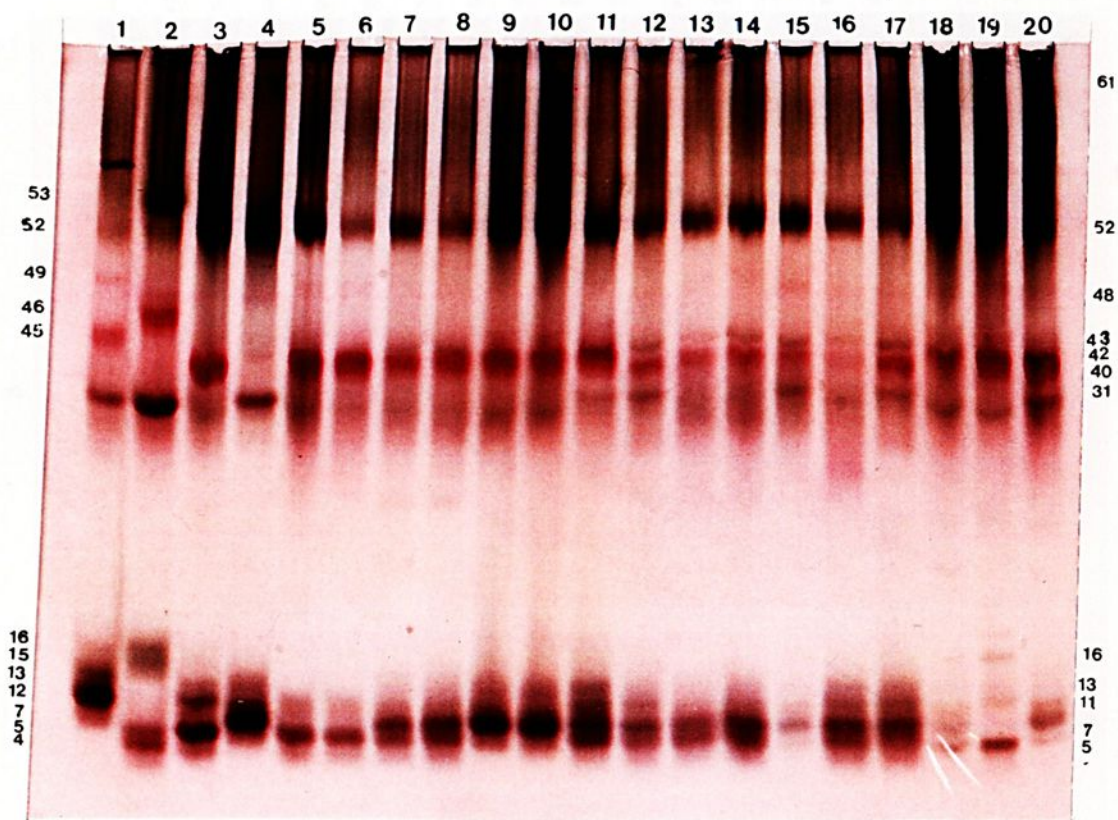


Figura 4. Padrão de esterases da linhagem D72M. 1- macho A95, 2- macho B50Q3, 3 a 10- fêmeas D72M e 11 a 20- machos D72M.

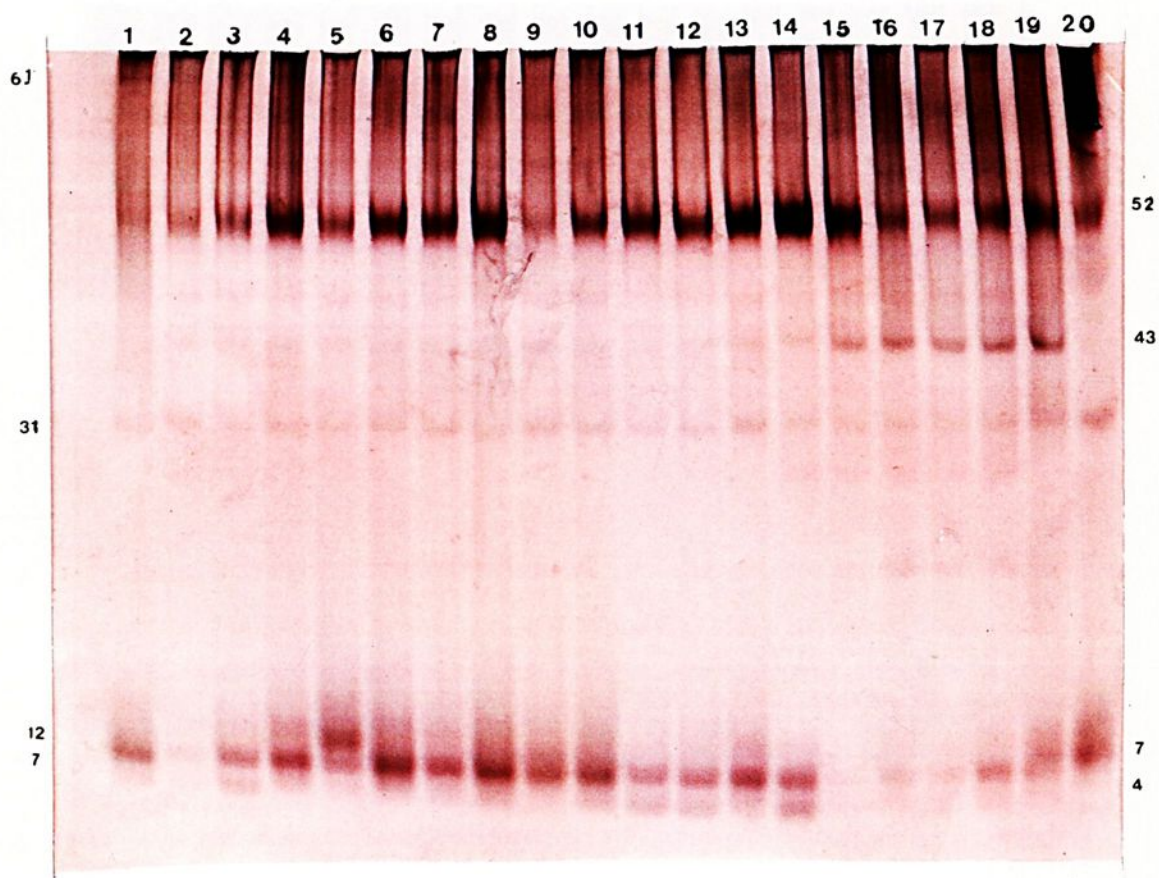


Figura 5. Padrão de esterases da linhagem D72R2. 1 a 10- fêmeas e 11 a 20- machos.

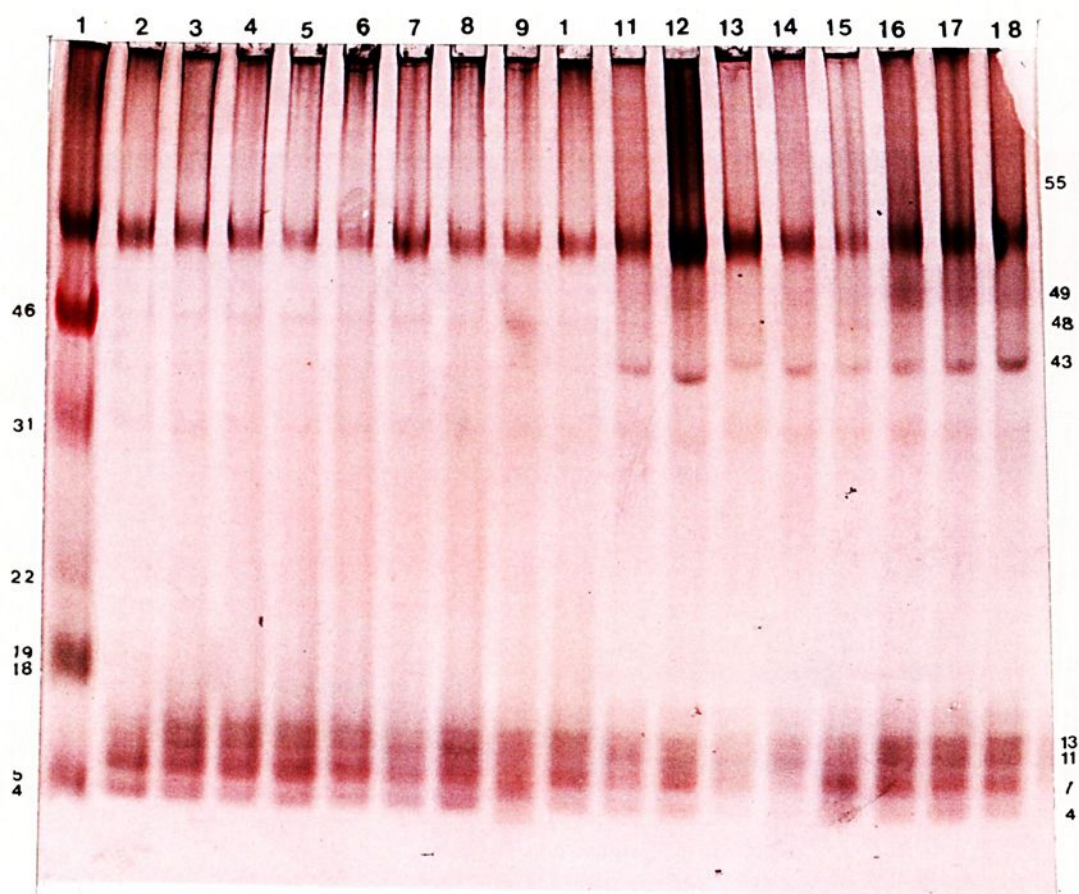


Figura 6. Padrão de esterases da linhagem D62C4BM. 1- macho B20D2, 2 a 10- fêmeas e 9 a 18- machos.

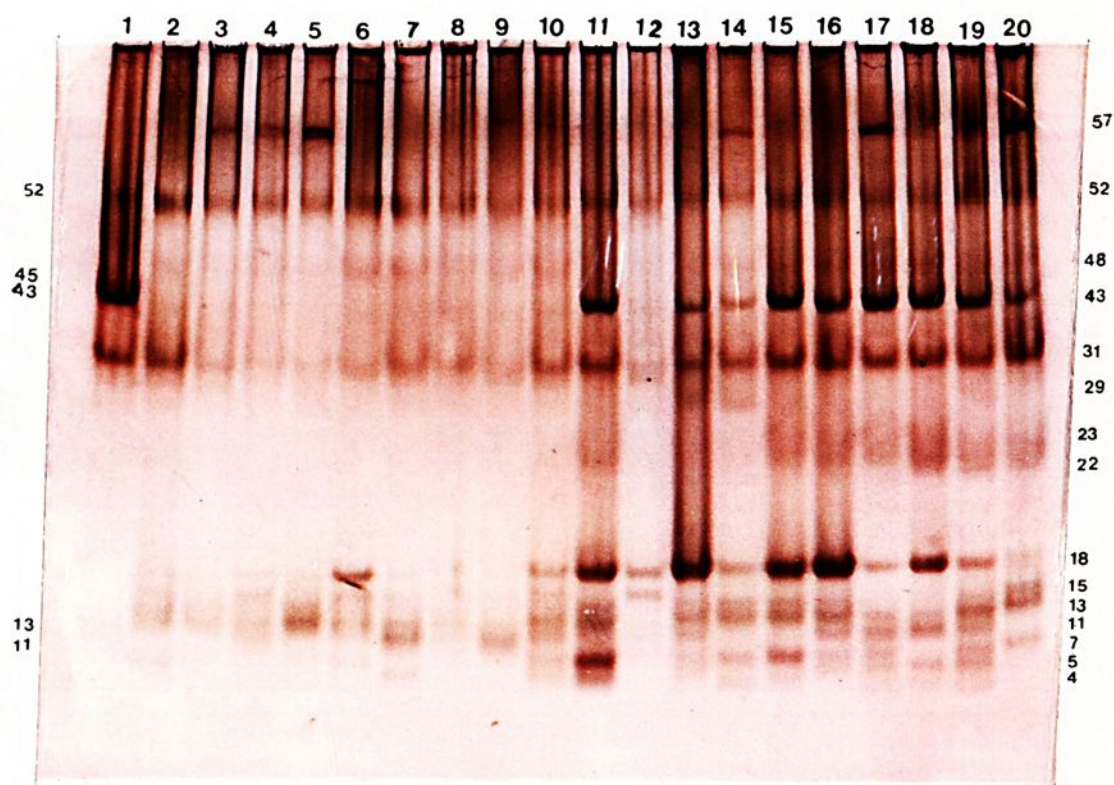


Figura 7. Padrão de esterases da linhagem D63M. 1- macho A95, 2 a 10- fêmeas e 11 a 20- machos.

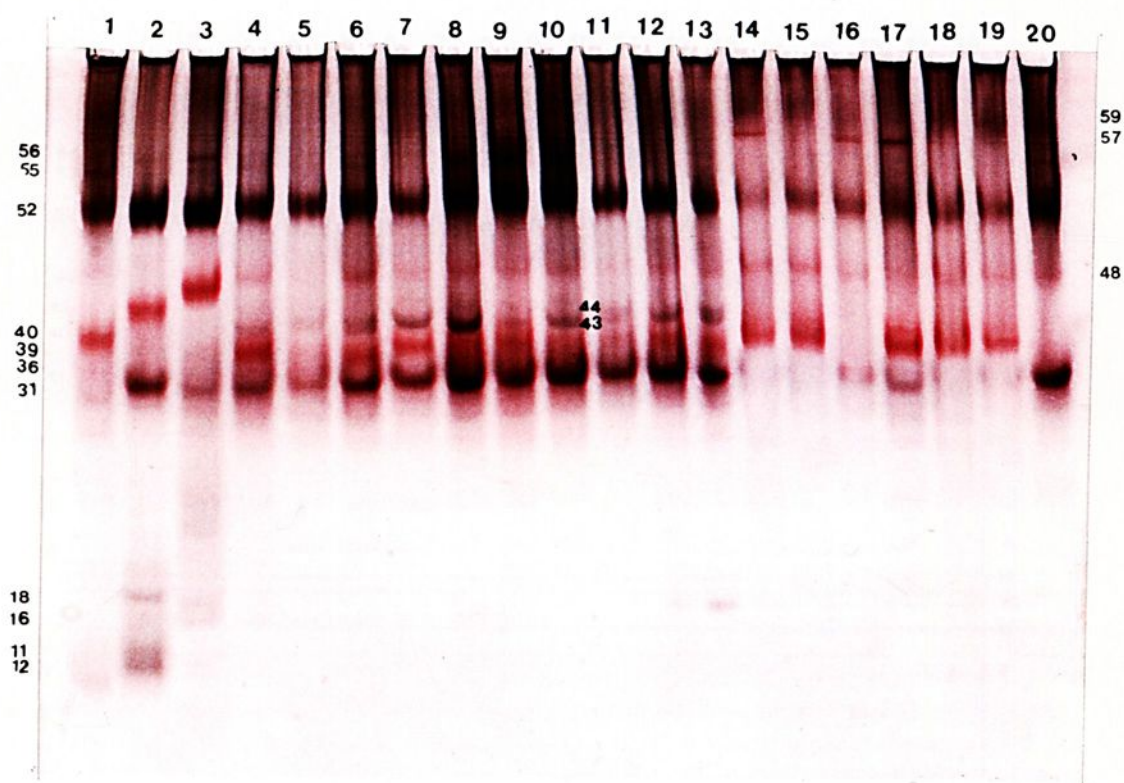


Figura 8. Padrão de esterases da linhagem D73C12B. 1- macho D72M, 2- fêmea A95, 3- macho B20D2, 4 a 13 - machos, 14 a 20- fêmeas.

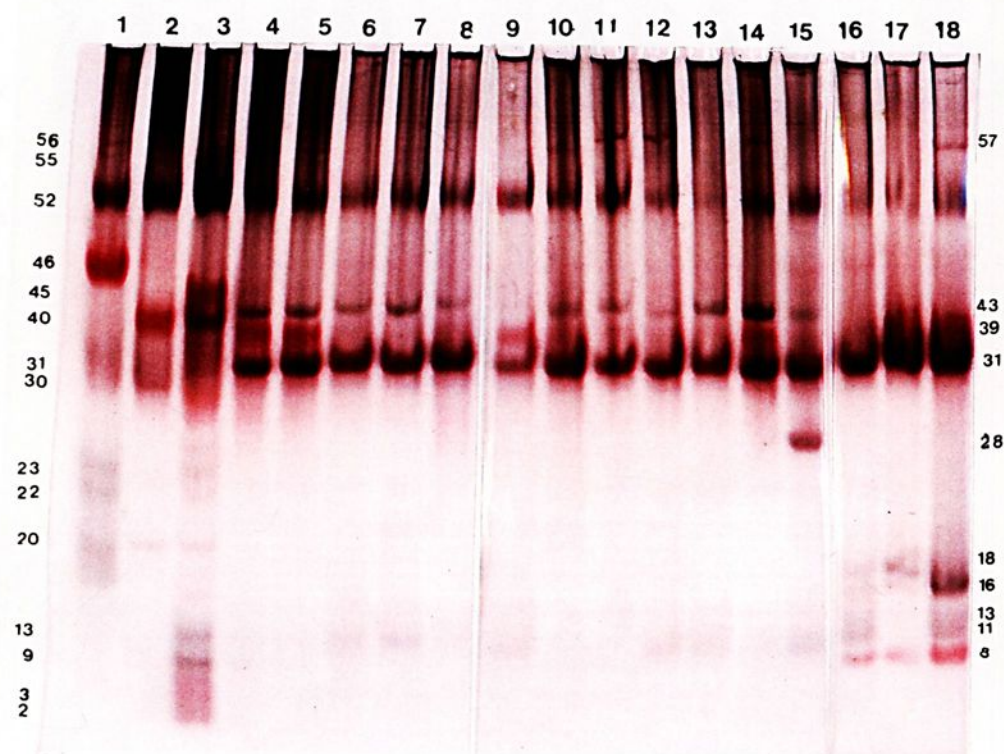


Figura 9. Padrão de esterases da linhagem D73C5BM. 1- macho B20D2, 2- fêmea D72M, 3- macho D69R2, 4 a 15 - machos, 16 a 18- fêmeas.

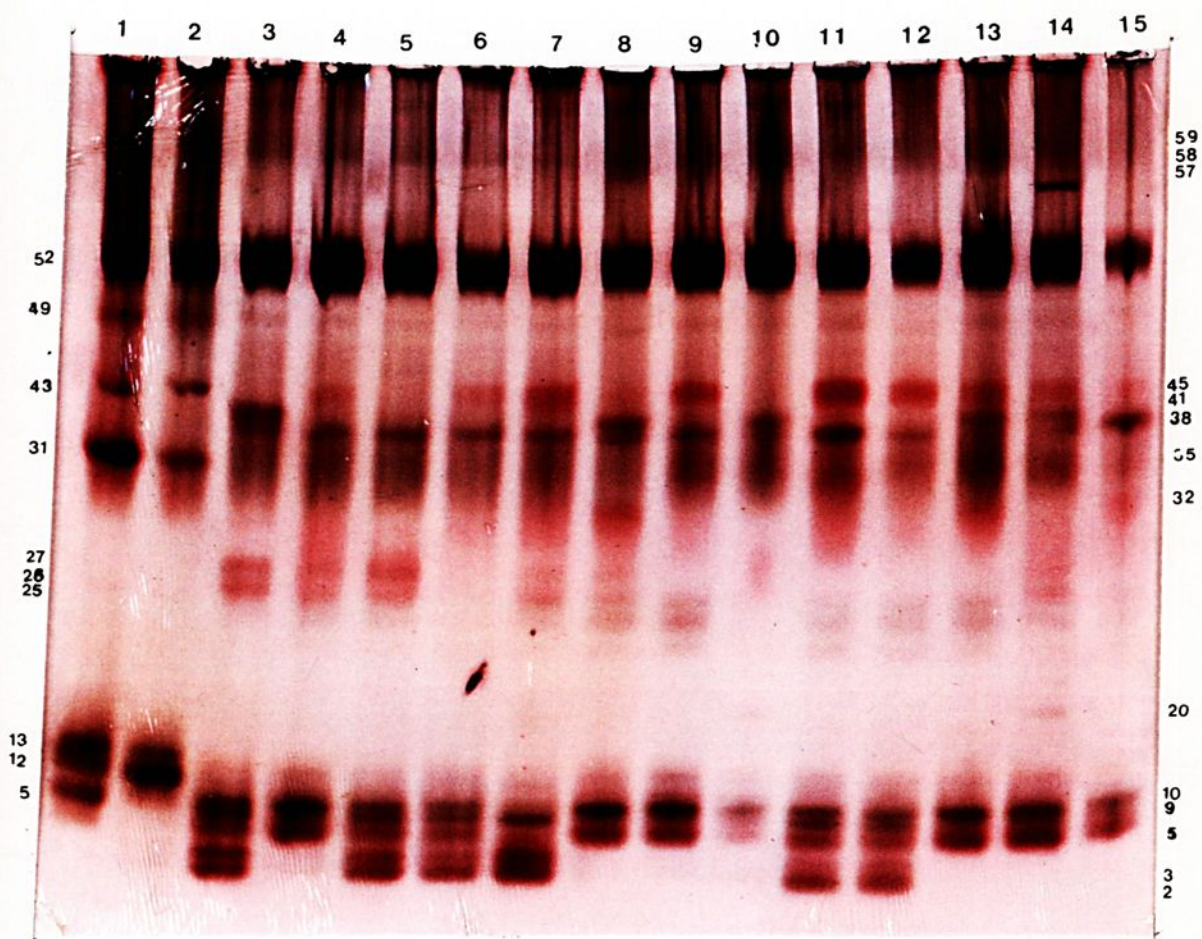


Figura 10. Padrão de esterases da linhagem D69R2. 1 e 2- machos A95, 3 a 5- fêmeas e 6 a 15 machos.

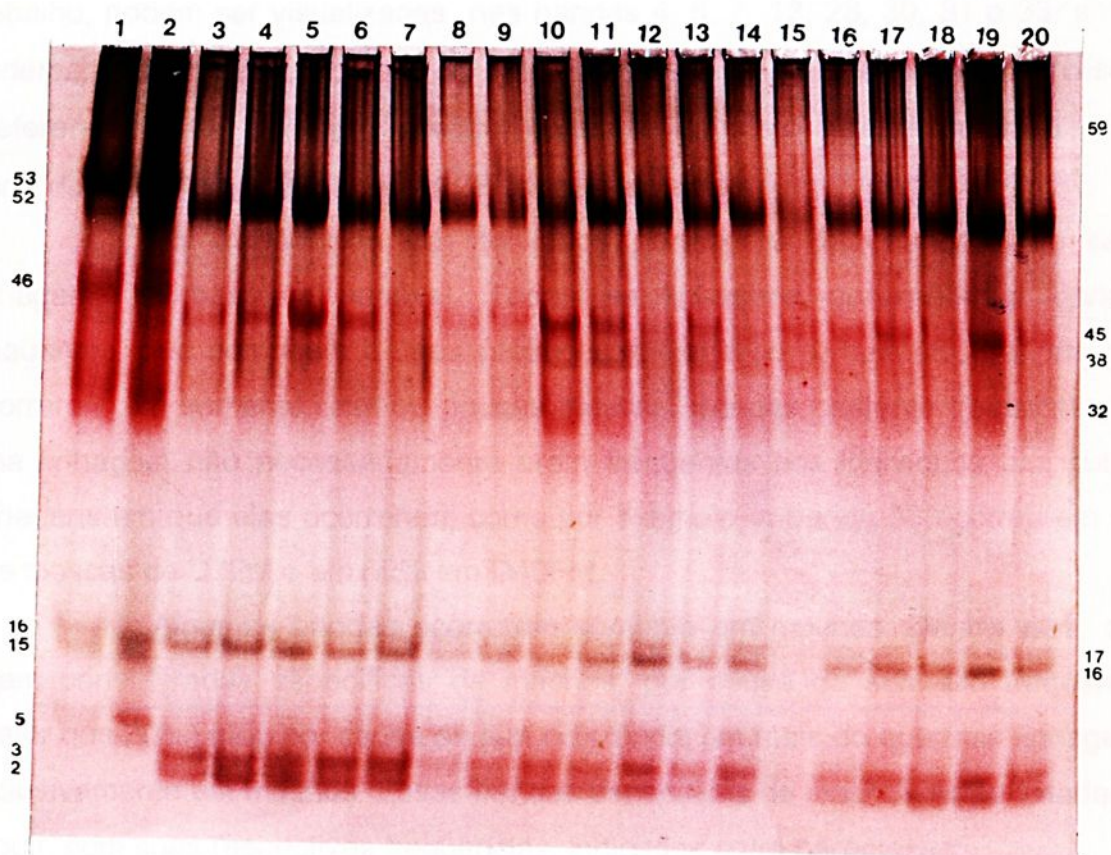


Figura 11. Padrão de esterases da linhagem D69R5. 1 e 2- fêmeas B50Q3, 3 a 9- fêmeas e 10 a 20- machos.

hidrolisam tanto o α -naftil acetato quanto o β -naftil acetato e apresentam uma coloração intermediária entre o vermelho e o preto. Caracterizam-se por apresentar uma variação na coloração de acordo com as concentrações dos dois tipos de naftil acetatos. Quando o β -naftil acetato predomina elas apresentam uma coloração mais avermelhada; com o predomínio do α -naftil acetato, apresentam uma coloração mais próxima do preto. As $\alpha\beta$ -esterases, identificadas neste trabalho, podem ser visualizadas nas bandas 4, 5, 7, 12, 28, 30, 31 e 33, em *D. seriema*, e nas bandas 2, 3, 5, 38 e 41 em *D. serido*. As α -esterases hidrolisam, preferencialmente, o α -naftil acetato, coram-se de preto e representam a maior parte das enzimas, totalizando as 28 bandas restantes.

As freqüências de indivíduos portadores das bandas, em cada linhagem, foi bastante variável. Todas as linhagens apresentaram bandas freqüentes, que compõem o seu padrão característico e, também, bandas que ocorreram em somente uma ou poucas moscas. Bandas bastante freqüentes em uma linhagem não necessariamente eram freqüentes nos indivíduos das outras linhagens em que elas ocorreram; como por exemplo, a banda 30 ocorreu em 5% das moscas de D72M e em 69% em D40FM.

Algumas bandas ocorreram somente em machos. Dentre elas, oito foram consideradas específicas de machos, por causa da sua alta freqüência (maior que 30%) e/ou por causa da sua ocorrência em mais do que uma linhagem, exclusivamente em machos. Essas bandas específicas de machos estão listadas a seguir, com suas respectivas freqüências, indicadas entre parênteses:

Banda 22 – presente em D72M (18) e D63M (7)

Banda 23 – presente em D72M (2), D63M (31) e D73C12B (19)

Banda 29 – presente em D71C1BM (64), D72M (22) e D63M (52)

Banda 32 – presente em D69R2 (51) e D69R5 (23)

Banda 35 – presente em D69R2 (80) e D69R5 (23)

Banda 43 – presente em D71C1BM (91), D40FM (80), D72M (82), D72R2 (43), D62C4BM (85), D63M (88), D73C12B (77) e D73C5BM (99)

Banda 44 – presente em D73C12B (40)

Banda 58 – presente em D71C1BM (36), D40FM (54), D72M (18), D72R2 (24), D62C4BM (20), D63M (22), D73C5BM (41) e D69R2 (80)

Dentre essas esterases, as bandas 24, 26, 32, 35, 43, 44, e 58 foram específicas dos machos em todas as linhagens em que elas ocorreram. Já as bandas 22, 23 e 29, que haviam sido detectadas no trabalho anterior, comportaram-se como específicas de machos em algumas linhagens e em outras, não. Lapenta *et al.* (1995) verificaram que essas bandas eram específicas de machos nas linhagens B20D2 e B25D7 de *Drosophila koepferae* e não na linhagem Buz, de *D. buzzatii*. No presente trabalho elas só não foram específicas de machos em D69R2 e D69R5.

Esterases exclusivas de fêmeas não foram detectadas neste trabalho, mas algumas bandas ocorreram com frequência maior em fêmeas que em machos, como a banda 20 que, em D40FM, foi detectada em 8% dos machos e em 54% das fêmeas e a banda 8 que em D73C5BM ocorreu em 3% dos machos e em 17% das fêmeas. Já a banda 16 foi detectada somente em fêmeas de D73C5BM, com frequência de 9%; entretanto, em outras linhagens, essa banda ocorreu em ambos os sexos.

III.2. Complementação de dados sobre as linhagens anteriormente analisadas

As linhagens estudadas por Lapenta *et al.* (1995) foram novamente analisadas, no presente trabalho, com relação aos inibidores e à localização do sítio de atividade das esterases em diferentes partes do corpo. Além disso, amostras individuais foram analisadas, com o objetivo de comparação com as linhagens do presente trabalho. Essa análise mais ampla permitiu verificar algumas bandas adicionais, não diagnosticadas antes, que apresentamos neste trabalho para complementação dos dados. O padrão de bandas dessas linhagens, já com as modificações, está mostrado na figura 12. Na linhagem A95 foram observadas sete bandas adicionais, em B20D2, seis bandas e nas demais linhagens de duas a quatro bandas.

III.3. Utilização de inibidores da atividade enzimática

Para uma melhor caracterização das esterases, estas foram submetidas a diferentes inibidores da atividade enzimática. Neste trabalho foram realizados experimentos utilizando-se como inibidores malathion, sulfato de

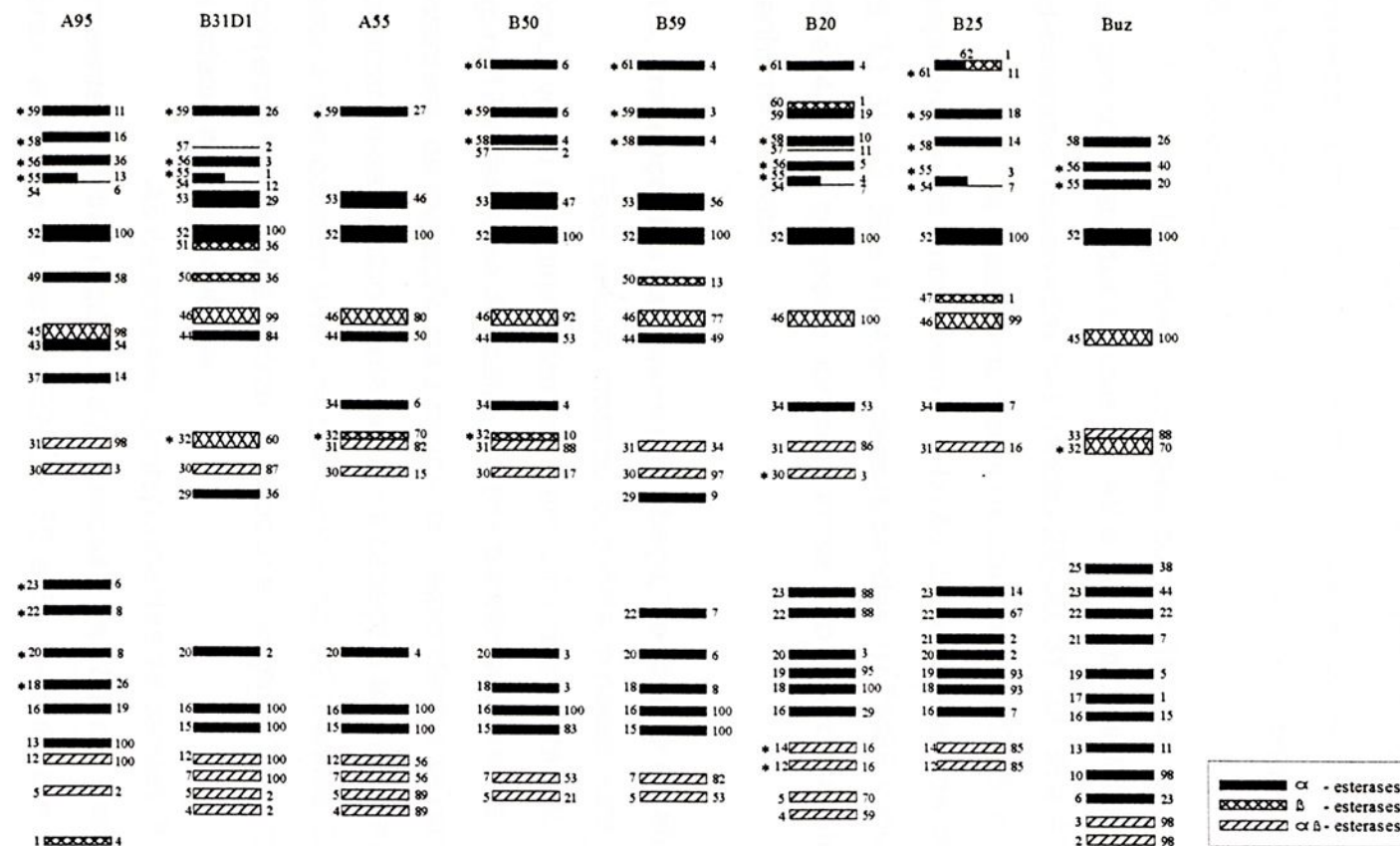


Figura 12. Zimograma representativo dos padrões de esterases das linhagens de *Drosophila seriema* (A95), *D. serido* (B31D1, A55, B50Q3 e B59Q1), *D. koepferae* (B20D2 e B25D7) e de *D. buzzatii* (Buz), extraído do trabalho de Lapenta *et al.* (1995) e modificado no presente trabalho. A numeração das bandas está representada à esquerda e a freqüência dessa banda, à direita. Asteriscos indicam as bandas adicionadas neste trabalho.

eserina, para-cloromercuriobenzoato (pCMB), fluoreto de fenilmetilsufonila (PMSF) e iodoacetamida (IAC). A tabela 2 refere-se ao comportamento das esterases na presença desses inibidores.

O uso de malathion inibe completamente a atividade da esterase correspondente à banda 52 e, inibe parcialmente, as β -esterases correspondentes às bandas 24, 26, 36, 39, 40, 42, 45 e 46 e as α -esterases, bandas 48, 49, 54, 55, 56, 57, 58 e 59 (figura 13).

O tratamento dos géis com sulfato de eserina permitiu verificar a inibição completa das bandas 48, 49 e 52 e uma inibição parcial da atividade das $\alpha\beta$ -esterases observadas nas bandas 28, 30, 31, 33, 38 e 41 (figura 14).

Os tratamentos com os compostos pCMB e PMSF (figuras 15 e 16, respectivamente) mostraram a inibição das $\alpha\beta$ -esterases observadas nas bandas 28, 30, 31, 33, 38 e 41. Além dessas bandas, o PMSF inibiu também as bandas α 43 e 44. O composto iodoacetamida não alterou a atividade enzimática de nenhuma esterase.

III.4. Presença das esterases na cabeça, no tórax e no abdome das moscas

Esse estudo mostrou que determinadas esterases estão presentes, exclusiva ou predominantemente, em uma das partes do corpo. A tabela 3 e a figura 17 referem-se à localização das bandas esterásicas mais freqüentes. As $\alpha\beta$ -esterases, de migração mais rápida, correspondentes às bandas 2, 3, 5, 7, 12 e 14, localizaram-se predominantemente na cabeça e as $\alpha\beta$ -esterases de migração mais lenta e que ocupam uma posição central no gel (bandas 28, 30, 31, 33, 38 e 41) ocorreram na cabeça, tórax e abdome, seguindo um gradiente crescente de atividade, nessa seqüência.

As β -esterases correspondentes às bandas 36, 40, 42, 45 e 46 estão presentes nas três regiões. Já as bandas 24 e 26 foram detectadas na cabeça e no tórax, enquanto as bandas 32, 35, 50 e 51, β -esterases específicas de machos, estiveram presentes exclusivamente no abdome.

Quanto às α -esterases, algumas bandas mantiveram uma localização morfológica bem definida, como a esterase correspondente à banda 52, que está localizada na cabeça e tórax e é ausente no abdome, as bandas 9, 10, 11, 13 e 19 que ocorreram, predominantemente, na cabeça, a banda 29, no tórax e abdome e

Tabela 2. Comportamento das bandas na presença dos inibidores (+, ++, +++ = graus de inibição)

INIBIDORES	+	++	+++
MALATHION	-	24, 26,36,39,40,42,45, 46,48,49,54,55,56, 57,58,59	52
SULFATO DE ESERINA	28, 30, 31, 33, 38, 41	-	48, 49,52
pCMB	-	-	28, 30, 31, 33, 38, 41
PMSF	-	-	28, 30, 31, 33, 38, 41, 43, 44

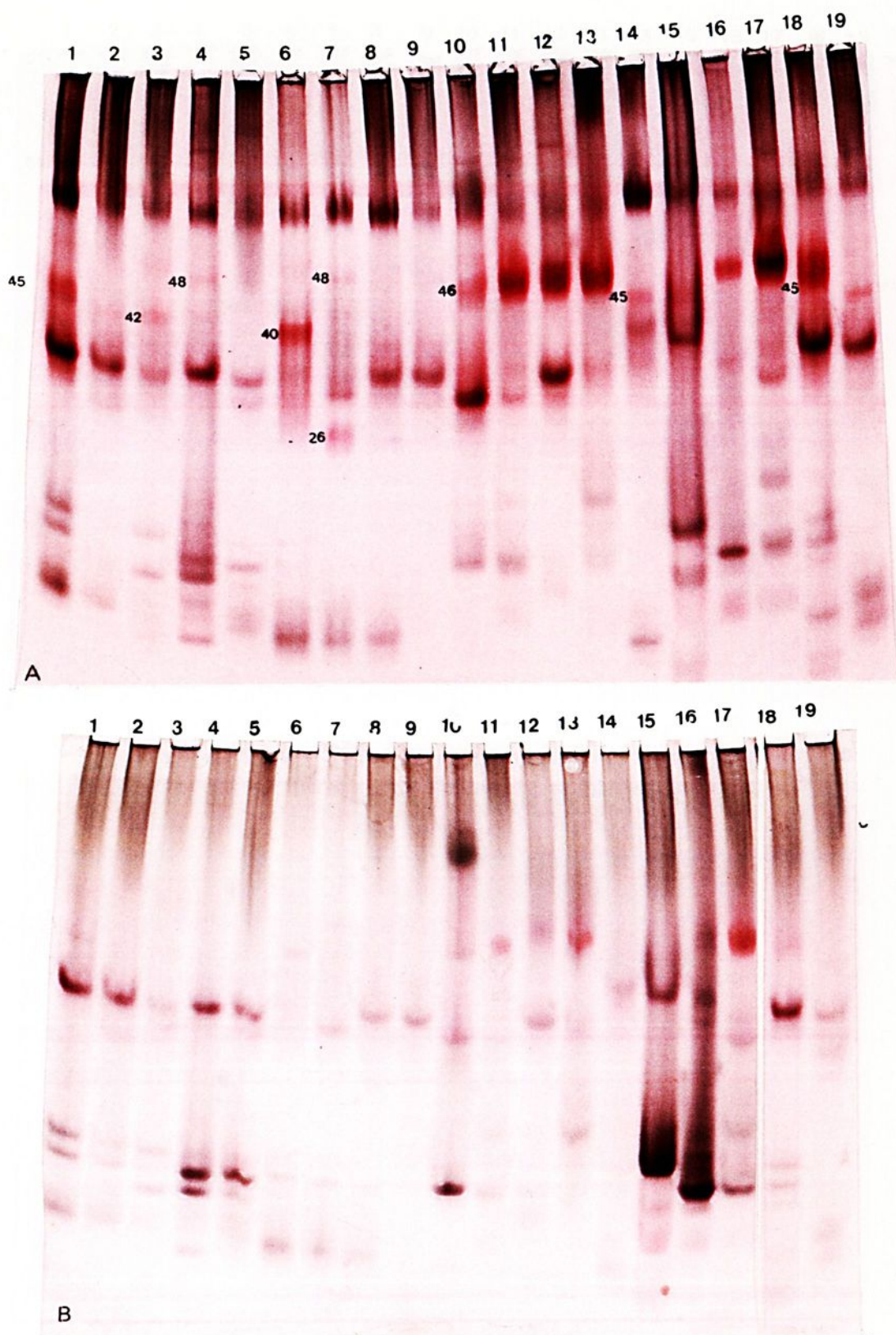


Figura 13. A e B. Efeito do malathion sobre as esterases. A. gel controle e B. gel tratado. Amostras (machos): 1- A95, 2- D71C1BM, 3- D40FM, 4- D63M, 5- D62C4BM, 6- D72M, 7- D72R2, 8- D73C5BM, 9- D73C12B, 10- A55, 11- B25D7, 12- B50Q3, 13- B25D7, 14- D69R2, 15- D69R5, 16- B20D2, 17- B25D7, 18- Buz e 19- D71C1BM. Nesta e nas demais figuras com inibidores estão numerados apenas as bandas que mostraram efeito dos mesmos.

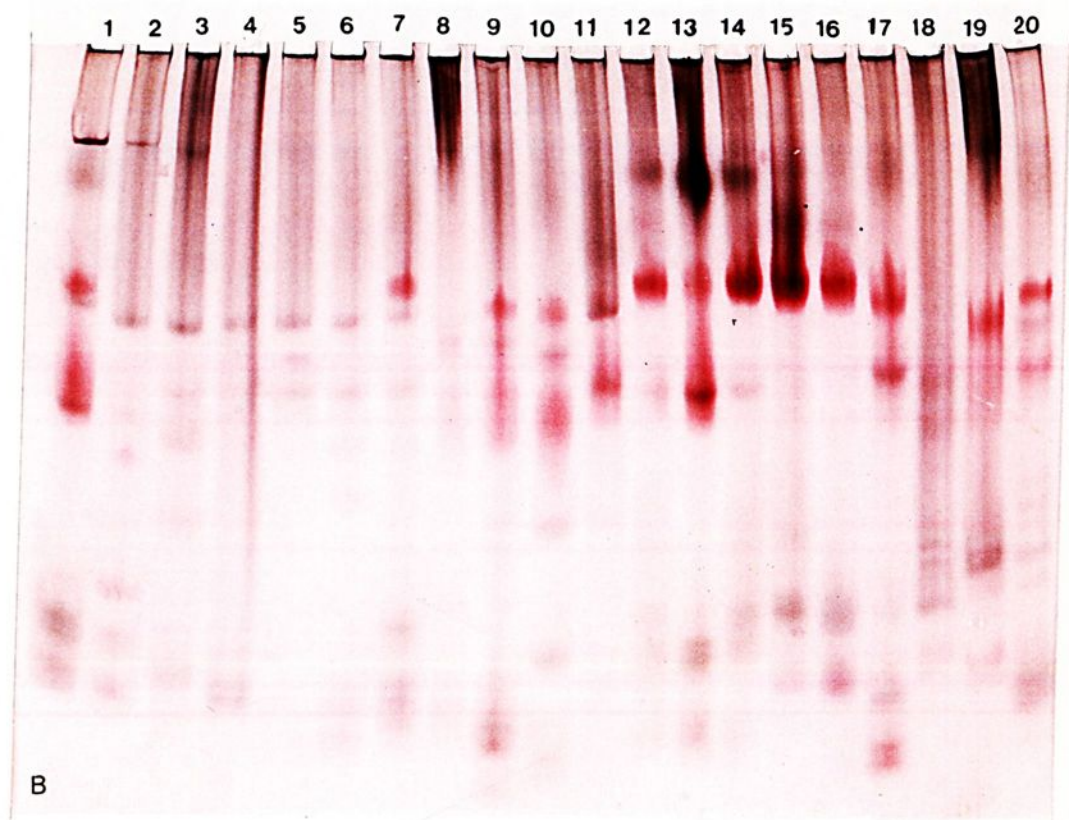
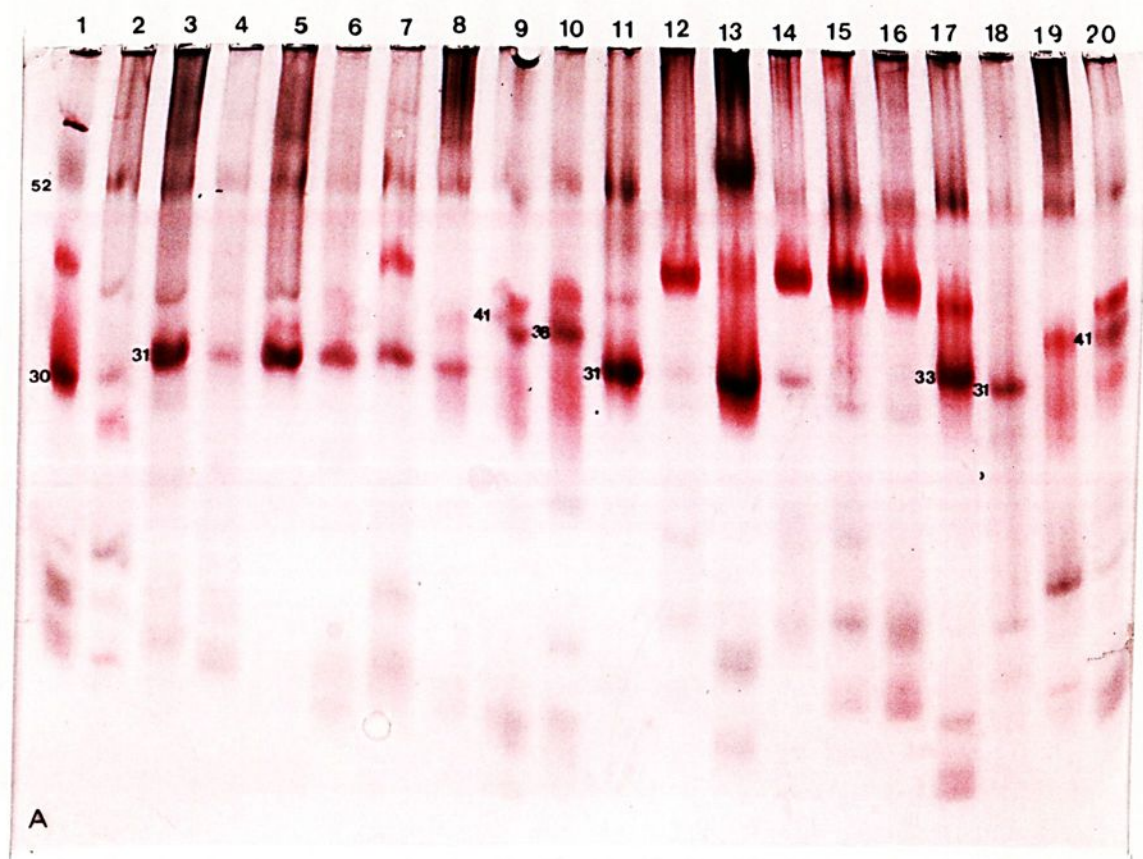


Figura 14. A e B. Efeito do sulfato de eserina sobre as esterases. A. gel controle e B. gel tratado. Amostras (machos): 1- B31D1, 2- D72R2, 3- D63M, 4- D62C4BM, 5- D73C12B, 6- D40FM, 7- B25D7, 8- D72M, 9- D69R2, 10- D69R5, 11- A95, 12- B25D7, 13- B50Q3, 14- B20D2, 15- B25D7, 16- B25D7, 17- Buz, 18- D63M, 19- D72M e 20- D69R2.

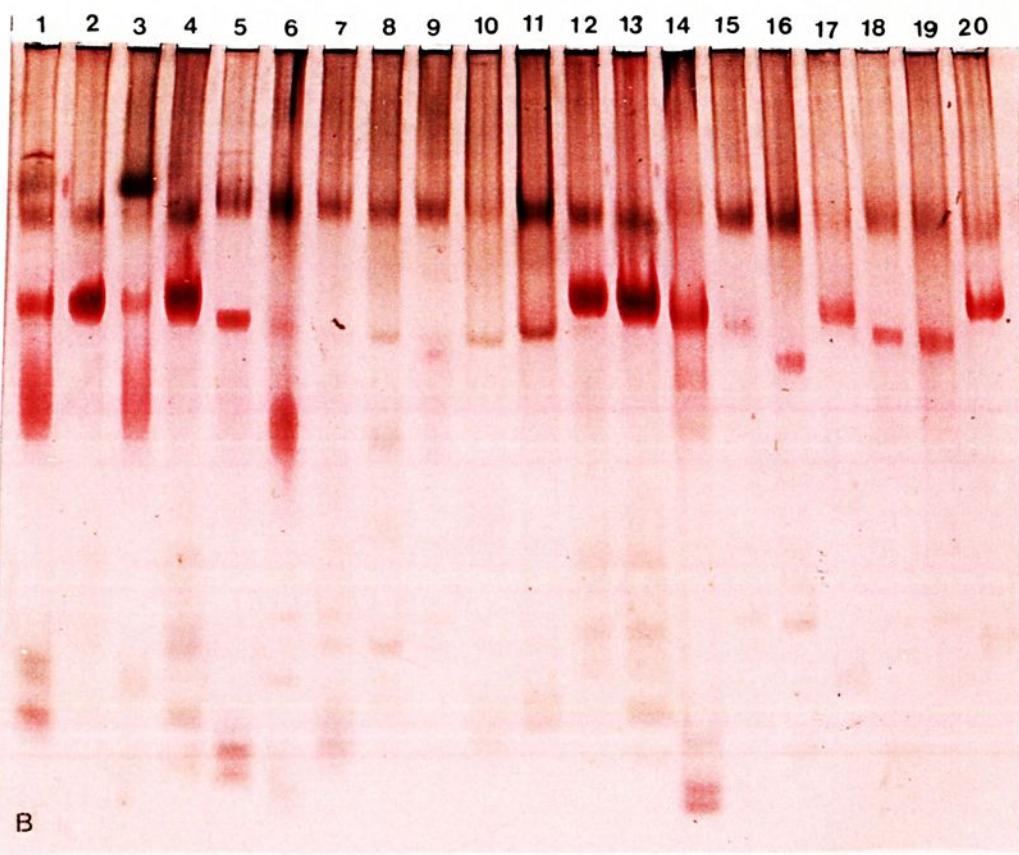
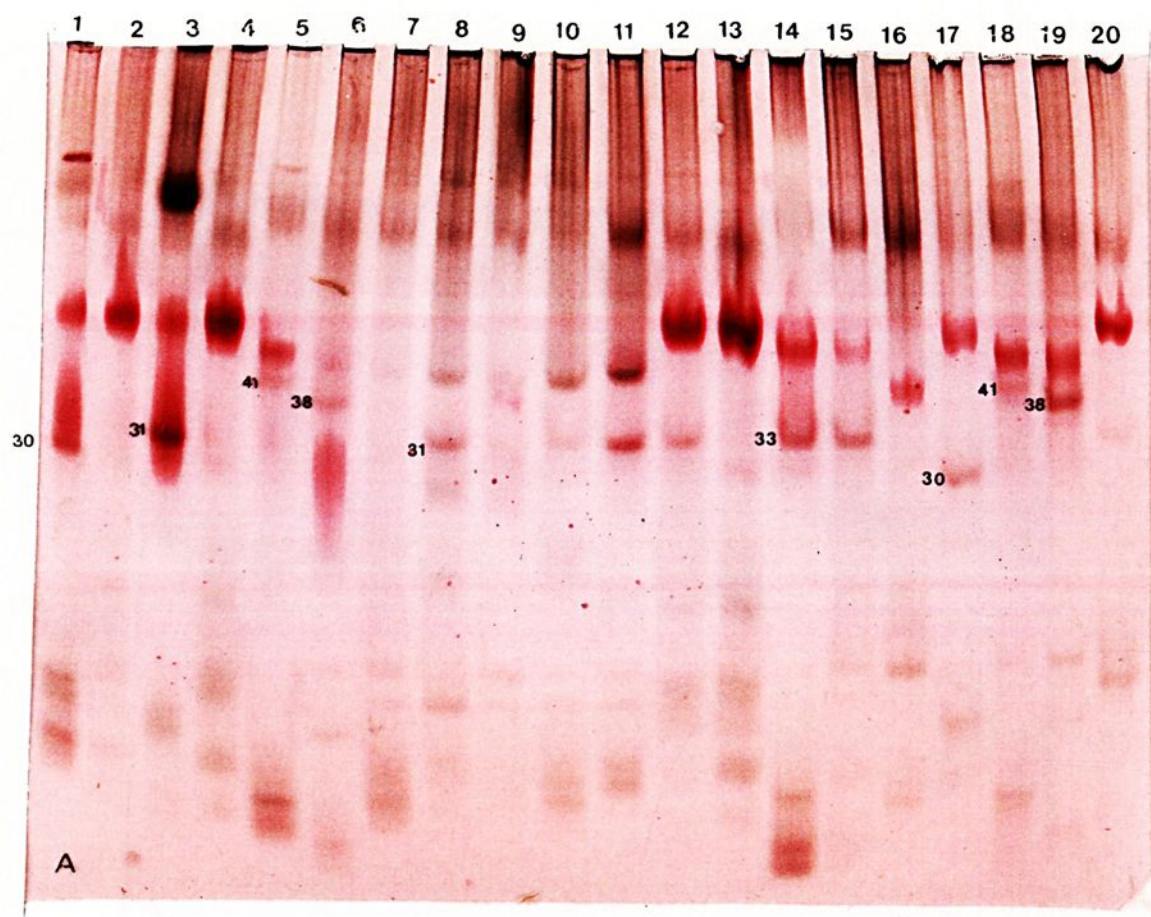


Figura 15. A e B. Efeito do pCMB sobre as esterases. A. gel controle e B. gel tratado. Amostras (machos): 1- B31D1, 2- B59Q1, 3- B50Q3, 4- B20D2, 5- D69R2, 6- D69R5, 7- D72R2, 8- D63M, 9- D72M, 10- D62C4BM, 11- A95, 12- B20D2, 13- B25D7, 14 e 15- Buz, 16- D72M, 17- B31D1, 18- D69R2, 19- D69R5 e 20- B20D2.

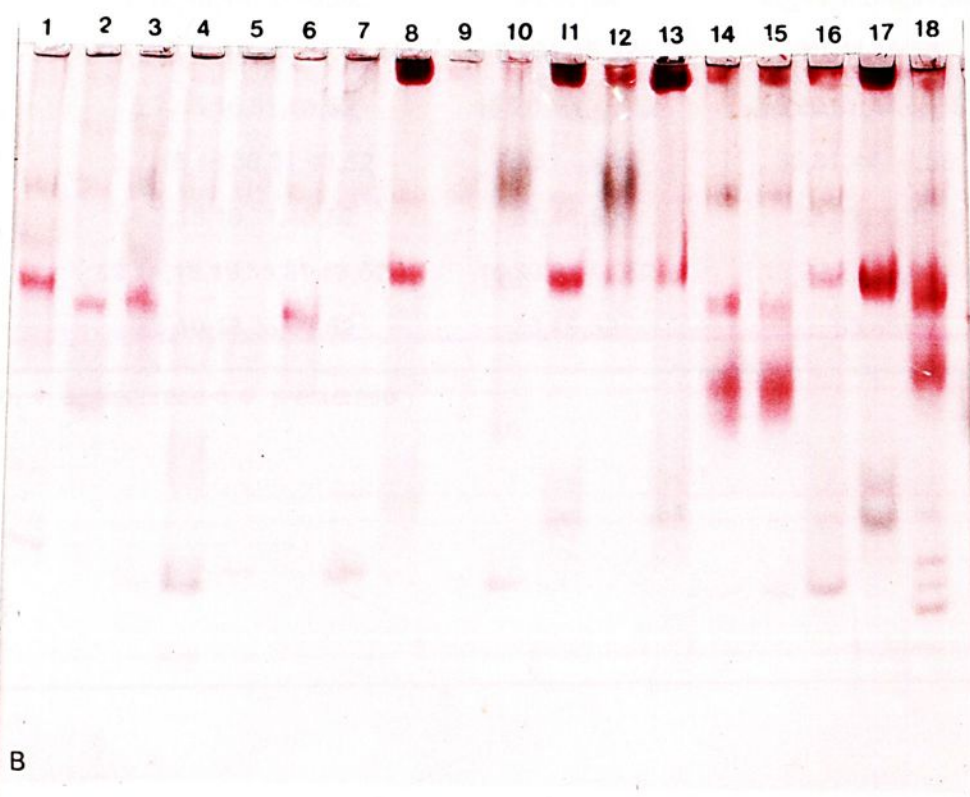
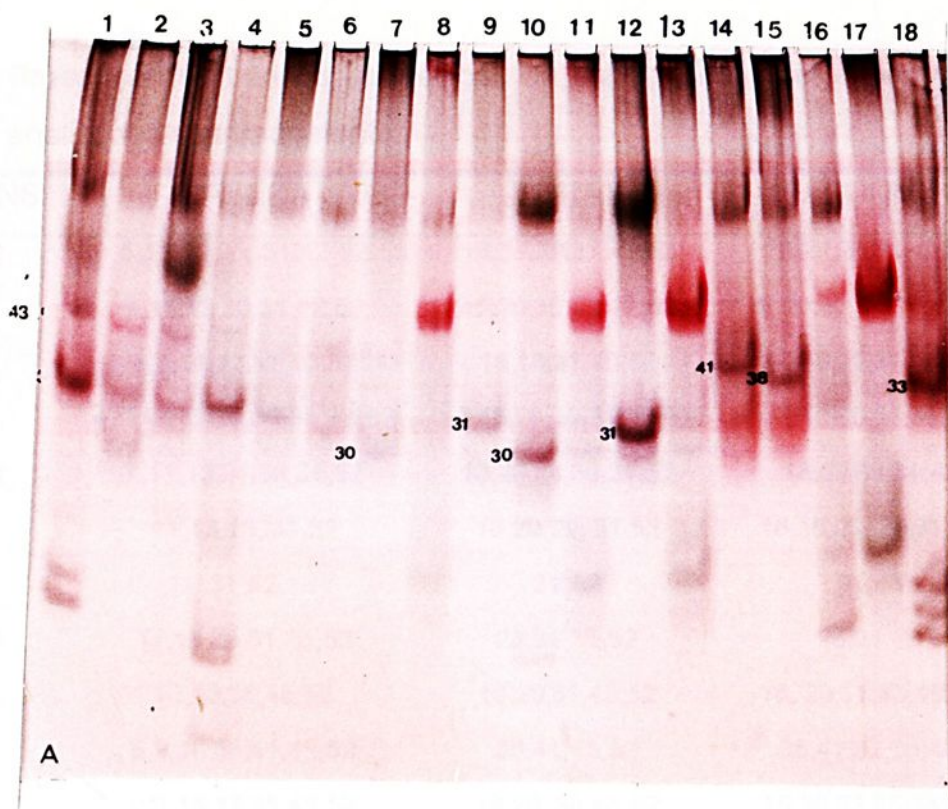


Figura 16. A e B. Efeito do PMSF sobre as esterases. A. gel controle e B. gel tratado. Amostras (machos): 1- A95, 2- D71C1BM, 3. D40FM, 4- D63M, 5- D62C4BM, 6- D72M, 7- D72R2, 8- B25D7, 9- D73C12B, 10- B31D1, 11- B25D7, 12- B50Q3, 13- B25D7, 14- D69R2, 15- D69R5, 16- B20D2, 17- B25D7 e 18- Buz.

Tabela 3. Presença das bandas esterásicas na cabeça, no tórax e no abdome, analisados separadamente.

LINHAGENS	CABEÇA	TÓRAX	ABDOME
D71C1BM	5,11,13,26, 31,42,52	16,26,29,31,42,52	16,29,28,31,42,43
D40FM	5,11,13,30,31,42,52	16,20,30,31,42,52	16,20,30,31,42,43,49
D72M	5,7,11,13,31,40,52	16,18,31,40,52	16,18,22,31,40,43
D72R2	4,7,11,13,26,30,31,33,52	15,18,26,30,31,33,52	15,18,30,31,33,43
D62C4BM	7,11,13,24,30,31,52	18,20,24,30,31,52	18,20,30,31,43
D63M	11,13,15, 31,52	18,20,29, 31,52	16,18,20, 29,31,43
D73C12B	31,52	31,52	31,43
D73C5BM	11,13,28,31,36,52	28,31,36,52	28,31,36
A95	12,13,31,45,52	18,20,31,45,52	18, 20,31,43,49,45
D69R2	5,9,10,38,41,45,52	38,41,45,52	38,41,32,35,45
D69R5	2,3,16,17,38,45,52	18,20, 38,45,52	18,20,32,35,38,45
B31D1	7,12,15,16,30,46,52	30,46,52	30,44,46,50,51,53
A55	4,5,7,12,15,16,30, 31,46,52	30,31,46,52	30,44,46,53
B50Q3	5,7,15,16,31,46,52	18,20, 31,46,52	18,20,31,44,46, 53
B59Q1	5,7,15,16,30,31,46,52	30,31,46,52	30,31,44,46,53,
B20D2	4,5,18,19,31,46,52	31,46,52	22,23,46,31,
B25D7	12,14,18,19,30,31,46,52	16,30,31,46,52	16,22,23,30,31,46
BUZ	2,3,10,13,33,45,52	33,45,52	33,45

♦ α -esterase, ♦ $\alpha\beta$ -esterase e ♦ β -esterase

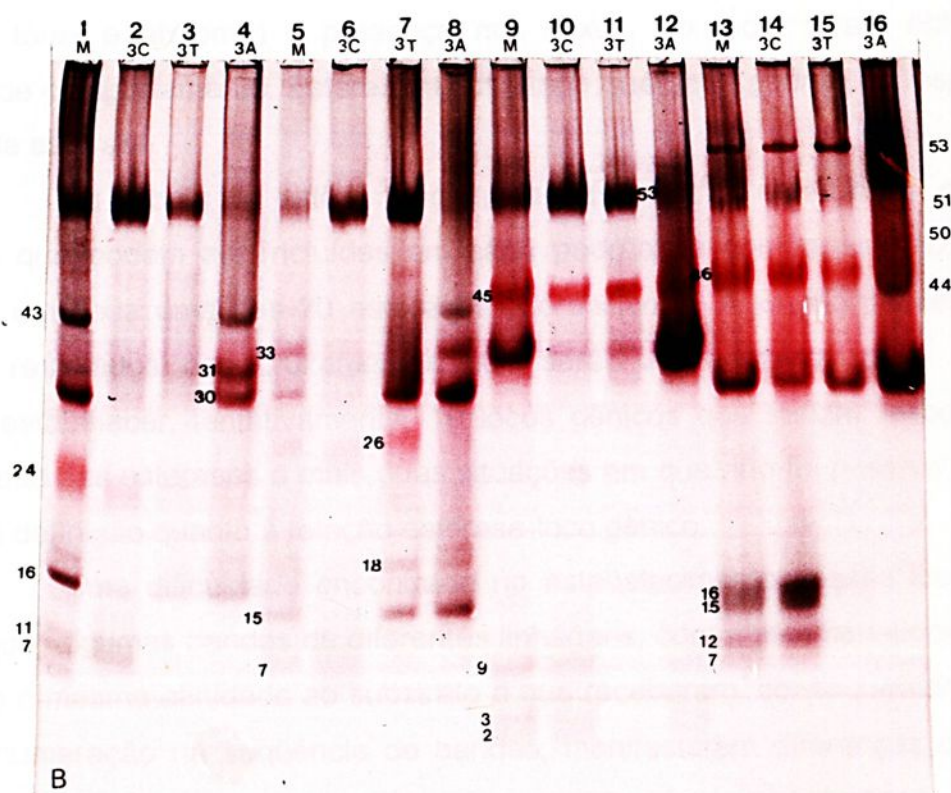
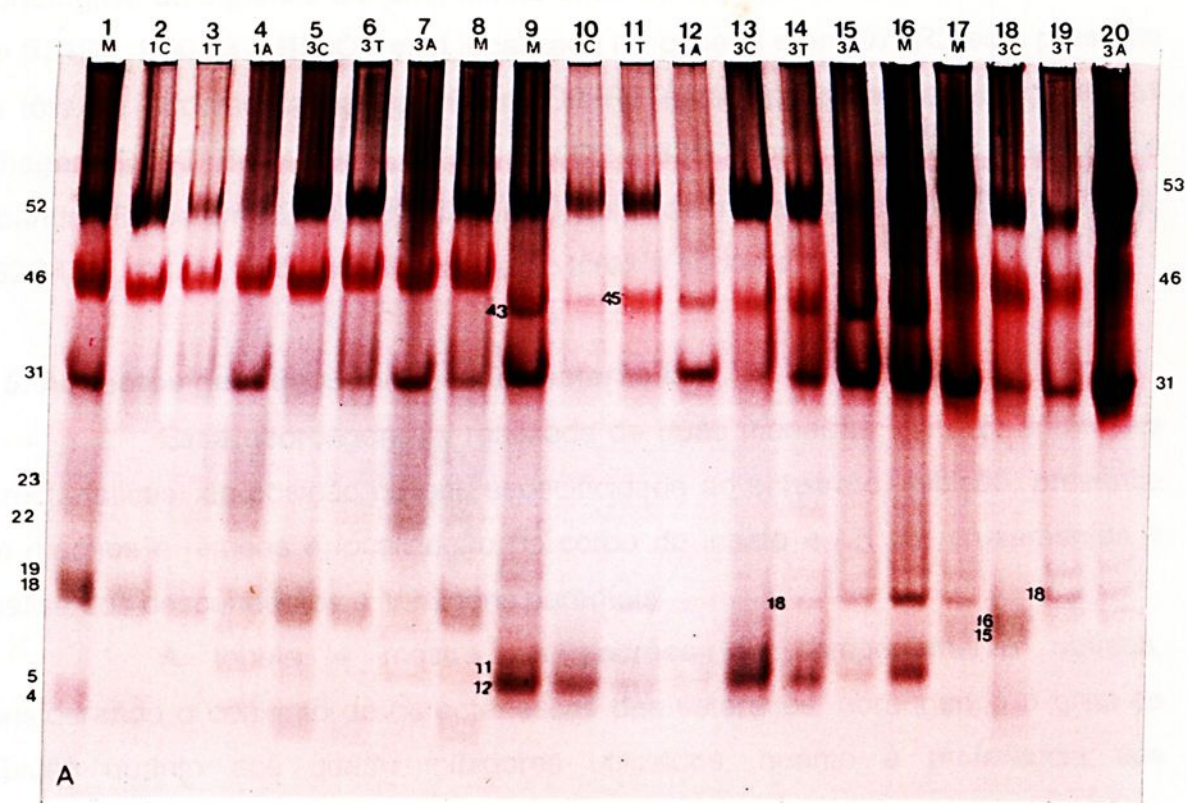


Figura 17. A e B. Esterases em diferentes partes do corpo das linhagens. A. 1 a 8- machos B20D2, 9 a 16- machos A95 e 17 a 20- machos B50Q3. B. 1 a 4- D62, 5 a 8- machos D72R2, 9 a 12- machos Buz e 13 a 16- machos B31D1. M = mosca inteira, C = cabeça, T = tórax e A = abdome.

as bandas 22, 23, 43, 44, 49 e 53, exclusivas do abdome. Entretanto, a localização morfológica, de algumas bandas, diferiu entre as linhagens, como a banda 15 que em B31D1, B50Q3 e B59Q1 está localizada na cabeça e em D72R2 está presente no tórax e abdome, a banda 16 em D69R5 está localizada na cabeça e nas linhagens D71C1BM, D40FM, D72M, B20D2 e B25D7 ocorre no tórax e abdome e a banda 18 que em B20D2, B25D7 está localizada na cabeça e em D72M, D72R2, D62C4BM, D63M, A95, D69R5 ocorre no tórax e abdome.

III.5. Aspectos genéticos das bandas esterásicas

Essa abordagem foi realizada de duas maneiras: (1) pela soma das características de posição no gel, especificidade ao substrato, inibição, presença em machos e fêmeas e localização no corpo do inseto e (2) por cruzamentos e análise dos descendentes e linhagens parentais.

A tabela 4 mostra os padrões de comportamento obtidos, considerando o conjunto de características das esterases, abrangendo o grau de inibição quanto aos quatro inibidores utilizados, quanto à preferência aos substratos α e β -naftil acetatos, quanto à localização nas três partes do corpo (cabeça, tórax e abdome) e presença nos sexos. Ao todo, foram obtidos 20 padrões de comportamento. Estaremos admitindo que cada padrão corresponde a um tipo de esterase.

Na tabela 5, estão relacionadas as bandas esterásicas de cada linhagem que podem ser incluídas em cada padrão de comportamento, isto é, incluídas em cada uma das 20 esterases diferenciadas. A junção desses dados com os resultados dos cruzamentos que serão apresentados mais adiante, permitiu estabelecer, tentativamente, 19 locos gênicos que seriam responsáveis pela síntese das esterases e mais duas situações em que não foi possível chegar-se a uma definição quanto à relação esterase-loco gênico.

Uma dificuldade encontrada no estabelecimento desses locos foi o fato de que, algumas bandas de diferentes linhagens, com a mesma velocidade de migração e mesma afinidade ao substrato e que receberam, conseqüentemente, a mesma numeração na seqüência de bandas, manifestaram diferenças quanto a outra característica analisada, sugerindo tratar-se de diferentes esterases. Essa é

Tabela 4. Padrões de comportamento obtidos considerando o conjunto de características das esterases.

ESTERASES	INIBIDORES				PREFERÊNCIA AO SUBSTRATO	PRESENÇA NAS PARTES DO CORPO	PRESENÇA NOS SEXOS
	MALATHION	ESERINA	PCMB	PMSF			
20	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	α	n. d.	M, F
19	++	n. d.	n. d.	--	α	n. d.	M
18	++	--	n. d.	--	α	n. d.	M, F
17	++	--	--	--	α	n. d.	M, F
16	--	--	--	--	α	A	M
15	+++	+++	--	--	α	T e C	M, F
14	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	β	A	M
13	++	+++	--	--	α	n. d.	M, F
12	--	--	--	+++	α	A	M
11	+++	--	--	--	β	C, T e A	M, F
10	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	α	n. d.	M, F
9	--	--	--	--	β	A	M
8	--	+	+++	+++	$\alpha\beta$	T e A	M, F
7	--	--	--	--	α	T e A	M
6	++	--	n. d.	n. d.	β	C e T	M, F
5	--	--	--	--	α	A	M
4	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	α	n. d.	M, F
3	-	--	--	--	α	T e A	M, F
2	--	--	--	--	α	C	M, F
1	--	--	--	--	$\alpha\beta$	C	M, F

n. d. = não determinado; +, ++, +++ = graus de inibição em ordem crescente; -- = ausência de inibição; α = α -naftil acetato; β = β -naftil acetato; C= cabeça; T= tórax; A= abdome; M= macho; F= fêmea;

Tabela 5. Agrupamento das bandas esterásicas das linhagens, para efeito de análise genética, com base nas características referidas na tabela 4.

EST	Loco	D71	D40	D72A	D72B	D62	D63	D73A	D73B	A95	D69A	D69B	B31	A55	B50	B59	B20	B25	BUZ
20	Est-20	59	---	59;61	59;61	---	59;61	---	59	59	59;61	59	59	59	59;61	59;61	59;61	59;61	---
19	Est-19	58	58	58	58	58	---	58	58	58	58	---	---	---	58	58	58	58	58
18	Est-18	55;56	55;56	55;56	55;56	55	55	---	---	55;56	---	---	55;56	---	---	---	55;56	55	55;56
17	Est-17	---	57	---	57	57	57	57	57	57	57	---	57;54	---	57	---	57;54	54	---
16	Est-16	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	53	53	53	53	---	---	---
15	Est-15	52	52	52	52	52	52	52	52	52	52	52	52	52	52	52	52	52	52
14B	Est-14B	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	51	---	---	---	---	---	---
14A	Est-14A	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	50	---	---	50	---	---	---
13	Est-13	48	48;49	48	48	48	48	48	48	49	49	49	---	---	---	---	---	---	---
12	Est-12	43	43	43	43	43	43	43;44	43	43	---	---	44	44	44	44	---	---	---
11	Est-11	40;42	42	40;42	---	---	---	36;39;40	36	45	45	45	46	46	46	46	46	46	45
10	Est-10	---	---	---	---	---	---	---	---	37	---	---	---	34	34	---	34	34	---
9	Est-9	---	---	---	---	---	---	---	---	---	32;35	32;35	32	32	32	---	---	---	32
8	Est-8	28;31	30;31	30;31	30;31;33	30;31	31	31	28;31	30;31	38;41	38	30	30;31	30;31	30;31	30;31	31	33
7	Est-7	29	---	29	---	---	29	---	---	---	---	---	29	---	---	---	---	---	---
6	Est-6	26	---	24	26	24	26	---	---	---	26	---	---	---	---	---	---	---	---
5	Est-5	---	---	22;23	---	---	22;23	23	---	22;23	---	---	---	---	---	---	22;23	22;23	---
4	Est-4	---	---	---	---	---	---	---	---	---	22;23;25;27	23	---	---	---	22	---	21	21;22;23;25
3	Est-3	16;20	16;20	16;18	15;18;20	16;18;20	16;18;20	16;18	16;18;20	16;18;20	16;18;20	20	20	20	18;20	18;20	16;20	16;20	6;16;19
2	?	11;13	11;13	11;13	---	11;13	15;11;13	---	11;13	13	9;10;13	16;17	15;16	15;16	15;16	15;16	18;19	18;19	10;13
1	?	4;5;7	5	5;7	4;7;12	4;5;7	4;5;7	---	7	12;5	2;3;5	2;3	4;5;7;12	4;5;7;12	5;7	5;7	4;5;12;14	12;14	2;3

a explicação para a presença de bandas com o mesmo número fazendo parte de esterases diferentes na tabela 5.

As duas situações, referidas anteriormente, em que houve maior dificuldade para definir a relação esterase-loco gênico são as das esterases 1 e 2.

A EST-1 compõe-se das bandas $\alpha\beta$ de migração mais rápida (2, 3, 4, 5, 7, 12 e 14). Está presente em todas as linhagens, exceto em D73C12B. Essa enzima não foi inibida por nenhum dos compostos utilizados e foi predominante na cabeça. As bandas 2 e 3 caracterizam-se por ocorrerem sempre juntas em um mesmo indivíduo, de modo que em D69R2, 32% de indivíduos apresentaram as bandas 2 e 3, e em D69R5, 95%. Nesta última linhagem, 2% das moscas apresentaram unicamente a banda 2 e 3% nenhuma das duas. Em D69R2, nenhuma das bandas ocorreu isolada.

A EST-2 é representada pelas bandas α 11, 13 e 15 (esta última somente em D63M), nas linhagens de *D. seriema*, 9, 10, 13, 15, 16 e 17 em *D. serido*, 18 e 19 em *D. koepferae* e 10 e 13 em *D. buzzatii*. Essa enzima não foi observada em D73C12B e em D72R2 e caracterizou-se por não ser inibida por nenhum dos compostos químicos utilizados e ser predominante na cabeça. Essas bandas ocorreram com frequências bastante altas na maioria das linhagens. Essas frequências elevadas indicam que essas bandas dificilmente podem ser consideradas produtos de alelos de um mesmo loco.

A EST-3 difere da esterase-2 somente pela localização, no tórax e abdome. Corresponde às bandas α 15, 16, 18 e 20 em *D. seriema*, 18 e 20 em *D. serido*, 16 e 20 em *D. koepferae* e 6, 16 e 19 em *D. buzzatii*, e que estão sendo consideradas produtos de alelos. Esse loco foi comum a todas as linhagens, diferindo apenas na frequência dos alelos.

A EST-4 corresponde às bandas α 21, 22, 23, 25 e 27, que ocorreram nas linhagens D69R2, D69R5, B25D7 e Buz. Essas bandas apresentaram, predominantemente, uma coloração tênue. Elas não foram testadas quanto aos inibidores e não foi identificado seu local de atividade.

A EST-5 corresponde às bandas 22 e 23 que ocorreram nas linhagens D72M, D63M, D73C12B (apenas a 23), A95, B20D2 e B25D7. Essa enzima é uma α -esterase que difere da EST-4 por ser específica de machos.

Nenhum dos compostos utilizados alterou a intensidade de coloração dessa enzima e o seu local de atividade está localizado no abdome.

A EST-6 refere-se a uma β -esterase correspondente às bandas 24 em D72M, D62C4BM e 26 em D71C1BM, D72R2, D63M e D69R2. Essas bandas apresentam um aspecto difuso e uma baixa frequência (3% a 16%). Essa enzima foi inibida pelo malathion e seu local de atividade encontra-se na cabeça e no tórax.

A EST-7 é uma α -esterase que corresponde à banda 29, sendo a única forma alélica, presente em D71C1BM, D72M, D63M e B31D1. Caracterizou-se por não ser inibida por nenhum dos compostos utilizados, ser específica de machos e ter seu local de atividade no abdome.

A EST-8 refere-se às $\alpha\beta$ -esterases de migração central no gel, bandas 28, 30, 31, 33, 38 e 41, que devem corresponder a seis alelos. Essa esterase esteve presente em todas as linhagens, com frequência bastante elevada. Essa enzima só não foi inibida pelo malathion e sua atividade foi detectada em todas as partes do corpo, decrescendo em intensidade de coloração na ordem abdome > tórax > cabeça.

A EST-9 apresenta duas bandas, 32 e 35, que devem corresponder a dois alelos. Essas bandas apresentaram um aspecto difuso, assim como a EST-6, e também uma sobreposição de bandas, dificultando sua detecção. É uma β -esterase, específica de macho, não inibida por nenhum dos inibidores utilizados e detectada somente no abdome, diferindo nesses dois aspectos da EST-6.

A EST-10 refere-se às bandas α 34 em A55, B50Q3, B20D2 e B25D7 e 37 em A95, não detectadas no presente trabalho, mas por Lapenta *et al.* (1995). Essas bandas têm em comum, além da proximidade no gel, uma coloração tênue. A banda 34, em B20D2, apresentou uma frequência de 53%; nas demais linhagens, a frequência dessas bandas foi inferior a 15%. Esse fato, somado à fraca coloração, dificultou sua caracterização bioquímica e localização da parte do corpo onde essa enzima está presente.

A EST-11 refere-se a uma β -esterase, não detectada em D72R2, D62C4BM e D63M, correspondendo a seis alelos (bandas 36, 39, 40, 42, 45 e 46), da mesma forma que as esterases 8 e 3. As quatro espécies estudadas apresentaram essa esterase em frequência elevada na maioria das linhagens.

Essa enzima foi inibida somente pelo malathion, estando presente nas três partes do corpo da mosca.

A EST-12 refere-se a uma α -esterase, presente unicamente em machos, correspondente às bandas 43 e 44. A banda 43 ocorreu em todas as linhagens de *D. seriema* e a banda 44 nas linhagens de *D. serido*, exceto D69R2 e D69R5, e em *D. seriema*, na linhagem D73C12B, única com as duas bandas. *Drosophila koepferae* e *D. buzzatii* não apresentaram essa esterase. O local de atividade dessa enzima está no abdome. Essa enzima foi inibida unicamente pelo PMSF.

A EST-13 apresenta as bandas 48 e 49, correspondendo a duas formas alélicas. O alelo 48 ocorreu em todas as linhagens de *D. seriema*, exceto em A95 e o alelo 49 ocorreu em D40FM (única linhagem com os dois alelos), A95, D69R2 e D69R5. Essa esterase caracteriza-se por apresentar uma coloração tênue e ser inibida pelo malathion e pela eserina.

A EST-14 corresponde às bandas 50 e 51, em B31D1, e 50, em B59Q1, e refere-se a uma β -esterase macho-específica, cujo local de atividade encontra-se no abdome. Essas bandas também foram detectadas apenas nas linhagens estudadas por Lapenta *et al.* (1995). Esses autores sugeriram que dois locos gênicos distintos seriam responsáveis por essas bandas, uma vez que híbridos entre B31D1 e B20D2 (linhagem na qual essa enzima está ausente) apresentaram as duas bandas. Esses dois locos foram denominados por Est-14A e Est-14B, no presente trabalho.

A EST-15 corresponde à banda 52 e esteve presente em 100% das moscas analisadas, em todas as linhagens. Um único loco monomórfico, Est-15, parece determinar essa esterase. Essa enzima é uma α -esterase, inibida pela eserina e pelo malathion. Os principais sítios de atividade encontram-se no tórax e, mais intensamente, na cabeça.

A EST-16 refere-se a uma α -esterase específica de macho, correspondente à banda 53. Essa banda foi detectada por Lapenta *et al.* (1995), nas linhagens B31D1, A55, B50Q3 e B59Q1. A atividade dessa enzima foi detectada no abdome e não foi inibida por nenhum dos compostos utilizados.

A EST-17 refere-se às bandas 54 e 57 que se apresentam no gel de modo característico, sendo bastante delgadas, assemelhando-se a um traço. Essa

α -esterase só foi inibida pelo malathion. Essas duas bandas correspondem a dois alelos de um mesmo loco. O alelo 54 esteve presente em B31D1, B20D2 e B25D7 e o alelo 57 em D40FM, D72R2, D62C4BM, D63M, D73C12B, D73C5BM, A95, D69R2, B31D1, B50Q3, B20D2.

A EST-18, correspondente às bandas 55 e 56, foi detectada nas linhagens de *D. seriema* (exceto em D73C12B e D73C5BM), em B31D1 de *D. serido*, nas duas linhagens de *D. koepferae* e em Buz, de *D. buzzatii*. Essa enzima é a uma α -esterase que apresenta uma coloração muito clara, o que dificultou sua detecção anterior. Com relação aos inibidores, só não foi inibida pelo malathion e não foi testada com o PCMB.

A EST-19 refere-se a uma α -esterase específica de machos, determinada por um único alelo, correspondente à banda 58. Essa esterase está presente em *D. seriema* (exceto em D63M), em *D. serido*, nas linhagens B50Q3 e B59Q1, nas duas linhagens de *D. koepferae* e na linhagem Buz de *D. buzzatii*. Essa banda apresentou pouca coloração, o que dificultou sua detecção. Com relação aos inibidores, ela foi testada com o malathion e o PMSF, sendo inibida pelo malathion.

A EST-20 refere-se às bandas α de menor migração no gel que são as bandas 59 e 61, que devem corresponder a alelos de um mesmo loco. Essa esterase ocorreu em *D. seriema* (exceto em D40FM, D62C4BM e D73C12B), em todas as linhagens de *D. serido* e em *D. koepferae*. Difere da EST-19 pelo fato de ocorrer em machos e fêmeas, mas, em comum, também apresenta uma fraca coloração.

III.6. Padrões esterásicos dos híbridos

No presente trabalho foram analisados híbridos, obtidos em cruzamentos em massa, envolvendo as linhagens A95 e D72M, ambas classificadas como *D. seriema*, B20D2, classificada como *D. koepferae*, e B31D1, classificada como *D. serido*. Foram obtidos descendentes nos seguintes cruzamentos: fêmeas B20D2 X machos D72M (figura 18), fêmeas D72M X machos A95 (figura 19), fêmeas A95 X machos D72M (figura 19), fêmeas A95 X machos B31D1 (figura 20) e fêmeas B31D1 X machos A95 (figura 20). Na figura 21 são

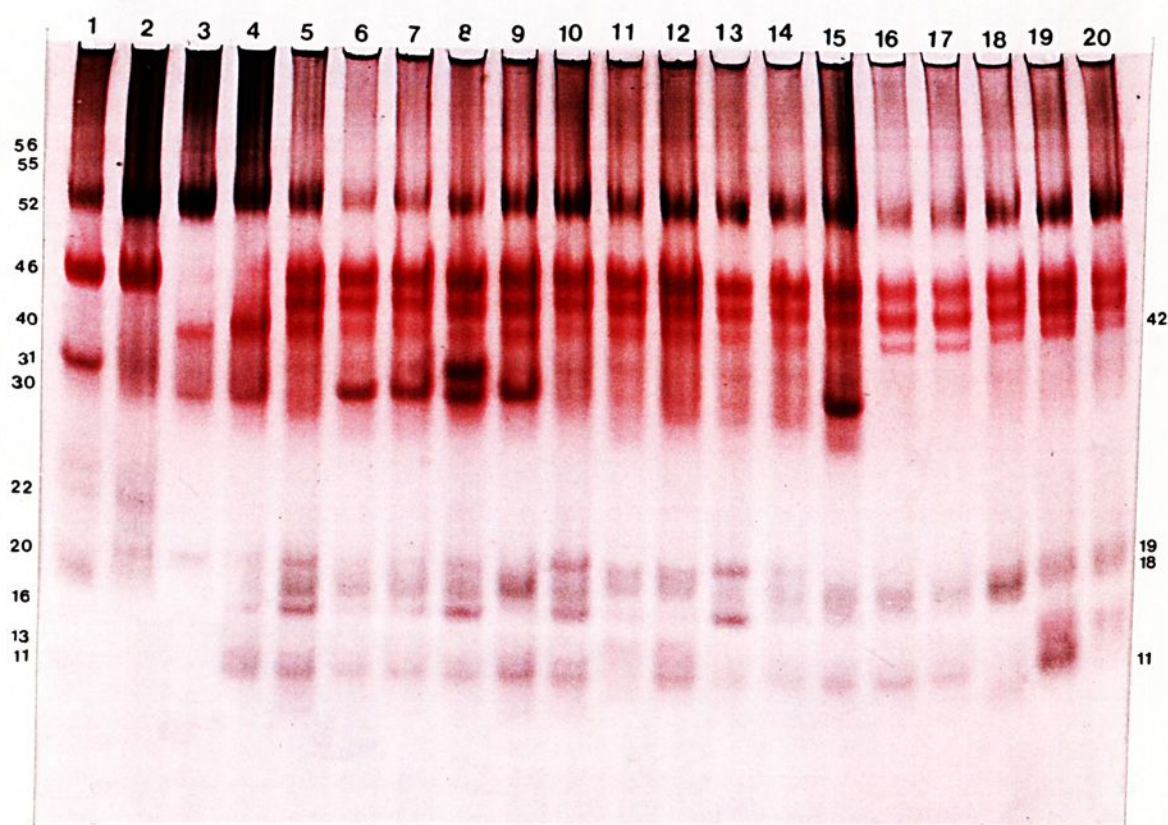


Figura 18. Esterases em híbridos obtidos em cruzamentos entre fêmeas B20D2 e machos D72M. 1 e 2- machos B20D2, 3 e 4- machos D72M, 5 a 15- machos híbridos e de 16 a 20- fêmeas híbridas.

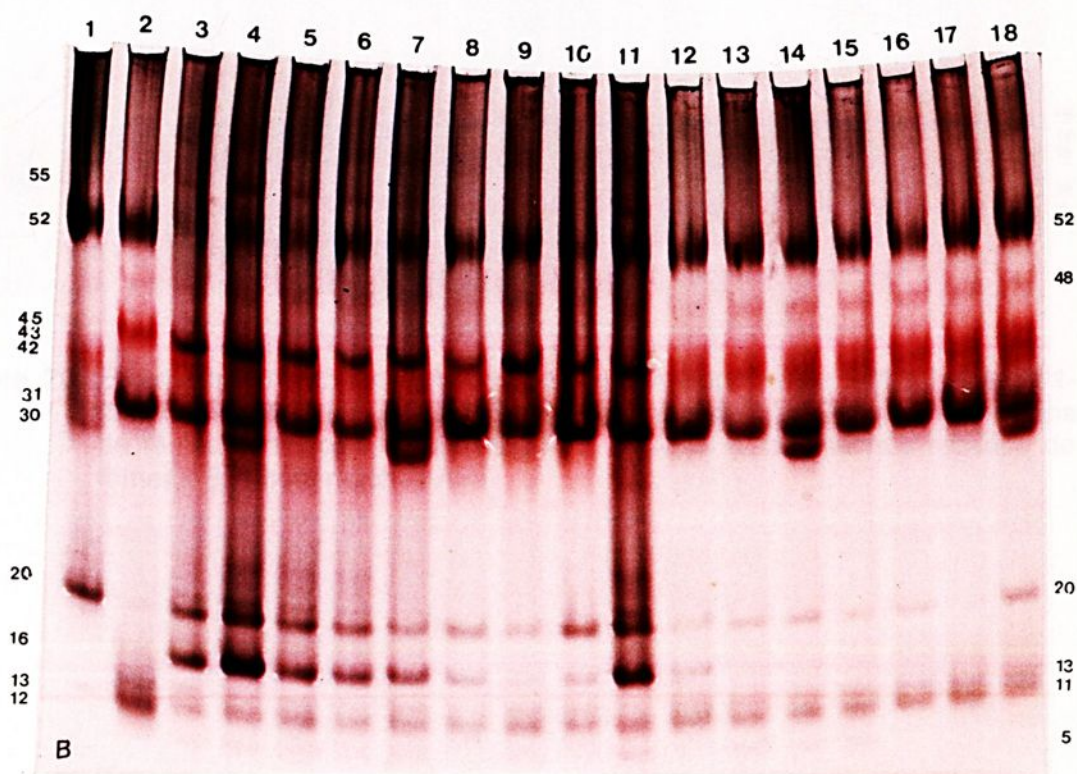
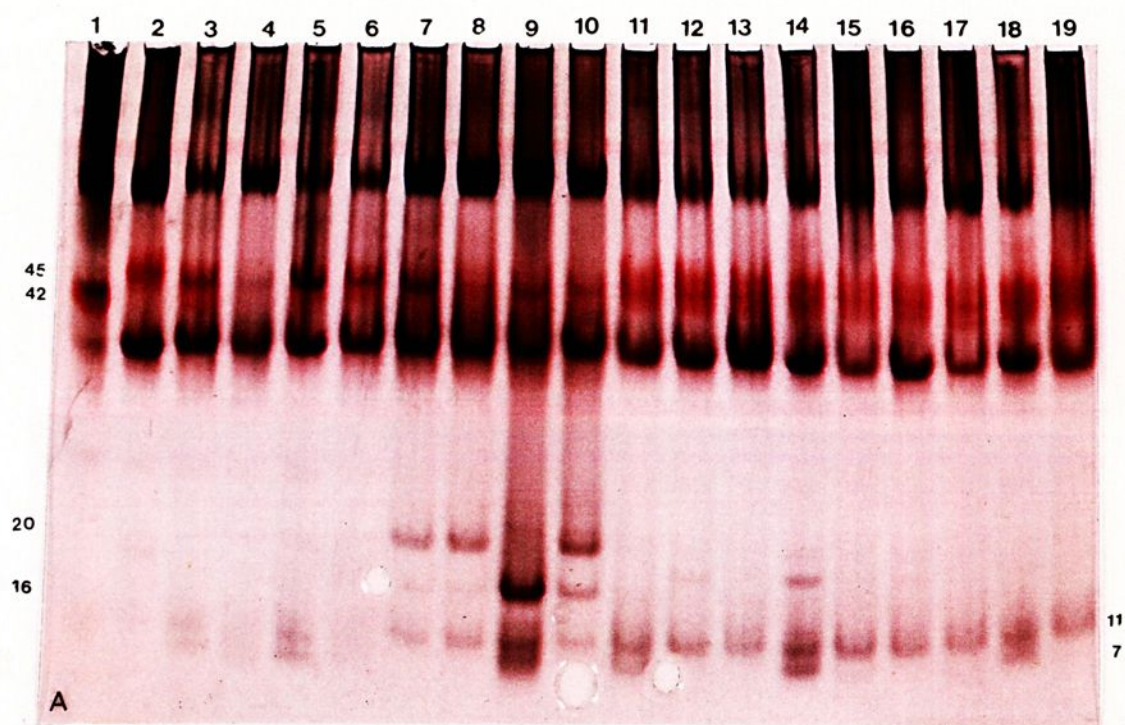


Figura 19. A e B. Esterases em híbridos obtidos em cruzamentos entre A95 e D72M. A. híbridos fêmeas D72M com machos A95. 1- macho D72M, 2- fêmea A95, 3 a 10- machos híbridos e de 11 a 19 fêmeas híbridas. B. híbridos fêmeas A95 com machos D72M. 1- macho D72M, 2- fêmea A95, 3 a 10- machos híbridos e de 11 a 18- fêmeas híbridas.

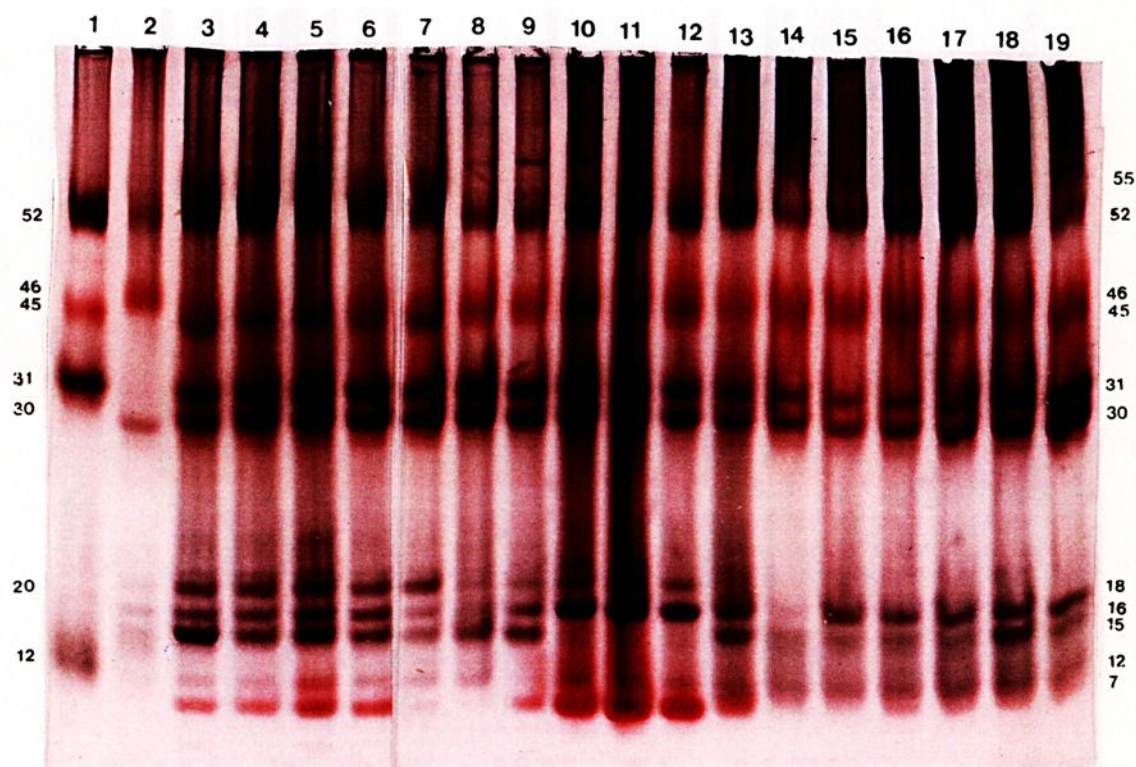


Figura 20. Esterases em híbridos obtidos em cruzamentos entre B31D1 e A95. 1- fêmea A95, 2- fêmea B31D1, 3 a 7- machos e de 8 a 12- fêmeas, híbridos de fêmeas A95 com machos B31D1, e de 13 a 19- machos híbridos de fêmeas B31 com machos A95.

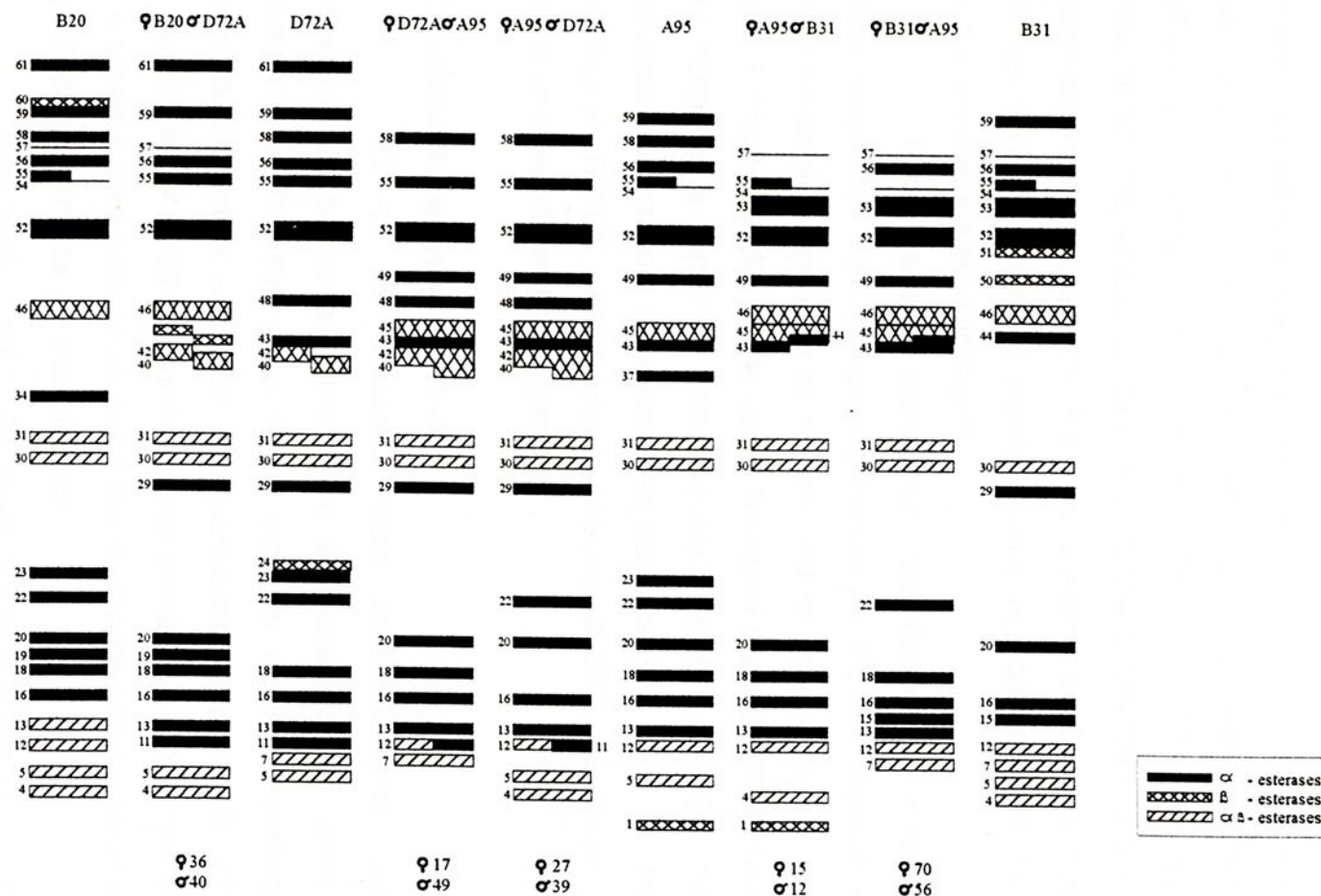


FIGURA 21. Zimograma representativo dos padrões de esterases dos híbridos e das linhagens parentais. O número abaixo dos padrões indicam os números de moscas analisadas.

mostrados os padrões obtidos para esses híbridos em comparação com as espécies parentais.

Em linhas gerais, os híbridos apresentaram um padrão de esterases que é uma soma dos padrões encontrados nos adultos das duas espécies parentais. A ausência de algumas bandas nos híbridos pode ser explicada pela sua baixa frequência nas linhagens parentais, como por exemplo as bandas 59 e 61 (EST-20) nos híbridos entre A95 e D72M. Em D72M, as bandas 59 e 61 apresentaram frequências de 39 e 26%, respectivamente e, em A95, a banda 59 apresentou frequência de 11%. A EST-6, presente em 3% das moscas em D72M, pode ser considerada outro exemplo, uma vez que ela não foi detectada nos híbridos envolvendo essa linhagem.

Foram também observadas, nos híbridos, as ausências de algumas bandas freqüentes nas linhagens parentais. A EST-12 (bandas 43 e 44), uma enzima freqüente, específica de macho, não foi observada nos híbridos de fêmea B20D2 X macho D72M, sendo que a linhagem parental D72M apresentou o alelo correspondente à banda 43 com frequência de 82%. As EST-14A e EST-14B, específicas de machos, representadas pelas bandas 50 e 51, respectivamente, presentes em B31D1, ambas com frequência de 36%, não foram detectadas nos híbridos envolvendo essa linhagem.

III.7. Análise da isoenzima EST-11

EST-11 foi analisada mais detalhadamente, quanto ao seu comportamento, por cruzamentos intra e interespecíficos, entre as linhagens portadoras de diferentes alelos desse loco. As linhagens utilizadas para esses cruzamentos foram as seguintes: A95 (portadora da banda 45), D72M (portadora das bandas 40 e 42), B20D2 (portadora da banda 46), B31D1 (portadora da banda 46). A tabela 6 apresenta os cruzamentos realizados com os genótipos parentais e os genótipos esperados para os híbridos.

Nas duas direções de cruzamentos envolvendo as linhagens de *D. seriema* A95 e D72M (cruzamento intraespecífico), os híbridos apresentaram as bandas parentais 45 e 40 ou 45 e 42, conforme esperado, sem dominância (figura 19).

Tabela 6. Cruzamentos realizados para análise da EST-11, com os fenótipos esperados e observados. Entre parêntesis, na coluna de cruzamentos, estão os alelos presentes nas linhagens parentais. F= fêmea e M= macho.

Cruzamentos		Fenótipos	
F	M	Esperados	Observados
A95 (45)	D72M (40,42)	45/40; 45/42	45/40; 45/42
D72M (40,42)	A95 (45)	40/45; 42/45	40/45; 42/45
B20D2 (46)	D72M (40,42)	46/40; 46/42	46/40; 46/42
A95 (45)	B31D1(46)	45/46	45/46
B31D1(46)	A95 (45)	45/46	45/46

Nos cruzamentos entre as linhagens B20D2 e D72M, os híbridos interespecíficos apresentaram um padrão de três bandas: as parentais 46 e 40 ou 46 e 42, e uma banda intermediária entre elas, indicando tratar-se de uma enzima dimérica (figura 18).

Nas duas direções dos cruzamentos interespecíficos, entre as linhagens A95 e B31D1, os híbridos, em F1, apresentaram as bandas parentais 45 e 46, indicando não haver dominância entre os alelos (figura 20).

Uma observação preliminar dos híbridos entre as linhagens A95 e B20D2 foi realizada por Lapenta (1992). Segundo essa autora, os híbridos do cruzamento fêmeas A95 com machos B20D2 apresentaram as duas bandas parentais 45 e 46, respectivamente; e os híbridos da direção recíproca pareciam apresentar somente a banda 46, proveniente da fêmea parental B20D2 (figura 22). No presente trabalho, com o objetivo de confirmar a supressão dessa banda, foi realizado um estudo mais amplo, envolvendo duas séries de retrocruzamentos de híbridos F1, uma série para cada direção (figuras 23 e 24). Em uma primeira etapa, esses híbridos F1 (FAMB e FBMA) foram retrocruzados, em massa, com as duas linhagens parentais, separadamente, e, em uma segunda etapa, os descendentes F2 desses retrocruzamentos, foram retrocruzados novamente com as linhagens parentais, em massa e por casal.

Os resultados desses retrocruzamentos constam nas tabelas 7 e 8. Os híbridos, nas duas direções de cruzamentos (FAMB e FBMA), quando retrocruzados com a linhagem parental A95 apresentaram, além dos fenótipos esperados (somente a banda 45 e com as bandas 45 e 46), o fenótipo com somente a banda 46 (figura 25). Quando esses descendentes foram retrocruzados novamente com a linhagem parental A95, tanto por cruzamentos em massa (figura 25) quanto por casal (figura 26), o fenótipo 46 também foi observado, além dos fenótipos esperados. Já, quando esses descendentes foram retrocruzados com B20D2, nos cruzamentos em massa e por casal, os fenótipos 45/46 e 46 foram verificados, de acordo com o esperado.

Os retrocruzamentos dos híbridos (FAMB e FBMA) com a linhagem B20D2 apresentaram os fenótipos 45/46 e 46, como esperado (figura 27). Entretanto, quando os descendentes desses retrocruzamentos foram retrocruzados com a linhagem A95, tanto por cruzamentos em massa, quanto por cruzamentos



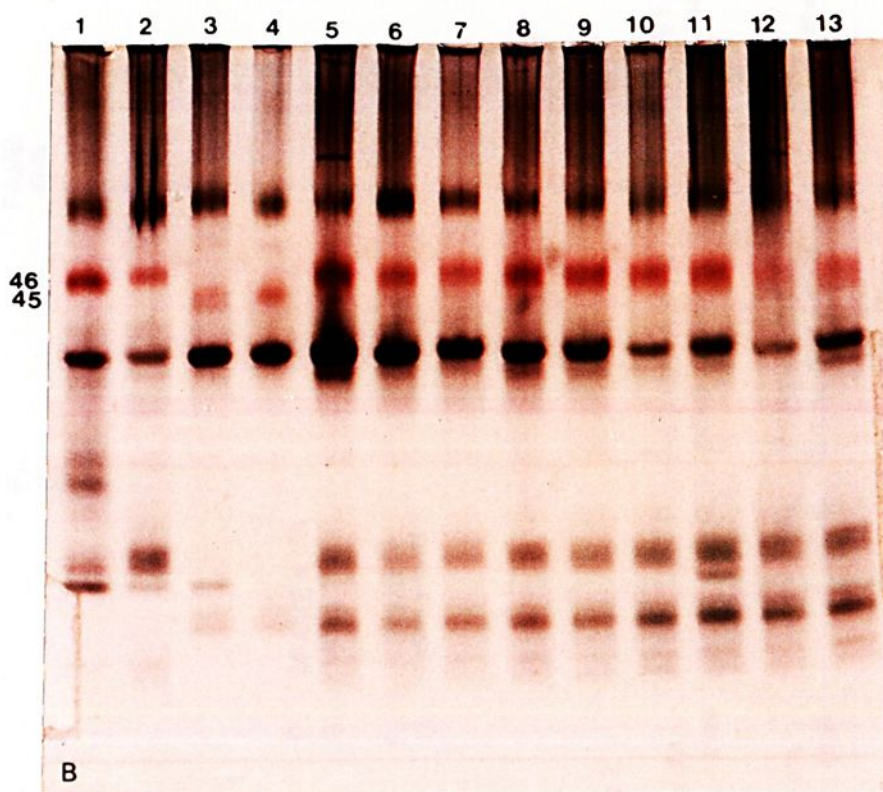
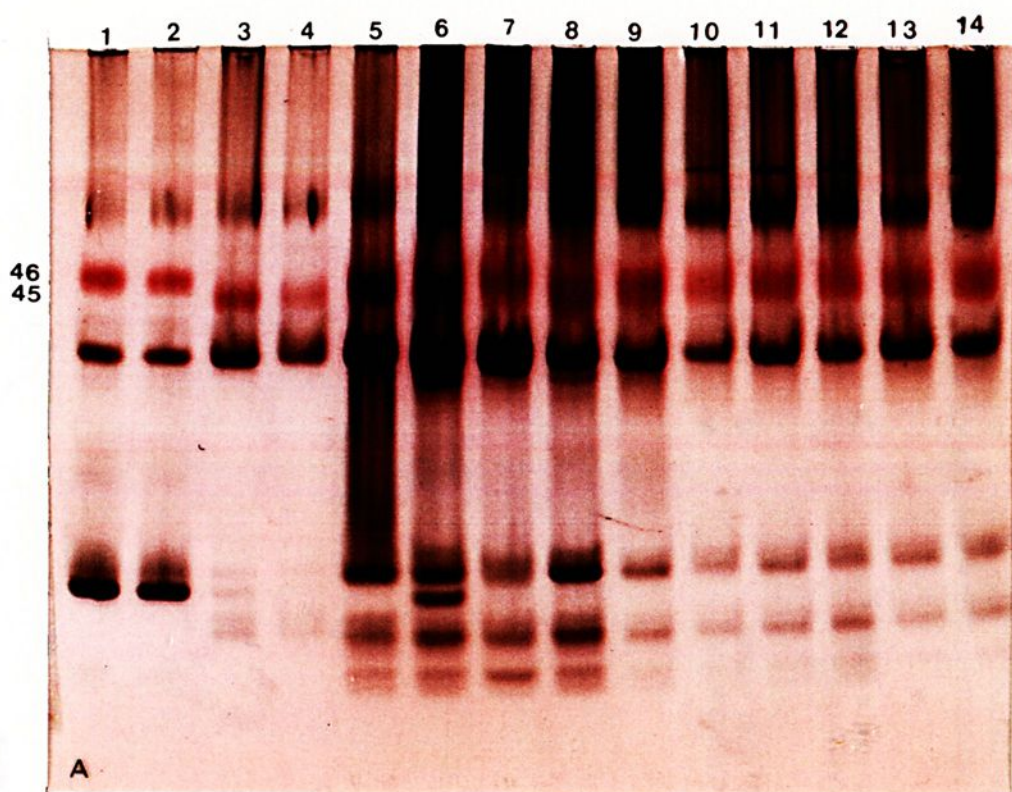


Figura 22. A. Esterases em híbridos obtidos em cruzamentos entre fêmeas A95 e machos B20D2. 1 e 2- machos B20D2, 3 e 4- fêmeas A95, 5 a 9- machos híbridos e 10 a 14 fêmeas híbridas. B. Esterases em híbridos obtidos em cruzamentos entre fêmeas B20D2 e machos A95. 1- macho B20D2, 2- fêmea B20D2, 3- macho A95, 4- fêmea A95, 5 a 9- machos híbridos e 10 a 13 fêmeas híbridas. Figura extraída de Lapenta (1992).

Cruzamentos I.

P.	♀ A (A95)	x	♂ B (B20D2)
G.	45/45		46/46
F ₁ .	FAMB		
G.	45/46		

Retrocruzamentos 1.

P.	♀ FAMB x ♂ A
G.	♀ 45/46, ♂ 45/45
F ₂ .	♀ FAMB ♂ A
G.	45/45 e 46/45

P.	♀ FAMB x ♂ B
G.	♀ 45/46, ♂ 46/46
F ₂ .	♀ FAMB ♂ B
G.	45/46 e 46/46

Retrocruzamentos 2.

P.	♀ ♀ FAMB ♂ A x ♂ A
G.	♀ 45/45 ou 46/45, ♂ 45/45

P.	♀ ♀ FAMB ♂ A x ♂ B
G.	♀ 45/45 ou 46/45, ♂ 46/46

P.	♀ ♀ FAMB ♂ B x ♂ A
G.	♀ 45/46 ou 46/46, ♂ 45/45

P.	♀ ♀ FAMB ♂ B x ♂ B
G.	♀ 45/46 ou 46/46, ♂ 46/46

F ₃ .	♀ ♀ FAMB ♂ A ♂ A
G.	45/45 ou 45/45 e 46/45

F ₃ .	♀ ♀ FAMB ♂ A ♂ B
G.	45/46 ou 45/46 e 46/46

F ₃ .	♀ ♀ FAMB ♂ B ♂ A
G.	45/45 ou 46/45 e 46/45

F ₃ .	♀ ♀ FAMB ♂ B ♂ B
G.	45/46 ou 46/46 e 46/46

Figura 23. Esquema dos cruzamentos entre fêmeas A95 e machos B20D2 e retrocruzamentos envolvendo esses híbridos, com os respectivos genótipos esperados. A= A95, B= B20D2, F= fêmea e M= macho.

Cruzamentos II.

P. ♀ **B (B20D2)** x ♂ **A (A95)**
 G. 46/46 45/45

F₁.
 G. **FBMA** 46/45

Retrocruzamentos 1.

P. ♀ **FBMA** x ♂ **A**
 G. ♀ 46/45, ♂ 45/45

F₂. ♀ **FBMA** ♂ **A**
 G. 46/45 e 45/45

P. ♀ **FBMA** x ♂ **B**
 G. ♀ 46/45, ♂ 46/46

F₂. ♀ **FBMA** ♂ **B**
 G. 46/46 e 45/46

Retrocruzamentos 2.

P. ♀ ♀ **FBMA** ♂ **A** x ♂ **A**
 G. ♀ 46/45 ou 45/45, ♂ 45/45

F₃. ♀ ♀ **FBMA** ♂ **A** ♂ **A**
 G. 46/45 e 45/45 ou 45/45

P. ♀ ♀ **FBMA** ♂ **A** x ♂ **B**
 G. ♀ 46/45 ou 45/45, ♂ 46/46

F₃. ♀ ♀ **FBMA** ♂ **A** ♂ **B**
 G. 46/46 e 45/46 ou 46/46

P. ♀ ♀ **FBMA** ♂ **B** x ♂ **A**
 G. ♀ 46/46 ou 45/46, ♂ 45/45

F₃. ♀ ♀ **FBMA** ♂ **B** ♂ **A**
 G. 46/45 ou 45/45 e 46/45

P. ♀ ♀ **FBMA** ♂ **B** x ♂ **B**
 G. ♀ 46/46 ou 45/46, ♂ 46/46

F₃. ♀ ♀ **FBMA** ♂ **B** ♂ **B**
 G. 46/46 ou 45/46 e 46/46

Figura 24. Esquema dos cruzamentos entre fêmeas B20D2 e machos A95 e retrocruzamentos envolvendo esses híbridos, com os respectivos genótipos esperados. A= A95, B= B20D2, F= fêmea e M= macho.

Tabela 7. Número de descendentes analisados, genótipos esperados e fenótipos observados nos retrocruzamentos dos híbridos provenientes dos cruzamentos entre fêmeas A95 e machos B20D2. c= casal, m= massa, -- = ausência das bandas e demais abreviações conforme as figuras 23 e 24.

Retrocruzamentos	Tipo	Nº de casais	Fenótipos da fêmea	Genótipos esperados	Fenótipos observados												T
					45			45/46			46			--			
					♀	♂	T	♀	♂	T	♀	♂	T	♀	♂	T	
♀FAMB x ♂A	m		45/46	45/45 e 46/45	6	8	14	3	13	16	0	2	2	1	2	3	32
♀♀FAMB♂A x ♂A	m		45, 46/45 ou 46	45/45 e 46/45	15	16	31	15	11	26	13	24	37				94
	c	4	45	45/45	20	19	39										39
	c	6	46	45/45 e 46/45	28	25	33				39	31	70				103
♀♀FAMB♂A x ♂B	m		45, 46/45 ou 46	45/46 e 46/46				2	2	4	7	4	11				15
	c	2	45/46	45/46 e 46/46				6	7	13	1	1	2				15
♀FAMB x ♂B	m		45/46	45/46 e 46/46				7	14	21	15	17	32	1	0	1	54
♀♀FAMB♂B x ♂A	m		45/46 ou 46	45/45 e 46/45	20	21	41	1	4	5	4	3	7	3	1	4	53
	c	4	45/46	45/45 e 46/45	17	10	27	0	9	9	17	8	25				61
	c	4	46	46/45				0	6	6	34	29	63				69
♀♀FAMB♂B x ♂B	m		45/46 ou 46	45/46 e 46/46				10	8	18	40	41	81				99
	c	1	45/46	45/46 e 46/46				4	5	9							9
	c		46	46/46							7	6	13				13
																	656



Tabela 8. Número de descendentes analisados, genótipos esperados e fenótipos observados nos retrocruzamentos dos híbridos provenientes dos cruzamentos entre fêmeas B20D2 e machos A95. c= casal, m= massa, -- = ausência das bandas e demais abreviações conforme as figuras 23 e 24.

Retrocruzamentos	Tipo	Nº de casais	Fenótipos da fêmea	Genótipos esperados	Fenótipos observados												T
					45			45/46			46			--			
					♀	♂	T	♀	♂	T	♀	♂	T	♀	♂	T	
♀ FBMA x ♂A	m		46 ou 45/46	45/45 e 46/45	13	20	33	3	1	4	2	9	11	1	0	1	49
♀ ♀ FBMA ♂A x ♂A	m		45, 46/45 ou 46	45/45 e 46/45	27	19	46	2	2	4	9	12	21	1	0	1	72
	c	10	45	45/45	102	118	220										220
	c	4	45/46	45/45 e 46/45	8	1	9				16	12	28				36
	c	3	46	45/45 e 46/45	2	7	9				7	3	10				19
♀ ♀ FBMA ♂A x ♂B	m		45, 46/45 ou 46	45/46 e 46/46				23	21	44	10	8	18				62
	c	1	45/46	45/46 e 46/46				4	8	12		4	4				16
♀ FBMA x ♂B	m		46 ou 45/46	45/46 e 46/46				19	19	38	19	33	52				90
♀ ♀ FBMA ♂B x ♂A	m		45/46 ou 46	45/45 e 46/45	14	9	23	8	5	13	4	5	9				47
	c	5	46	46/45							72	65	137				137
♀ ♀ FBMA ♂B x ♂B	m		45/46 ou 46	45/46 e 46/46				25	12	37	32	26	58				95
	c	2	45/46	45/46 e 46/46				5	2	7	3	6	9				16
	c	3	46	46/46							32	17	49				49
																	908

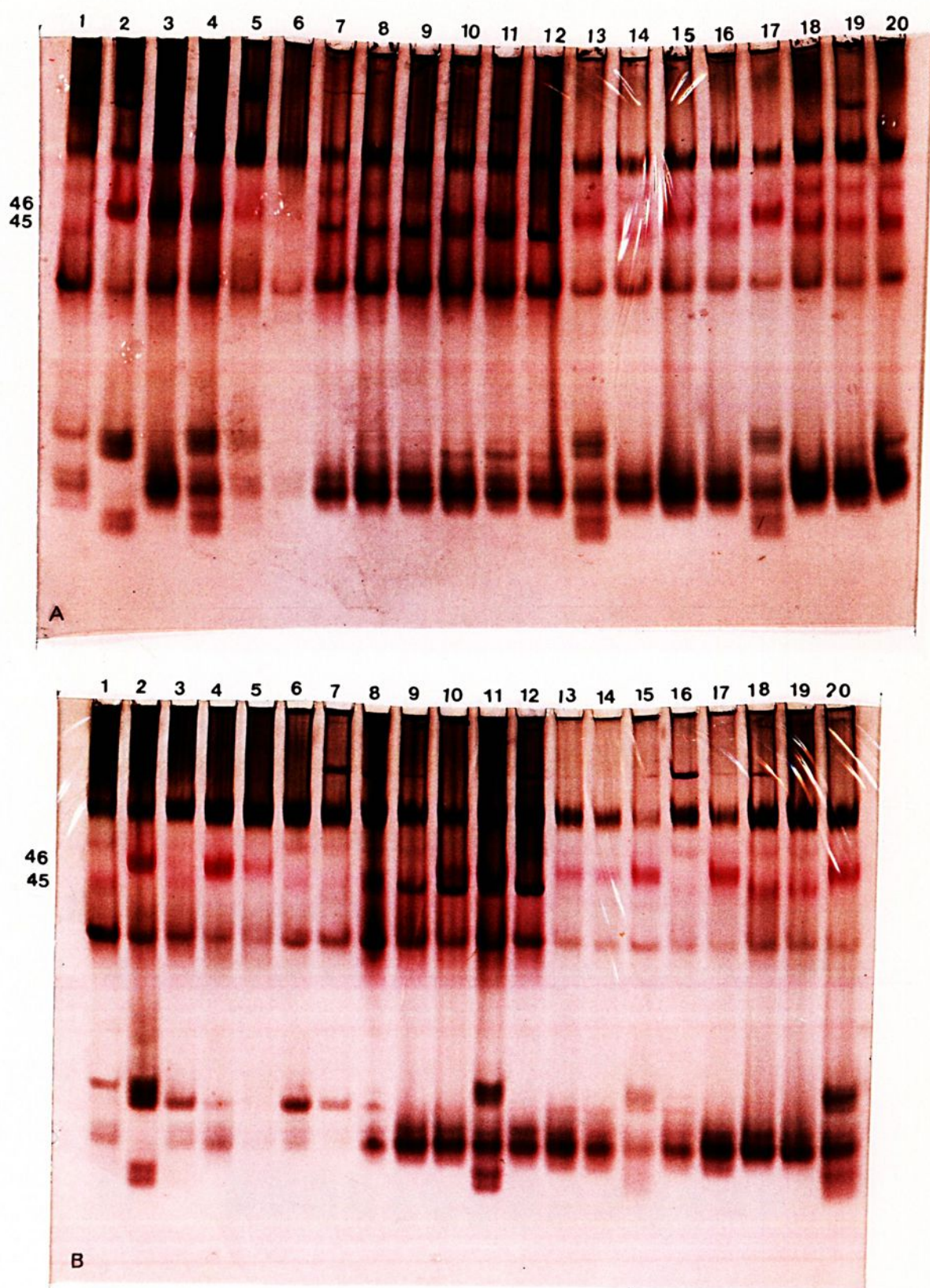


Figura 25. A e B. Esterases em híbridos obtidos em retrocruzamentos. A. 1- macho A95, 2- fêmea B20D2, 3 e 4- machos φ FAMB σ A, 5 e 6- fêmeas φ FAMB σ A, 7 a 12- machos φ φ FAMB σ A σ A, 13 a 20- fêmeas φ φ FAMB σ A σ A. B. 1- macho A95, 2- macho B20D2, 3 e 4- machos φ FBMA σ A, 5 e 7- fêmeas φ FBMA σ A, 8 a 12- machos φ φ FBMA σ A σ A, 13 a 20- fêmeas φ φ FBMA σ A σ A.

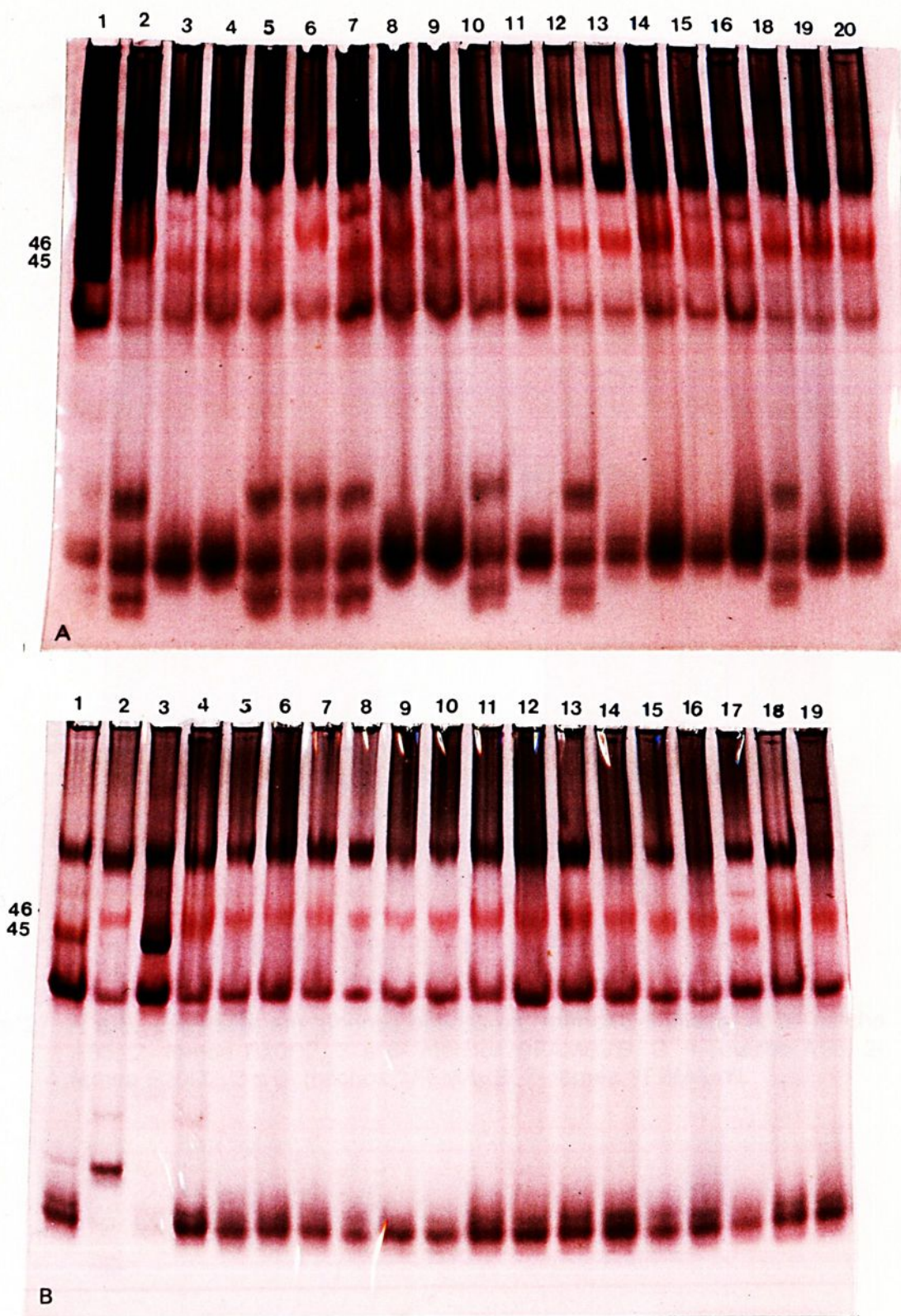


Figura 26. A e B. Esterases em híbridos obtidos em retrocruzamentos. A. 1- macho parental A95, 2- fêmea parental ♀FAMB♂A (fenótipo 46), 3 a 11- machos descendentes do casal, 12 a 19- fêmeas descendentes do casal. B. 1- macho A95, 2- macho B20D2, 3- macho parental A95 e 4- fêmea parental ♀FBMA♂A (fenótipo 46/45), 5 a 11- machos descendentes do casal, 12 a 19- fêmeas descendentes do casal.

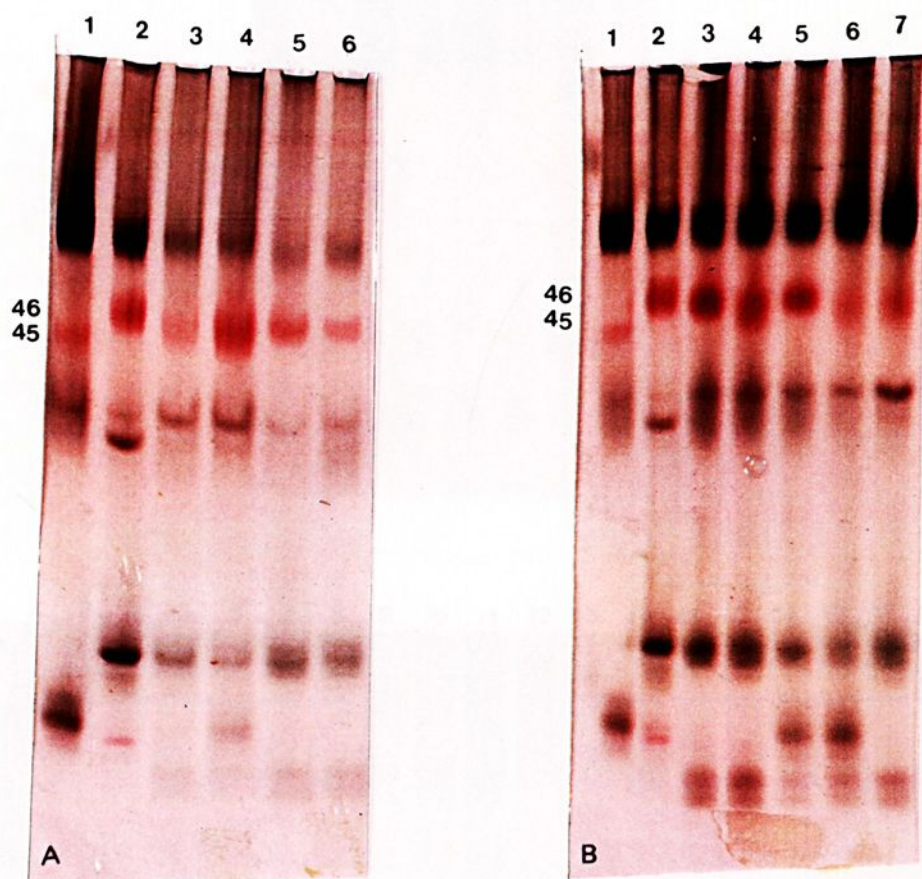


Figura 27. A e B. Esterases em híbridos obtidos em retrocruzamentos. A. 1- macho A95, 2- fêmea B20D2, 3 a 6- machos ♀FAMBσB. B. 1- macho A95, 2- fêmea B20D2, 3 a 6- machos ♀FBMAσB, 7- fêmea ♀FBMAσB.

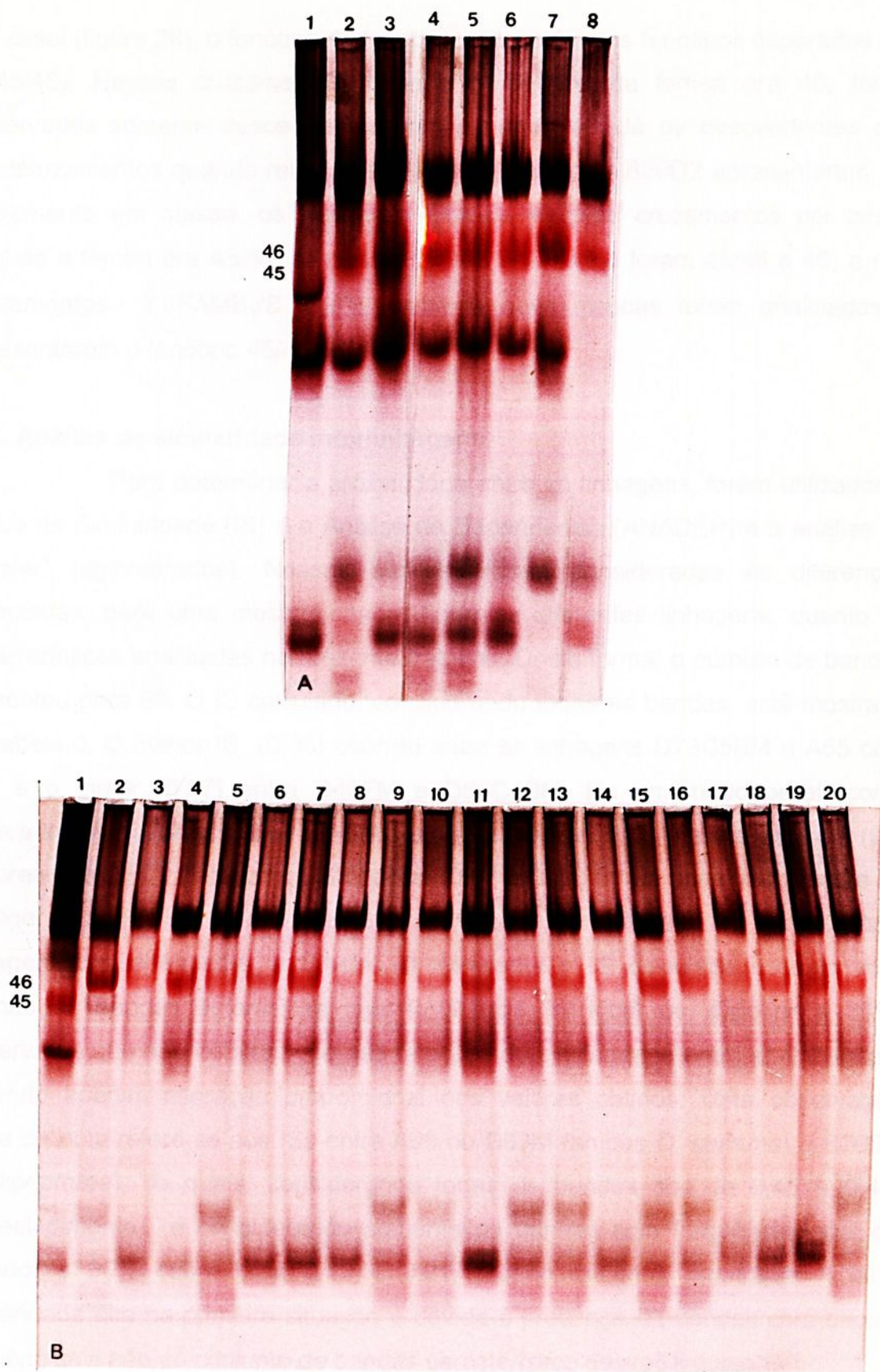


Figura 28. A e B. Esterases em híbridos obtidos em retrocruzamentos entre A95 e B20D2. A. 1- macho parental A95, 2- fêmea parental ♀FAMB♂B (fenótipo 46), 3- macho descendentes do casal, 4 a 7- fêmeas descendentes do casal e 8 macho B20D2. B. 1- macho parental A95 e 2- fêmea parental ♀FBMA♂B (fenótipo 46) e 3 a 20- machos descendentes do casal.

em casal (figura 28), o fenótipo 46 foi observado, além dos fenótipos esperados (45 e 45/46). Nesses cruzamentos, quando o fenótipo da fêmea era 46, foram observados somente descendentes com a banda 46. Já os descendentes dos retrocruzamentos quando retrocruzados novamente com B20D2 apresentaram, no cruzamento em massa, os fenótipos 45/46 e 46. Nos cruzamentos por casal, quando a fêmea era 45/46, os descendentes analisados foram 45/46 e 46, e nos cruzamentos ♀♀FAMB♂B x ♂♂B, somente nove moscas foram analisadas e apresentaram o fenótipo 45/46.

III.8. Análise de similaridade interlinhagens

Para determinar a proximidade entre as linhagens, foram utilizados o Índice de Similaridade (IS) e a Análise de Dependência (ANADEP) e a análise de "cluster" (aglomerados). Nessas análises foram consideradas as diferenças detectadas, para uma mesma banda, entre as diferentes linhagens, quanto às características analisadas no presente trabalho. Desta forma, o número de bandas aumentou para 69. O IS calculado, considerando todas as bandas, está mostrado na tabela 9. O menor IS (0,06) ocorreu entre as linhagens D73C5BM e A55 com Buz e o maior (0,67) entre D40FM e D62C4BM. De um modo geral, como esperado, os maiores ISs foram obtidos entre linhagens de mesma espécie (ISs maiores que 0,50). Entretanto, ISs baixos (0,07 a 0,24) foram observados entre as linhagens D69R2 ou D69R5 (ambas classificadas como *D. serido*), e as demais linhagens dessa espécie. A tabela 10 apresenta o IS calculado considerando apenas as bandas esterásicas cuja frequência foi igual ou superior a 30%. Observa-se que não há alteração nas relações de similaridade entre as linhagens, havendo apenas alteração proporcional nos valores obtidos. Uma observação digna de nota refere-se aos ISs entre A95 ou D63M (ambas *D. seriema*) e B20D2 (*D. koepferae*), os quais, considerando todas as bandas são de 0,45 e 0,44; respectivamente, e considerando somente as bandas com frequência igual ou superior a 30% caem para 0,12 e 0,21; respectivamente, mostrando que a similaridade alta na primeira situação é devida à presença de bandas com baixas frequências e não ao conjunto de bandas característico dessas linhagens.

A análise de dependência foi realizada e é apresentada através de gráficos em que são consideradas as intersecções dos fatores de dependência

Tabela 9. Índice de similaridade entre as linhagens, considerando todas as bandas. Os ISs maiores ou iguais a 0,40 estão indicados em vermelho.

ESPÉCIES E LINHAGENS	A95	D72B	D73A	D72A	D71	D62	D63	D40	D73B	B31	A55	B50	B59	D69A	D69B	B20	B25	Buz
<i>D. seriema</i>	A95	0,32	0,29	0,46	0,33	0,46	0,45	0,46	0,34	0,23	0,23	0,21	0,26	0,18	0,25	0,45	0,34	0,21
	D72B		0,27	0,37	0,37	0,52	0,50	0,30	0,33	0,25	0,31	0,37	0,29	0,20	0,10	0,35	0,25	0,12
	D73A			0,33	0,23	0,32	0,32	0,25	0,41	0,17	0,16	0,23	0,18	0,09	0,17	0,23	0,13	0,06
	D72A				0,54	0,58	0,67	0,52	0,44	0,19	0,19	0,29	0,33	0,15	0,13	0,36	0,26	0,17
	D71					0,54	0,58	0,54	0,52	0,30	0,27	0,20	0,20	0,14	0,15	0,28	0,18	0,16
	D62						0,61	0,67	0,56	0,25	0,31	0,37	0,32	0,23	0,18	0,35	0,21	0,15
	D63							0,50	0,54	0,33	0,27	0,32	0,37	0,18	0,15	0,44	0,29	0,17
	D40								0,50	0,23	0,19	0,26	0,21	0,22	0,16	0,34	0,19	0,17
	D73B									0,19	0,18	0,25	0,25	0,18	0,15	0,18	0,12	0,16
<i>D. serido</i>	B31										0,64	0,50	0,44	0,16	0,13	0,38	0,20	0,11
	A55											0,65	0,54	0,15	0,17	0,31	0,20	0,06
	B50												0,64	0,24	0,15	0,28	0,23	0,09
	B59													0,20	0,11	0,24	0,22	0,09
	D69A														0,38	0,15	0,13	0,35
	D69B															0,16	0,13	0,28
<i>D. koepferae</i>	B20																0,63	0,13
	B25																	0,18
<i>D. buzzatii</i>	Buz																	

Tabela 10. Índice de similaridade entre as linhagens, considerando as bandas que ocorreram com frequência igual ou superior a 30%. Os ISs maiores ou iguais a 0,40 estão indicados em vermelho.

ESPÉCIES E LINHAGENS		A95	D72B	D73A	D72A	D71	D62	D63	D40	D73B	B31	A55	B50	B59	D69A	D69B	B20	B25	Buz
<i>D. seriema</i>	A95		0,23	0,23	0,18	0,26	0,31	0,41	0,25	0,33	0,11	0,18	0,14	0,12	0,18	0,15	0,12	0,13	0,20
	D72B			0,45	0,25	0,27	0,54	0,31	0,25	0,33	0,11	0,25	0,23	0,20	0,04	0,07	0,02	0,07	0,06
	D73A				0,36	0,27	0,31	0,23	0,25	0,45	0,11	0,18	0,23	0,20	0,04	0,07	0,12	0,07	0,06
	D72A					0,47	0,46	0,41	0,44	0,36	0,09	0,21	0,19	0,31	0,07	0,06	0,17	0,06	0,05
	D71						0,33	0,41	0,53	0,56	0,09	0,15	0,12	0,17	0,11	0,12	0,17	0,06	0,05
	D62							0,47	0,50	0,54	0,10	0,23	0,21	0,12	0,08	0,07	0,19	0,07	0,06
	D63								0,39	0,40	0,09	0,14	0,23	0,28	0,11	0,05	0,21	0,05	0,04
	D40									0,54	0,09	0,14	0,11	0,22	0,20	0,12	0,16	0,06	0,05
	D73B										0,05	0,09	0,14	0,11	0,06	0,07	0,12	0,07	0,06
	B31											0,50	0,43	0,47	0,07	0,06	0,29	0,19	0,10
<i>D. serido</i>	A55												0,67	0,69	0,11	0,06	0,29	0,19	0,10
	B50													0,80	0,04	0,07	0,20	0,15	0,06
	B59														0,08	0,06	0,25	0,13	0,05
	D69A															0,25	0,08	0,04	0,40
	D69B																0,06	0,08	0,31
	B20																	0,42	0,05
<i>D. koepferae</i>	B25																		0,06
<i>D. buzzatii</i>	Buz																		

(FTs). Os fatores representam cortes no espaço multidimensional, sendo que os quatro primeiros fatores explicam 70,4% da dependência total. O FT1, que é o fator de maior peso, explicando 24,3% da dependência total, é o chamado fator de dispersão global. Este fator de dispersão é o de maior peso devido às linhagens apresentarem padrões de bandas exclusivos, com ausência e presença de bandas específicas. Já FT2, FT3 e FT4 (que explicam 19,4; 16,6 e 10,1 da dependência total, respectivamente) são chamados fatores de associação, pois são cortes no espaço multidimensional que captam a formação dos grupos. A figura 29 mostra a relação espacial das linhagens em um plano, considerando FT1 e FT3. Já a figura 30 mostra a relação espacial das linhagens, em uma visão tridimensional, considerando FT1, FT2 e FT4. Em qualquer dos gráficos que representam essa relação, observa-se a formação de quatro grupos: um deles composto das linhagens B31D1, A55, B59Q1 e B50Q3, que são classificadas como *D. serido*; outro formado por B20D2 e B25D7, classificadas como *D. koepferae*; outro composto pelas duas linhagens D69, classificadas como *D. serido*, mas que mostram relação estreita com *D. buzzatii* (Buz); o quarto grupo composto pelas linhagens D71C1BM, D40FM, D72M, D72R2, D62C4BM, D63M, D73C12B e D73C5BM, classificadas como *D. seriema*. A linhagem A95, embora relativamente distante, guarda uma relação maior com o grupo das *D. seriema* do que com qualquer outro grupo.

A análise de "cluster" considerando os quatro primeiros fatores de dependência é apresentado na figura 31. O diagrama mostra os mesmos grupos de linhagens apresentados nos gráficos.

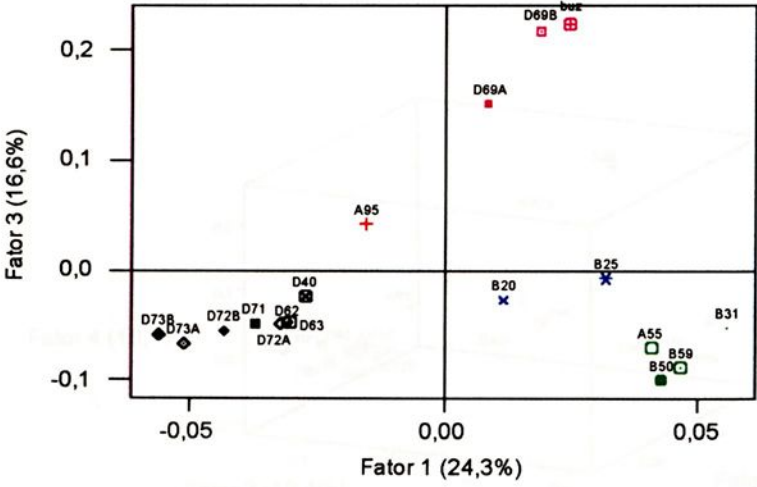


Figura 29. Gráfico da ANADEF, mostrando a distribuição das linhagens estudadas, no plano fatorial (FT1 x FT3), que explica 40,9% da dependência total.

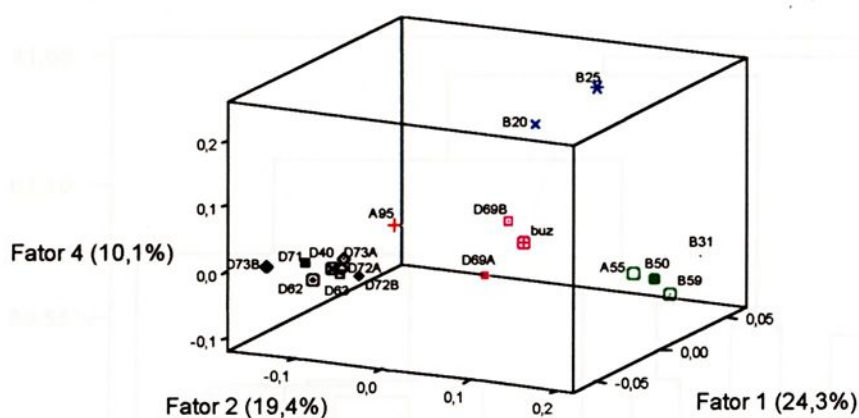


Figura 30. Gráfico da ANADEC, mostrando a distribuição das linhagens estudadas, considerando os FT1, FT2 e FT4, que juntos explicam 53,8% da dependência total.

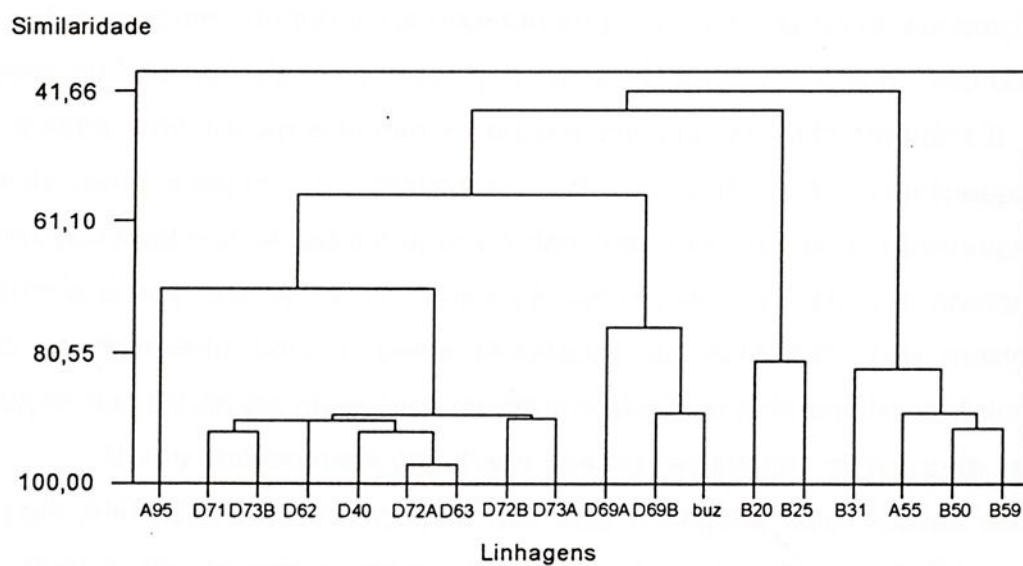


Figura 31. Análise de Cluster das linhagens estudadas no presente trabalho, segundo as bandas esterásicas, considerando os quatro primeiros fatores de dependência.

IV. DISCUSSÃO

As dez novas linhagens analisadas neste trabalho, das quais oito são presentemente classificadas como *Drosophila seriema* e duas como *D. serido*, permitem reafirmar o processo de intensa diferenciação que caracteriza o "cluster" *D. buzzatii*. Essa condição do "cluster", com base nos padrões de esterases, já havia sido verificada em trabalho anterior, no qual oito linhagens foram estudadas (Lapenta, 1992; Lapenta *et al.*, 1995). O padrão de esterases de cada linhagem, analisando os indivíduos isoladamente, mostra que as esterases constituem uma forma extremamente adequada de abordagem para o estudo da diferenciação das linhagens do "cluster". Pode-se dizer que cada linhagem é única no seu conjunto de esterases, embora apresentem esterases comuns em alta frequência. Estas esterases comuns estão, provavelmente, entre as proteínas "housekeeping". A caracterização específica das linhagens é demonstrada através da observação dos zimogramas e dos resultados do Índice de Similaridade (IS) em que predominam valores relativamente baixos, pelos resultados da ANADEP (que mostram a distribuição das linhagens no espaço multidimensional) e pela análise de "cluster".

Numa análise mais detalhada desses resultados, observa-se pelo IS, como pela ANADEP que, nos grupos das seis linhagens classificadas como *D. serido*, quatro são próximas entre si (B31D1, A55, B50Q3 e B59Q1) e duas (D69R2 e D69R5) são distantes das quatro primeiras e próximas entre si. A proximidade entre essas quatro primeiras linhagens já havia sido detectada quanto aos padrões de esterases (Lapenta, 1992; Lapenta *et al.*, 1995). Análises referentes ao isolamento reprodutivo, fertilidade e grau de sinapse (Madi-Ravazzi *et al.*, 1997) indicaram, também, uma alta similaridade entre essas linhagens. Entretanto, os próprios resultados de análise de esterases, bem como de outros parâmetros como a morfologia do edeago (Silva & Sene, 1991; Monteiro, 1997) e tipo de cariótipo (Baimai *et al.*, 1983) indicavam uma diferenciação de B31D1 em relação a esse grupo. Segundo a classificação de Tidon-Sklorz (1992) e Monteiro (1997), B31D1 estaria incluída no grupo de *D. serido* do tipo D e as três linhagens restantes, no grupo de *D. serido* B. Embora os tipos *D. serido* B e *D. serido* D sejam encontrados na região centro-sul do Brasil, não existe simpatria entre ambos, pois o tipo B foi sempre encontrado no topo de morros, associado ao cacto

Pilosocereus machrisii, enquanto o tipo D ocorre no vale dos rios, associado ao cacto *Cereus hildemannianus* (Monteiro, 1997).

Segundo Tidon-Sklorz (1992) as linhagens D69, quanto à morfologia do edeago, seriam do tipo B. Entretanto, essa autora discute se há equivalência desse grupo B com o grupo B estudado por Silva & Sene (1991). Por outro lado, as várias populações de *D. serido* do tipo B podem ser distinguidas umas das outras, quanto a detalhes da morfologia do edeago, possivelmente por essas populações serem encontradas em morros, formando verdadeiros isolados, dificultando o fluxo gênico entre elas (Monteiro, 1997).

As diferenças encontradas, no presente trabalho, quanto às esterases, entre D69R2 ou D69R5 e as demais linhagens de *D. serido* B são acentuadas. D69R2 e D69R5, pelo IS e pela ANADep, são tão distantes de *D. serido* B quanto das linhagens das outras espécies.

No grupo das nove linhagens classificadas como *D. seriema*, os valores de IS mostram que D71C1BM, D40FM, D72M, D62C4BM, D63M e D73C5BM são mais próximas entre si do que das três demais linhagens, D72R2, D73C12B e A95 que também não são tão próximas entre si quanto as seis anteriores (0,23 e 0,36 contra valores acima de 0,50 para as demais). Retrata esta situação, a distribuição da análise de "cluster" que considera os quatro primeiros fatores de dependência. Já as linhagens de *D. koepferae*, B20D2 e B25D7, estão sempre próximas entre si, em qualquer das análises realizadas.

As linhagens de *D. seriema*, estudadas neste trabalho, compartilham o mesmo tipo C de edeago (Tidon-Sklorz, 1992). As linhagens D72R2, D62C4B, D71C1BM, D73C5BM e D73C12B foram analisadas quanto aos cariótipos e, exceto D62C4B e D73C12B, foram também estudadas quanto às inversões em cromossomos politênicos (Kuhn *et al.*, 1996). Os autores encontraram uma variabilidade interlinhagem muito pequena quanto a essas características; entretanto, no seu conjunto, essas linhagens apresentaram inversões cromossômicas e cariótipos característicos que as diferem dos demais grupos. De acordo com os autores, esses marcadores sugerem que o conjunto de populações que compõem *D. seriema*, seja praticamente monomórfico. Já Manfrin (1997) encontrou divergência, quanto ao estudo do DNA mitocondrial, entre diferentes populações dessa espécie. A autora mencionada sugeriu, entre outros fenômenos,

que essa divergência possa ser explicada pela dinâmica de populações, como a ausência de fluxo gênico.

No presente trabalho, considerando a Análise de "cluster", observa-se que, as quatro linhagens anteriormente mencionadas, B31D1, A55, B50Q3 e B59Q1, classificadas como *D. serido*, são o grupo mais diferenciado, seguido em ordem decrescente, em grau de diferenciação, pelas linhagens de *D. koepferae*. Em um patamar mais baixo, encontram-se as outras duas linhagens de *D. serido* (D69R2 e D69R5) junto com *D. buzzatii* que é a espécie com a qual se assemelham. O nível seguinte, considerando a similaridade crescente, reúne as demais linhagens classificadas como *D. seriema*. Observa-se, porém, que há diferentes graus de similaridade entre elas, A95, mantendo-se mais diferenciada, em relação a todas as demais.

Em uma análise comparativa, utilizando o cladograma elaborado por Tidon-Sklorz & Sene (1992 e 1995b) e alterado por Ruiz *et al.* (1996), com base principalmente na morfologia do edeago (Silva & Sene, 1991; Tidon-Sklorz, 1992), na presença de inversões cromossômicas (Tosi & Sene, 1989) e nos diferentes cariótipos (Baimai *et al.*, 1983) podemos observar, além das diferenças quanto à formação dos grupos, já descritas, outras diferenças na proximidade entre as espécies estudadas. Conforme o padrão de esterases, *D. buzzatii* está mais próxima de *D. seriema* que de *D. serido* (B31D1, A55, B50Q3 e B59Q1) e *D. koepferae*. Uma maior similaridade entre A95 e Buz já havia sido relatada por Lapenta (1992) e Lapenta *et al.* (1995).

Com base nesse quadro, pode-se admitir, em termos de reavaliação da sistemática do complexo, que as linhagens D69R2 e D69R5, hoje classificadas como *D. serido*, na verdade possam constituir uma nova espécie. Dados do nosso laboratório, não publicados, referentes a isolamento reprodutivo e pareamento cromossômico (Machado, L. P., comunicação pessoal) reforçam essa idéia. Pode-se destacar a proximidade, quanto ao padrão de esterases, entre as duas linhagens codificadas como D69 e *D. buzzatii*. Contudo, ambas as linhagens D69 diferem de *D. buzzatii* em outros aspectos importantes, como morfologia do edeago e inversões.

As 48 bandas esterásicas detectadas no estudo das 10 novas linhagens foram classificadas, de acordo com a preferência em relação ao



substrato (α e β -naftil acetatos), em α -esterases (26 bandas), β -esterases (10 bandas) e $\alpha\beta$ -esterases (12 bandas).

As frequências de cada banda, nas diferentes linhagens de mesma espécie, foram variáveis. Uma delas ocorreu em todas as linhagens e em 100% dos indivíduos de todas as espécies (banda 52). Bandas que em uma ou algumas linhagens eram bastantes frequentes, em outras apresentaram frequências baixas ou mesmo ausência. Essa variação de frequência das bandas é também um aspecto importante da diferenciação entre as linhagens. É possível, com base nessa diferença de frequências, reconhecer a linhagem pelo seu padrão de esterases. Esse aspecto foi anteriormente mencionado por Lapenta (1992) e Lapenta *et al.* (1995).

As 10 linhagens analisadas no presente trabalho, somadas às oito anteriormente analisadas (Lapenta *et al.*, 1995) compõem as 18 linhagens do "cluster" *buzzatii*, presentemente conhecidas quanto ao padrão de esterases. Um total de 62 bandas foram observadas nessas 18 linhagens.

Com base nos dados de velocidade de migração no gel, afinidade aos substratos, classificação bioquímica dada pelo padrão de inibição, expressão nos sexos e localização no corpo das moscas, foi possível reconhecer 20 esterases. Cruzamentos intra e interespecíficos forneceram informações que, adicionadas a esses dados levaram à conclusão de que 19 locos podem ser responsáveis por 18 dessas esterases. Uma das esterases, EST-14, parece ser o produto da atividade de dois locos, conforme resultados dos cruzamentos de B20D2 com B31D1 (Lapenta, 1992). Dessas 20 esterases, nove foram compartilhadas por todas as espécies. Essas esterases são EST-1, EST-2, EST-3, EST-8, EST-11, EST-15, EST-18, EST-19 e EST-20, sendo que, dentre estas, EST-3, EST-8 e EST-15 estiveram presentes em todas as linhagens.

Diferentemente do que acontece com outros sistemas enzimáticos, a presença de um número relativamente alto de esterases, em insetos, tem sido registrada com frequência. Por exemplo, em *Megaselia scalaris*, foram detectadas, em quatro linhagens, 45 bandas esterásicas determinadas por 20 locos gênicos (Rits, 1997). Healy *et al.* (1991), utilizando técnicas de eletroforese em gel de poliacrilamida e de focalização isoeletrica, descreveram 23 esterases, as quais foram correlacionadas a 19 locos gênicos. Em *D. dunni*, Carrasco *et al.* (1984)

detectaram seis bandas esterásicas que foram atribuídas a cinco locos gênicos. Nas espécies *D. mulleri* e *D. arizonae* foram detectadas 20 bandas que foram atribuídas à presença de 12 locos (Ceron, 1988). Em *D. buzzatii*, East (1982), utilizando eletroforese em gel de poliacrilamida, verificou a presença de 20 bandas esterásicas em adultos, sendo que uma enzima adicional, na fase larval, foi observada, mas o autor não estabeleceu o número de locos correspondentes.

Neste trabalho, as esterases foram submetidas a três classes de inibidores, objetivando a classificação pelos critérios de Holmes & Masters (1967) *apud* Oakeshott *et al.* (1993). Como organofosforado, foi utilizado o malathion que inibe caracteristicamente colinesterases e carboxilesterases; como carbamato, o sulfato de eserina que inibe caracteristicamente colinesterases, e como reagente sulfidrílico, o pCMB que inibe arilesterases. Reconheceu-se, com os inibidores, a presença de três carboxilesterases (EST-11, EST-17 e EST-19), de duas colinesterases (EST-13 e EST-15) e de oito acetilesterases (EST-1, EST-2, EST-3, EST-5, EST-7, EST-9, EST-12 e EST-16). Permaneceu incerta a classificação de uma esterase (EST-8) que fugiu dos padrões de inibição reconhecidos por aqueles critérios. As demais esterases não foram caracterizadas.

Nenhuma arilesterase foi observada neste trabalho e conforme encontrado na literatura, *Drosophila* não apresenta esse tipo de enzima. Entretanto, a realidade dessa ausência é discutível, uma vez que, devido às características dessa enzima, ela dificilmente seria detectada nas condições experimentais utilizadas (Oakeshott *et al.*, 1993). As arilesterases de mamíferos apresentam uma alta mobilidade eletroforética e são sensíveis a altas temperaturas e tratamentos com uréia (Holmes & Masters, 1967 *apud* Oakeshott *et al.*, 1993).

Além das classes de inibidores citadas anteriormente, foram testados, como inibidores, os compostos iodoacetamida e PMSF. A não inibição das esterases pela iodoacetamida indica que nenhuma dessas enzimas apresenta um resíduo essencial de cisteína em seu centro ativo. Já EST-8 e EST-12 foram inibidas pelo PMSF. Este composto é um inibidor diagnóstico de serino-proteases e de outras enzimas contendo serina no centro ativo. Portanto, podemos postular que essas enzimas sejam serino-esterases.



A presença das esterases foi analisada no corpo das moscas, separado em cabeça, tórax e abdome. Algumas esterases apresentaram igual atividade nas três partes (como exemplo a EST-11). Outras esterases, porém, apresentaram-se predominantemente em uma ou outra parte (como exemplo a EST-8 que predomina no abdome) e outras, ainda, apresentaram um local exclusivo de atividade (como exemplo a EST-12, no abdome).

Duas colinesterases foram verificadas no presente estudo, EST-13 e EST-15. Esta última é representada pela banda 52. Sua atividade foi detectada no tórax e na cabeça e esteve presente nos géis de todos os indivíduos analisados, de todas as linhagens. Portanto, deve tratar-se de uma enzima essencial. É possível que essa enzima deva corresponder à acetilcolinesterase (AChE) que ocorre no sistema nervoso central. Em *Drosophila*, várias mutações causam a inativação dessa enzima e são letais em homozigose (Pralavorio & Fournier, 1992). Como já mencionado, essa enzima atua nos terminais do impulso nervoso, catalisando a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina e está relacionada com a resistência a inseticidas (Pralavorio & Fournier, 1992). No presente estudo a EST-13 foi detectada somente em linhagens de *D. seriema* e em D69R2 e D69R5 de *D. serido* (constituindo um dos elementos partilhados entre elas) e a identificação da parte do corpo onde ela é ativa não foi obtida. Outras colinesterases, além dessa AChE descrita acima, também foram identificadas em *Drosophila*, como as EST-4 e EST-9 de *D. melanogaster* (Healy *et al.* 1991). EST-4 é ativa em vários tecidos de larvas e adultos e EST-9 é predominante em tecidos digestivos também das duas fases do desenvolvimento.

No presente trabalho, sete esterases foram consideradas específicas de machos, pela sua alta frequência (maior que 30%) e/ou por sua ocorrência em mais de uma linhagem, exclusivamente neste sexo. Dentre essas enzimas, duas são β -esterases (EST-9 e 14) e cinco, α -esterases (EST-5, EST-7, EST-12, EST-16 e EST-19). É digno de nota, esse elevado número de esterases específicas de machos e o fato de que apenas no complexo *buzzatii* e no complexo *mulleri* foram encontradas α -esterases específicas de machos.

A EST-9, uma das β -esterases específicas de macho, é uma acetilesterase presente no abdome de algumas linhagens de *D. serido* e *D. buzzatii*. É interessante ressaltar que, nas linhagens Buz, A55 e B50Q3, esta



esterase era ocultada pela sobreposição com EST-8, uma $\alpha\beta$ -esterase, por isso não foi detectada no trabalho anterior. Sua presença nessas linhagens tornou-se evidente pelo uso de inibidores que eliminaram EST-8, no presente trabalho.

A outra β -esterase específica de machos, EST-14, pode ser estudada anteriormente, tendo sido verificada em B31D1 e B59Q1, portanto, em *D. serido*, e parece ser determinada por dois locos gênicos. Essa enzima não foi classificada quanto aos critérios de inibição, mas seu local de atividade, assim como da EST-9, foi determinado no abdome, no presente trabalho.

β -esterases específicas de machos já haviam sido identificadas em outras espécies de *Drosophila*, como a EST-F em *D. duni* (Carrasco *et al.* 1984), a EST-S em *D. virilis* (Korochkin *et al.*, 1976 *apud* Sergeev *et al.* 1993), a EST-9 em *D. arizonae* (Ceron, 1988) e a EST-F em *D. aldrichi* (Kambysellis *et al.*, 1968). Em *D. aldrichi* a β -esterase específica de macho foi localizada predominantemente no bulbo ejaculatório e ocasionalmente essa enzima estava presente em fêmeas recém-acasaladas (Kambysellis *et al.*, 1968). A EST-S de *D. virilis* é a β -esterase específica de macho melhor conhecida. Essa enzima é uma carboxilesterase, que inicialmente está presente na mosca três dias após a emergência e se expressa exclusivamente no epitélio do bulbo ejaculatório. EST-S é transferida para a fêmea durante a cópula, e diferentemente de EST-6 de *D. melanogaster*, fica restrita ao aparelho reprodutivo das fêmeas. Foi sugerido que o gene Est-S, tenha surgido por duplicação e constitua um terceiro gene, além de Est-2 e Est-P (nenhuma destas é específica de machos), no "cluster" das β -esterases, nessa espécie (Korochkin *et al.* 1990 *apud* Sergeev *et al.* 1993).

East *et al.* (1990), usando uma sonda feita a partir de Est-6 de *D. melanogaster*, isolaram um fragmento de 16 kb em *D. buzzatii*, o qual contém quatro genes bastante semelhantes entre si. Os dois últimos genes guardam grande semelhança com os genes Est-6 (β -esterase principal, que ocorre em todo o ciclo) e Est-P (β -esterase larval) de *D. melanogaster* e devem ser responsáveis por EST-1 (β -esterase principal) e EST-J P (β -esterase larval), respectivamente, em *D. buzzatii*. Os dois outros genes, denominados por esse autores de Est-A e Est-B, mostram bastante semelhança com Est-1 e Est-J, sendo que Est-B, o gene melhor caracterizado, apresenta um suposto intron na mesma posição do intron existente em Est-6 e Est-P de *D. melanogaster*. Foram localizadas também em

Est-A e Est-B, regiões nas quais estariam codificados seis resíduos de cisteínas responsáveis pela estrutura tridimensional da enzima correspondente. Segundo esses autores, esses seriam pseudogenes ou então, genes ativos, cujos produtos não teriam sido ainda detectados. Assim, baseados nesse contexto, podemos supor que EST-9, encontrada em *D. buzzatii*, descrita no presente trabalho, possa ser o produto de um desses genes. Corroborando com essa hipótese, foram verificados, alguns aspectos semelhantes entre Est-A e Est-B (os genes "sem produtos") com Est-S de *D. virilis* (Oakeshott *et al.*, 1995), que é também responsável por uma β -esterase específica de macho, assim como a EST-9.

A EST-9 é uma acetilesterase, diferentemente da EST-S de *D. virilis* que é uma carboxilesterase. A β -esterase característica da fase larval em várias espécies do complexo *mulleri* também é uma acetilesterase (Mateus, 1997). Os genes para essas β -esterases características da fase larval, como Est-J em *D. buzzatii* e Est-P em *D. virilis* e em *D. melanogaster*, provavelmente surgiram por duplicação de um gene para uma β -esterase principal (Brady *et al.*, 1990; Oakeshott *et al.*, 1995). Dessa forma, parece que, nas espécies do grupo *repleta*, esses genes duplicados se diferenciaram, dando origem a enzimas diferentes que possivelmente apresentam funções diferentes. Deve-se destacar que β -esterases classificadas bioquimicamente como acetilestarases só foram encontradas no complexo *mulleri* (Mateus, 1997) e, no presente trabalho, no complexo *buzzatii*.

Uma possibilidade a ser considerada é que os dois locos adicionais no "cluster" das β -esterases em *D. buzzatii* (Est-A e Est-B), estejam também presentes em *D. serido*, e sejam correspondentes a EST-14A e EST-14B, as duas β -esterases específicas de machos, já mencionadas. Entretanto, EST-14 e EST-9 foram consideradas esterases diferentes, devido à distância de migração. Uma análise mais direcionada, utilizando técnicas moleculares poderá esclarecer a genética dessas β -esterases específicas de machos.

Dentre as cinco α -esterases admitidas no presente trabalho, específicas de machos, quatro foram caracterizadas como acetilesterases, que são as EST-5, EST-7, EST-12 e EST-16. A esterase-19 não pode ser classificada pelo critério inibitório utilizado; entretanto, ela foi inibida pelo malathion o que exclui a possibilidade dela ser uma acetilesterase ou arilesterase. Somente a EST-7

apresentou atividade no tórax e abdome; as demais esterases tiveram como local de atividade, o abdome.

Lapenta *et al.* (1995) verificaram que essas α -esterases específicas de machos não possuem a capacidade de hidrolisar o β -naftil acetato, na ausência do α -naftil acetato, diferentemente das demais α -esterases detectadas naquele trabalho.

Como mencionamos, a presença de α -esterases específicas de machos foi anteriormente verificada no complexo *mulleri*, em *D. mulleri* e *D. arizonae*, sendo que, nessas espécies, essa enzima, EST-12, começa a se expressar em machos adultos de sete e quatro dias, respectivamente (Ceron, 1988). Como não há registro de α -esterases específicas de machos, além dessas já relatadas, Lapenta *et al.* (1995) sugeriram que esse tipo de enzima seja específica do grupo *repleta*.

A transferência de esterases de machos para fêmeas durante a cópula é bem conhecida para EST-6 de *D. melanogaster* (Richmond & Senior, 1981) e para EST-S de *D. virilis* (Korochkin *et al.* 1990 *apud* Sergeev *et al.* 1993). É interessante ressaltar, porém, que no presente trabalho as fêmeas analisadas eram virgens, fato que exclui a possibilidade de analisar esterases de machos em fêmeas. Nos cruzamentos por casal, para análise genética, em que a fêmea mãe era analisada, algumas esterases específicas de machos foram observadas e deverão ser melhor analisadas futuramente.

Em *D. serido* foram detectadas seis das sete esterases específicas de machos, sendo duas β e quatro α -esterases; em *D. seriema*, quatro, todas α -esterases; em *D. koepferae*, duas, α -esterases, e em *D. buzzatii*, duas, uma β e uma α -esterase. Não havia, anteriormente a este trabalho, registro de esterases específicas de machos, em *D. buzzatii*.

Dentre as esterases, as β -esterases têm sido o alvo de maior atenção dos pesquisadores, por ser um grupo de esterases que tem se diferenciado entre as espécies de *Drosophila* (East *et al.*, 1990; Oakeshott *et al.*, 1993). Todas as espécies analisadas até o momento apresentam pelo menos uma β -esterase. Diversos trabalhos têm mostrado que as β -esterases diferem em vários níveis, desde a seqüência de aminoácidos até a conformação da proteína, sendo que

quanto mais distantes filogeneticamente são as espécies, menos semelhantes são essas enzimas.

As β -esterases foram estudadas em várias linhagens de espécies do grupo *repleta*. Intercruzamentos mostram a presença de pelo menos dois genes para esta enzima, localizados no cromossomo II, sendo que um desses genes codifica uma esterase larval e o outro uma esterase presente em todas as fases do desenvolvimento; é o caso das EST-4 (larval) e EST-5 de *D. mojavensis* e *D. arizonae* (Zouros *et al.*, 1982; Zouros & Delden, 1982). EST-4 e EST-5 equivalem às EST-L e EST-8 de *D. mulleri* e *D. arizonae*, segundo Ceron (1988). Mateus (1997) identificou a esterase larval (EST-L) e a esterase principal do adulto em seis espécies do complexo *mulleri* do grupo *repleta* (*D. arizonae*, *D. mulleri*, *D. wheeleri*, *D. navojoa*, *D. mojavensis* e *D. aldrichi*). *Drosophila buzzatii* também apresenta pelo menos duas β -esterases, EST-1 e EST-J (larval) (East, 1982). Como já mencionado, esses genes de *D. buzzatii* foram clonados e seqüenciados por East *et al.* (1990).

A EST-11 do presente trabalho deve corresponder a essas β -esterases EST-5, EST-8 e EST-1. Pelos critérios de inibição, ela mostrou ser uma carboxilesterase, assim como as β -esterases de outras espécies, e está presente em todas as partes do corpo da mosca.

Segundo Healy *et al.* (1996), os principais sítios de síntese dessas enzimas em *Drosophila* são a hemolinfa e o aparelho reprodutivo. No grupo *repleta*, várias espécies foram estudadas quanto à sua expressão tecidual. *D. aldrichi* apresenta a expressão de EST-D, sua β -esterase principal, na hemolinfa e, em menor escala no olho, probóscide e antenas (Kambysellis *et al.*, 1968; Johnson & Bealle, 1968). Em *D. mulleri*, a β -esterase principal, a EST-D (EST-8, segundo Ceron, 1988), está presente em igual quantidade nos dois sexos, somente na hemolinfa (Kambysellis *et al.*, 1968; Johnson & Bealle, 1968). Em *D. buzzatii*, *D. mojavensis* e *D. arizonae*, essa enzima é encontrada na hemolinfa e tecido gorduroso de larvas e adultos (East, 1982; Kambysellis *et al.*, 1968; Johnson & Bealle, 1968).

A EST-11 apresentou seis formas alélicas diferentes, correspondentes às bandas 36, 39, 40, 42, 45 e 46. Os cinco primeiros alelos

estiveram presentes em *D. seriema*. *Drosophila serido* apresentou dois alelos, correspondentes às bandas 45 e 46. Já *D. koepferae* apresentou somente o alelo 46 e *D. buzzatii*, o alelo 45.

O loco para essa β -esterase tem se mostrado um dos portadores de maior número de alelos. Keith (1983) encontrou 12 formas alélicas para o loco Est-5 de *D. pseudoobscura* e quando utilizou mais quatro tipos de condições eletroforéticas, variando a concentração do gel e os tampões, o número de alelos subiu para 41. Cerca de 22 variantes alélicas para Est-6 de *D. melanogaster* foram identificadas. A diferenciação desse grande número de formas alélicas é obtida por meio de combinações de técnicas de eletroforese e também por outros critérios como a termoestabilidade e características bioquímicas adicionais.

No presente trabalho, foram realizados cruzamentos inter e intraespecíficos entre linhagens com diferentes alelos do loco Est-11. O cruzamento interespecífico entre fêmeas B20D2, portadoras do alelo 46, e machos D72M, portadores dos alelos 40 e 42, mostrou a expressão dos dois alelos parentais nos híbridos e, devido à distância entre essas duas bandas, foi possível verificar a presença de uma banda intermediária, indicando tratar-se de uma enzima dimérica.

As esterases isoladas das espécies do subgênero *Drosophila* são diméricas com peso molecular variando entre 100 e 120 kDa (Sasaki & Narise, 1978). Apenas espécies pertencentes ao subgênero *Sophophora* como *D. melanogaster* e suas espécies crípticas *D. simulans* e *D. mauritiana* apresentam uma enzima monomérica de 50 a 60 kDa (Morton & Singh, 1985).

A análise de isoenzimas em híbridos interespecíficos tem sido importante para obter informações a respeito da regulação da expressão gênica. Segundo Dickinson (1980), quando duas espécies que apresentam diferentes alelos para um determinado loco enzimático com diferentes padrões de expressão se cruzam, duas situações podem ocorrer nos seus híbridos: se sítios reguladores de ação *cis* controlam os diferentes padrões de expressão dos dois alelos, então é esperada a expressão de ambos ou se sítios reguladores de ação *trans* são responsáveis por esse padrões, então é esperada a dominância de um padrão parental.

No presente trabalho, nos cruzamentos intraespecíficos envolvendo A95 e D72M e nos cruzamentos interespecíficos entre B31D1 e A95 e entre B20D2 e D72M, pode-se observar a expressão dos dois alelos parentais do loco Est-11 nos respectivos híbridos, sugerindo que os genes para esse loco estejam sob controle de ação *cis*, nas linhagens intercruzadas.

A utilização de técnicas de transferência gênica, evidenciou que o padrão de expressão tecidual do gene Est-5B de *D. pseudoobscura* está sob controle de ação *cis* (Brady *et al.*, 1990). Já as diferenças quantitativas observadas quanto à expressão de Est-6, nas espécies crípticas de *D. melanogaster*, *D. simulans* e *D. mauritiana*, são controladas por fatores de ação *cis* e fatores de ação *trans*. Healy *et al.* (1996) localizaram as diferentes seqüências próximas ao gene Est-6 que regulam sua expressão em diferentes tecidos.

Uma complexidade genética maior foi verificada por Lapenta (1992), quanto à β -esterase, denominada EST-11. Através dos cruzamentos entre B20D2 e A95, ficou evidenciado que o alelo 45 de A95 não se expressava em híbridos (fenótipo 46 para genótipo 45/46) quando proveniente do macho. Já, quando o alelo 45 era proveniente da fêmea, ele se expressava normalmente nos híbridos 45/46.

No presente trabalho, cruzamentos e retrocruzamentos envolvendo as linhagens B20D2 e A95, que são classificadas, respectivamente, como *D. koepferae* e *D. seriema*, foram realizados, objetivando analisar, mais profundamente, essa supressão. Essas duas linhagens intercruzam-se nas duas direções produzindo fêmeas férteis e machos estéreis.

Os retrocruzamentos realizados mostraram que quando as fêmeas híbridas das duas direções de cruzamentos (FAMB e FBMA) foram retrocruzadas com machos A95, produziram híbridos genotipicamente 45/46 com o fenótipo 46 (6% na direção FAMB e 22% na direção FBMA). Este fenótipo não era esperado uma vez que o genótipo 46/46, não era possível devido aos genótipos parentais.

As moscas descendentes desses retrocruzamentos apresentavam uma predominância do material genético de A95 devido aos sucessivos cruzamentos com essa linhagem. Dessa forma poderíamos esperar que apresentassem o fenótipo correspondente ao heterozigoto 46/45 normalmente, isto é, sem a supressão da banda 45, se houvesse envolvimento citoplasmático ou se

dependesse do aumento do número de genes dessa espécie. Entretanto, quando essas fêmeas foram novamente retrocruzadas com machos A95, em cruzamentos em massa, a supressão do alelo 45 paterno foi observada em 37 de 63 descendentes 46/45 da direção FAMB e em 21 de 25 descendentes 46/45 da direção FBMA. Os cruzamentos entre essas fêmeas F2 com machos A95 foram também realizados por casal, sendo possível dessa forma conhecer o fenótipo materno. Nas duas direções, quando a fêmea portadora do fenótipo 46, mas genótipo 45/46, foi retrocruzada com machos A95, nenhum descendente apresentou o fenótipo 45/46, e 68% e 50% dos descendentes, respectivamente, nas direções FAMB e FBMA, apresentaram o fenótipo 46.

Assim, com esses cruzamentos, pode-se verificar que o gene 45 de A95, quando proveniente do macho, não se expressa em moscas heterozigotas entre B20D2 e A95, mesmo com o aumento do material genético de A95 resultante de retrocruzamentos sucessivos com essa linhagem. É interessante ressaltar que as moscas descendentes desses cruzamentos, que apresentam o fenótipo 45 e que provavelmente são genotipicamente 45/45, podem também não estar expressando o alelo paterno, mas a detecção dessa supressão foge ao alcance da técnica empregada.

A outra série de cruzamentos envolveu fêmeas híbridas das duas direções de cruzamentos iniciais das mesmas linhagens, separadamente, com machos B20D2. Nos dois cruzamentos foram observados somente descendentes com os fenótipos esperados, 45/46 e 46. Nos cruzamentos entre fêmeas FBMA com machos B20D2, 42% dos indivíduos apresentaram o fenótipo 45/46, indicando que o gene 45 proveniente da mãe, na qual ele não se expressa, volta a se expressar na sua descendência. Essa não supressão do gene 45 materno na nova geração, é evidenciada nos cruzamentos por casal, envolvendo fêmeas F2 descendentes desses cruzamentos que apresentavam o fenótipo 46, com machos A95. Nenhum descendente apresentou o fenótipo 45, indicando que as fêmeas parentais, provavelmente, eram genotipicamente 46/46.

Cinco cruzamentos por casal de fêmeas descendentes do retrocruzamentos ♀FBMA♂ B (portanto com o predomínio do material genético de B20D2), portadoras do fenótipo 46 e machos A95 foram realizados. No total foram



analisados 137 descendentes, todos apresentando o fenótipo 46. Portanto, novamente ocorreu a supressão do alelo paterno 45.

Podemos apresentar como hipótese, sujeita à confirmação por outras análises, a idéia de que a dominância do alelo 46 sobre o 45 resulta da interação entre os próprios genes e não envolve outros genes ou elementos citoplasmáticos. Podemos supor ainda que a característica do alelo 45 de tornar-se recessivo perante o alelo 46 resulta de uma ação tipo "imprinting", ocorrida nos machos A95. Essa ação é neutralizada na formação dos gametas heterozigotos que manifestam a supressão de modo que em novo cruzamento com machos 46, os gametas 45 oriundos da fêmea formarão indivíduos genotipicamente e fenotipicamente heterozigotos. Tratando-se de cruzamentos interespecíficos (*D. koepferae* e *D. serido*) a dominância gênica não é novidade. Nos híbridos das espécies *D. mulleri* e *D. arizonae* (grupo *repleta*) ocorre supressão do organizador nucleolar da primeira espécie (Bicudo & Richardson, 1977; Leoncini *et al.*, 1996). Contudo, no presente caso de *D. koepferae* e *D. serido*, o problema vem acrescido de outras complexidades não estudadas em híbridos entre *D. mulleri* e *D. arizonae*, por causa da esterilidade de seus cruzamentos recíprocos.

A interação observada entre os alelos 45 e 46 da EST-11 de *D. seriema* (A95) e *D. koepferae* (B20D2) não foi observada considerando o mesmo alelo 45 de *D. seriema* (A95) e o alelo 46 das linhagens B31D1 ou de B59Q1 de *D. serido*. Nesses dois cruzamentos, entre A95 e B31D1 (realizados no presente trabalho) e entre A95 e B59Q1 (realizado por Lapenta, 1992), os híbridos F1 apresentaram as duas bandas, 45 e 46, nas duas direções de cruzamento. Também no complexo *mulleri* do grupo *repleta*, a dominância do organizador nucleolar não se manifesta quando *D. mulleri* ou *D. arizonae* são cruzadas com outras espécies do mesmo complexo (Bicudo & Richardson, 1977). No presente trabalho o alelo 46 de *D. serido* e de *D. koepferae* devem divergir quanto aos seus elementos reguladores, apesar de haver indicação de semelhança no gene estrutural, pelas características de migração, inibição e localização, analisadas.

Tamarina *et al.* (1997) mostraram que há pouca similaridade entre as regiões reguladoras dos genes homólogos Est-6 e Est-5B de *D. melanogaster* e *D. pseudoobscura*, respectivamente. Esses autores sugeriram que a conservação do

padrão de expressão de genes que evoluíram a partir de um ancestral comum pode não ser acompanhada pela preservação de seus elementos reguladores.

Entendemos que essa situação de dominância e a diferença de comportamento do alelo 45, entre linhagens, merece um estudo mais aprofundado, com abordagem molecular que pretendemos realizar futuramente.



V. RESUMO E CONCLUSÕES

O presente trabalho é uma contribuição ao conhecimento dos padrões de esterases de quatro espécies do "cluster" *buzzatii* (*D. koepferae*, *D. seriema*, *D. serido* e *D. buzzatii*), procurando caracterizá-los bioquimicamente, geneticamente e estabelecer, com base nos padrões de bandas, a proximidade filogenética entre as linhagens e espécies utilizadas.

Empregando a eletroforese em gel de poliacrilamida, foram detectadas 62 bandas esterásicas de acordo com a velocidade de migração e afinidade ao substrato. Pelo uso de outras formas de caracterização como testes com inibidores, presença das bandas em fêmeas e machos ou só nos machos e presença em partes do corpo (cabeça, tórax ou abdome) esse número elevou-se para 69 bandas. Essas bandas foram utilizadas para comparação das linhagens analisadas por meio de índices de similaridade (IS), análise de dependência (ANADEP) e análise de "cluster". Destaca-se, entre os resultados dessas comparações, a confirmação da proximidade das linhagens de *D. seriema* entre si e *D. koepferae* entre si. Já entre as linhagens de *D. serido*, duas tiveram comportamento diferenciado das demais e semelhante entre si. Essas linhagens (D69R2 e D69R5) mostraram-se, ainda, mais próximas de *D. buzzatii* que das próprias linhagens de *D. serido*.

A associação de todas as características analisadas mais os testes de cruzamentos levaram ao reconhecimento de 20 tipos esterásicos, provavelmente determinados por 19 locos.

No que se refere à caracterização bioquímica, pelo uso dos inibidores malathion, sulfato de eserina, pCMB, PMSF e iodoacetamida, foram reconhecidas entre 13 das 20 esterases, oito acetilesterases, três carboxilesterases e duas colinesterases. A ausência de arilesterases confirmou dados da literatura referentes a outras espécies de *Drosophila*.

Um número elevado de esterases específicas de machos, sete ao todo, foi observado, das quais duas eram β -esterases e cinco α -esterases. Dentre estas, cinco foram classificadas como acetilesterases. Até agora, somente espécies no "cluster" *buzzatii* e no complexo *D. mulleri* mostraram esterases específicas de machos classificadas como acetilesterases.

Um dos 19 locos, Est-11, apresentou um alto grau de complexidade sendo composto de seis alelos, distribuídos diferentemente nas espécies analisadas (cinco em *D. seriema*, dois em *D. serido*, um em *D. koepferae* e um em *D. buzzatii*). Retrocruzamentos realizados envolvendo espécies portadoras de dois dos alelos desse loco (alelos 45 e 46) confirmaram a supressão que se manifesta nos híbridos de fêmeas de *D. koepferae* com machos de *D. seriema*. A maior parte dos híbridos heterozigotos (cerca de 80%) manifestam apenas o alelo materno, quando o alelo paterno é proveniente de *D. seriema*. Esses retrocruzamentos, envolvendo *D. koepferae* e *D. seriema*, permitiram aventar a hipótese de uma dominância do alelo 46 sobre o 45, decorrente de uma interação entre os próprios genes. Aparentemente, não estão envolvidos elementos citoplasmáticos nem o "background" genético. Os resultados obtidos permitiram supor, ainda, a ocorrência de um fenômeno tipo "imprinting" no alelo paterno de *D. seriema* (A95) que o impede de ser transcrito nos híbridos com *D. koepferae*.

Essa interação alélica não foi observada em híbridos de *D. seriema* (A95) com as linhagens B31D1 e B59Q1 de *D. serido*, também portadoras do alelo 46. Este fato leva à suposição de que os alelos 46 de *D. koepferae* e *D. serido* (B31D1 e B59Q1) sejam diferentes, isto é, tenham divergido no processo evolutivo, uma vez que a relação de dominância com o mesmo gene 45 de *D. seriema* não se manifesta igualmente nos dois casos.

Embora permaneçam muitos pontos para serem esclarecidos, o presente trabalho levanta uma série de questões importantes que suscitam a continuidade dos estudos das esterases, e da interação genética observada e da posição sistemática das linhagens que constituem hoje as diferentes espécies do "cluster" *D. buzzatii*.

VI. SUMMARY AND CONCLUSIONS

Ten strains of two species in the *buzzatii* cluster (*D. serido* and *D. seriema*) were examined as to their esterase patterns. These patterns were studied by polyacrylamide gel electrophoresis where the migration rate of esterases and their substrate specificity to alpha and beta naphthyl acetates were analyzed. Besides, esterase features such as inhibition behavior, presence in males and females and location in the head, thorax or abdomen of flies were examined.

Joining the present data and the data obtained by Lapenta *et al.* (1995) in eight strains of *D. koepferae*, *D. serido*, *D. seriema* and *D. buzzatii*, a total of 69 bands of the 18 strains was detected. This total number was used for comparison of strains and species through the similarity index, the analysis of dependence and the cluster analysis. An important result of these comparisons was the confirmation of the existence of a high similarity among *D. seriema* strains and among *D. koepferae* strains. However, they also indicated a differentiation among the *D. serido* strains examined. Two *D. serido* strains (D69R2 and D69R5) differed from the remaining strains in the same species and showed to be closer to *D. buzzatii*.

The esterase band features already mentioned, associated with results of intercross tests between strains, lead to the recognition of 20 esterase types, probably due to 19 genetic loci. Inhibition tests, using malathion, eserine, pCMB, PMSF and iodineacetamide showed, among these types, the presence of eight acetyl esterases, three carboxyl esterases and two cholinesterases. The remaining seven esterase types were not studied in this respect. Aryl esterases were absent in these species as well as in every *Drosophila* species examined till now.

Seven esterases were male-specific, a number that may be considered high. Among them, two were β -esterases and five were alpha-esterases. Five of the seven were acetyl esterases. Until now, only species in the



D. buzzatii cluster and in the *mulleri* complex showed male-specific esterases classified as acetylerases.

One of the 19 loci, the Est-11 locus, showed to be very complex, with five alleles distributed differently among the species analyzed: five were present in *D. seriema*, two in *D. serido*, one in *D. koepferae* and one in *D. buzzatii*. Crosses involving species bearing two of the alleles at this locus (alleles 45 and 46) confirmed the suppression of allele 45 in hybrids between *D. koepferae* females (strain B20D2) and *D. seriema* males (strain A95), previously observed by Lapenta (1992).

A more extensive study of this suppression, made now through a series of backcrosses, showed that suppression occurs in about 80% of hybrids bearing 45/46 genotypes whose allele 45 comes from A95 males and whose allele 46 comes from B20D2 females. These results lead to the hypothesis of an interspecific dominance of allele 46 over 45 due to interaction between the two genes. Apparently, other genes and cytoplasmic factors are not involved. The results lead also to the hypothesis that a phenomenon similar to imprinting might be operating on allele 45, in A95 males.

Suppression described did not occur when the same *D. seriema* strain (A95) was intercrossed with B31D1 or B59Q1, both *D. serido* strains that also have allele 46, suggesting that alleles 46 from *D. koepferae* and *D. serido* diverged during the evolutionary process.



VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALDRIGE, W. N. Serum esterases. Two types of esterase (A and B) hydrolysing p-nitrophenil acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination. *Biochem. J.*, v. 53, p. 110-117, 1953.
- BAIMAI, V., SENE, F. M., PEREIRA, M. A. Q. R. Heterochromatin and karyotypic differentiation of some neotropical cactus breeding species of the *Drosophila repleta* species group. *Genetica*, v. 60, n. 2, p. 81-91, 1983.
- BAKER, W. K. Evolution of the alpha-esterase duplication within the montana subphylad of the virilis species group of *Drosophila*. *Genetics*, v. 94, p. 733-748, 1980.
- BECKMAN, L., JOHNSON, F. M. Esterases variation in *Drosophila melanogaster*. *Hereditas*, v. 51, p. 212-220, 1964.
- BICUDO, H. E. M. C., RICHARDSON, R. H. Gene regulation in *Drosophila mulleri*, *D. arizonensis* and their hybrids: the nucleolar organizer. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, v. 74, p. 3498-3502, 1977.
- BIZZO, N. M. V. *Estudo sobre a biologia e isolamento reprodutivo em Drosophila serido*. São Paulo. 1983. 71p. Dissertação (Mestrado), Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.
- BOWNES, M. The role of juvenile hormone ecdysone and the ovary in the control of *Drosophila* vitellogenesis. *J. Insect Physiol.*, v. 35, 409-413, 1989.
- BRADY, J. P., RICHMOND, R. C. An evolutionary model for the duplication and divergence of esterase genes in *Drosophila*. *J. Mol. Evol.*, v. 34, p. 506-521, 1992.
- BRADY, J. P., RICHMOND, R. C., OAKESHOTT, J. G. Cloning of the esterase-5 locus from *Drosophila pseudoobscura* and comparison with its homologue in *D. melanogaster*. *Mol. Evol. Biol.*, v. 7, p. 525-546, 1990.
- CAMPBELL, P. M., HEALY, J. M., OAKESHOTT, J. G. Characterization of juvenile hormone esterase in *Drosophila melanogaster*. *Insect. Biochem. Biol.*, v. 22,



n. 7, p. 665-677, 1992.

✂ CARRASCO, C. E., PÉREZ-CHIESA, Y., BRUCK, D. The esterases of *Drosophila dunni*. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 79B, n. 3, p.37, 1984.

CERON, C. R. *Padrão de esterases no desenvolvimento de **Drosophila mulleri**, **D. arizonensis** e seus híbridos*. São Paulo, 1988. 142p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Genética). Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.

CERON, C. R., SANTOS, J. R., BICUDO, H. E. M. C. The use of gelatin to dry cellophane wound slab gels in na embroidering hoop. *Rev. Brasil. Genet.*, v, 15, n. 1, p. 201-203, 1992.

COLLET, C., NIELSEN, K. M., RUSSEL, R. J., KARL, M., OAKESSHOT, J. G., RICHMOND, R. C. Molecular analysis of duplicated esterase genes in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Biol. Evol.*, v.7, p. 9-28, 1990.

CORDEIRO, J. A. Analysis of dependendy. Campinas: Instituto de Matemática da Universidade Estadual de Campinas (Relatório Técnico, 48/87).

COUNDRON, T. A. DUNN, P. E. SEBALLOS, H. L., WHAREN, R. E., SANBURG, L. L., LAW, J. H. Preparation of homogeneous juvenile hormone specific esterase from the haemolymph of tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Insect Biochem.*, v. 11, n. 4., p. 453-461, 1981.

DEMEREK, M., KAUFMANN, B. P. *Drosophila* guide. Baltimore, *Baltimore Press*, 1945

DICKINSON, W. J. Complex cis-acting regulatory genes demonstrated in *Drosophila* hybrids. *Develop. Genet.*, v. 1., p. 229-240, 1980.

DUMANCIC, M. M., OAKESHOTT, J. G. RUSSEL, R. J. Characterization of the EstP Protein in *Drosophila melanogaster* and its conservation in Drosophilids. *Biochem. Genet.*, v. 35, n. 7/8, p. 251-269, 1997.

EAST, P. D. Non-specific esterases of *Drosophila buzzatii*. In: *Ecological genetics and Evolution. The cactus-yeast Drosophila model system*. I. S. F. Baker and



W. T. Stamer editors. *Academic Press Australia*, p. 323- 338, 1982.

EAST, P. D. GRAHAM, A., WHITINGTON, G. Molecular isolation and preliminary characterization of a duplicated esterase locus in *Drosophila buzzatii*. In: *Ecological genetics and Evolutionary Genetics of Drosophila*. I. S. F. Baker, W. T. Stamer and Macinture, R. J. editors. *Plenum Press New York*, p. 389-406, 1990.

FOURNIER, D., BRIDE, J. M., HOFFMANN, F., KARCH, F. Acetylcholinesterase: two types of modifications confer resistance to insecticide. *J. Biol. Chem.*, v. 267, n. 20, p.14270-14274, 1992.

FOURNIER, D., MUTERO, A., PRALAVORIO, M., BRIDE, J. M. *Drosophila* acetylcholinesterase mechanisms of resistance to organophosphates. *Chem. Biol. Interactions*, v. 87, p. 233-238, 1993.

HEALY, M. J., DUMANCIC, M. M., OAKESHOTT, J. G. Biochemical and physiological studies of soluble esterases from *Drosophila melanogaster*. *Biochem. Genet.*, v. 29, n. 7/8, 1991.

HEALY, M. J., DUMANCIC, M. M., CAO, A., OAKESHOTT, J. G. Localization of sequences regulation ancestral and acquired sites of esterase 6 activity in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Evol. Biol.*, v. 13, n. 6, p. 784-797, 1996.

✓ JOHNSON, F. M., BEALLE, S. Isozymes variability in species of the genus *Drosophila*. V. Ejaculatory bulb esterases in *Drosophila* phylogeny. *Biochem. Genet.*, v. 2, p. 1-18, 1968.

KAMBYSELLIS, M. P., JOHNSON, F. M., RICHARDSON, R. H. Isoenzyme variability in species of the genus *Drosophila*. IV. Distribution of the esterases in the body tissues of *Drosophila aldrichi* and *D. mulleri* adults. *Biochem. Genet.*, v.1, p. 249-265, 1968.

KAROTAN, J., OAKESHOTT, J. G. Regulatory aspects of esterase-6 activity variation in sibling *Drosophila* species. *Heredity*, v. 71, p. 41-50, 1993.

KAROTAN, J., DELVES, A. C., OAKESHOTT, J. G. Conservation and change in structural and 5' flanking sequences of esterase 6 in sibling *Drosophila*



species. *Genetica*, v. 88, p. 11-28, 1993.

KEITH, T. P. Frequency distribution of esterase-5 alleles in the two populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics*, v. 105, p. 135-155, 1983.

KHLEBODAROVA, T. M., GRUNTENKO, N. E., GRENBACH, L. G., SUKHANOVA, M. Z., MAZUROV, M. M., RAUSCHENBACH, I. Y., TOMAS, B. A., HAMMOCK, B. D. A comparative analysis of juvenile hormone metabolizing enzymes in two species of *Drosophila* during development. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, v. 26, n. 8-9, p. 829-835, 1996.

KUHN, G. C. S., RUIZ, A., ALVES, M. A. R., SENE, F. M. The metaphase and polytene chromosomes of *Drosophila seriema* (*repleta* group; *mulleri* sub group). *Rev. Brasil. Genet.*, v. 19, n. 2, p. 209-216, 1996.

LAPENTA, A. S. *Padrões de esterases na superespécie **Drosophila serido** e em **D. buzzatii***. São José do Rio Preto, 1992. 123p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Genética). Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP.

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

LEONCINI, O., TOVAR, F. J., BICUDO, H. E. M. C. Molecular evidence of ribosomal DNA (rDNA) amplification of a minichromosome derived from *Drosophila arizonae* in *D. mulleri*-*D. arizonae* hybrid males. *Braz. J. Genet.*, v. 19, n. 1, p. 43-45, 1996.

LUDWIG, M. Z., TAMARINA, N. A., RICHMOND, R. Localization of sequences controlling the spacial, temporal, and sex-specific of the esterase 6 locus in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Sci. USA*, v. 90, p. 6233-6237, 1993.

LUNDAY, A. J., FARMER, J. L. Tissue localization of esterase-5 in *Drosophila pseudoobscura*. *Biochem. Genet.*, v. 2, p. 453-463, 1983.

MADI-RAVAZZI, L., BICUDO, H. E. M. C. Differentiation of *Drosophila serido* (isofemale line A95F3) and *D. koepferae* (isofemale line B20D2): reproductive

isolation, development time and polytene chromosome banding patterns. *Rev. Brasil. Genet.*, v. 15, p. 831-852, 1992.

MADI-RAVAZZI, L., BICUDO, H. E. M. C., MANZATO, J. A. Reproductive compatibility and chromosome pairing in the *Drosophila buzzatii* complex. *Cytobios*, v. 89, 21-30, 1997.

MANE, S. D., TOMPKINS, L., RICHMOND, R. C. Male esterase 6 catalyses the synthesis of a sex pheromone in *Drosophila melanogaster* females. *Science*, v. 22, p. 419- 421, 1983.

MANFRIN, M. H. *Filogenia do "cluster" buzzatii ((Diptera, Drosophilidae), inferida a partir do DNA mitocondrial, com ênfase nas populações brasileiras do "subcluster" serido*. Ribeirão Preto, 1997. 73p. Tese (Doutorado em Genética). Faculdade de Medicina, USP

MARDIA, K. V., KENT, J. T. BIBBY, J. M. Multivariate analysis. *Ac. Press.*, NY, 1980.

MATEUS, R. P. *Caracterização da esterase larval em espécies de Drosophila do complexo mulleri*. São José do Rio Preto, 1997. 74p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Genética). Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas , UNESP.

MEIKLE, D. B., RICHMOND, R. C. Localization and longevity of seminal fluid esterase 6 in mated female *Drosophila melanogaster*. *J. insect. Physiol.*, v. 36, p. 93-101, 1990.

MONTEIRO, S. G. *Morfometria multivariada de populações naturais de Drosophila serido*. Ribeirão Preto, 1997. 112p. Tese (Doutorado em Genética). Faculdade de Medicina, USP.

MORAES, M. A. M. Estudo do comportamento sexual de *Drosophila serido*. *Rev. Brasil. Genet.*, v. 14, n. 3, p. 104, 1991.

MORTON, R. A., SINGH, R. S. The association between malathion resistance and acetylcholinesterase in *Drosophila melanogaster*. *Biochem. Genet.*, v. 20, p. 179, 1985.



- MYERS, M. A., HEALY, M. J., OAKESHOTT, J. G. Effects of the residue adjacent to the reactive serine on the substrate interaction of *Drosophila* esterase 6. *Biochem. Genet.*, v. 31, p. 259-278, 1993.
- MYERS, M. A., HEALY, M. J., OAKESHOTT, J. G. Mutational analysis of N-linked glycosilation of esterase 6 in *Drosophila melanogaster*. *Biochem. Genet.*, v. 34, n. 5/6, p. 201-218, 1996.
- NARISE, S. Esterase isozymes of *Drosophila virilis*: purification and properties of α and β esterases isozymes. *Jpn. J. Genet.*, v.48, n. 2, p. 119-132, 1973.
- NARISE, S., HUBBY, J. L. Purification of esterase-5 from *Drosophila pseudoobscura*. *Biochem. Biophys. Acta.*, v. 122, p. 281-288, 1966.
- OAKESHOTT, J. G., PAPENRECHT, E. A., BOYCE, T. M., HEALY, M. J., RUSSEL, R. J. Evolutionary genetics of *Drosophila* esterases. *Genetica*, v. 90, p. 239-268, 1993.
- OAKESHOTT, J. G., BOYCE, T. M., RUSSEL, R. J., HEALY, M. J. Molecular insight into the evolution of an enzyme; esterase 6 in *Drosophila*. *TREE*, v. 10, n. 3, p. 103-100, 1995.
- OAKESHOTT, J. G., COLLET, C., PHILLIS, R. W., NIELSEN, K. M., RUSSEL, R. J. CHAMBERS, G. K., ROSS, V., RICHMOND, R. Molecular cloning and characterization of esterase-6, a serine hydrolase of *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 84, p. 3359-3363, 1987.
- PEN, J., RONGEN, H. A. H., BEINTEMA, J. J. Purification and properties of esterase-4 from *Drosophila mojavensis*. *Biochem. Biophys. Acta.*, v. 789, p. 203-209, 1984.
- PEREIRA, M. A. Q. R., VILELA, C. R., SENE, F. M. Notes on breeding and feeding site of some species of the *repleta* group of the genus *Drosophila* (Diptera, Drsophilidae). *Ciênc. Cult.*, v. 35, p. 1313-1319, 1983.
- PRALAVORIO, M., FOURNIER, D. *Drosophila* acetylcholinesterase: characterization of different mutants resistant to insecticides. *Biochem. Genet.*, v. 30, n. 1/2, p.



77-83, 1992.

PROCUNIER, W. S., SMITH, J. J., RICHMOND, R. C. Physical mapping of the esterase-6 locus of *Drosophila melanogaster*. *Genetica*, v. 84, p. 203-208, 1991.

RICHMOND, R. C., SENIOR, A. Esterase 6 of *Drosophila melanogaster*. Kinetics of transfer to females, decay in females and males recovery. *J. Insect Physiol.*, v. 27, n. 12, p. 849-853, 1981.

RITS, F. R. C. *Padrão de esterases em Megaselia scalaris*. São José do Rio Preto, 1997. 126p. Tese (Doutorado em Ciência Biológicas - Genética) Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP.

ROBIN, G. C., RUSSEL, R. J., MEDVECZKY, K.M., OAKESHOTT, J. G. Duplication and divergence of the α -esterase cluster of *Drosophila melanogaster*. *J. Mol. Evol.*, v. 43, p. 241-252, 1996.

RUIZ, A., WASSERMAN, M. Evolutionary cytogenetic of the *Drosophila buzzatii* species complex. *Heredity*, v. 70, p. 597-603, 1993.

RUIZ, A., FONTDEVILA, A., WASSERMAN, M. The evolutionary history of *Drosophila buzzatii*. III. Cytogenetic relationships between two sibling species of the *buzzatii* cluster. *Genetics*, v. 101, p. 503-508, 1982.

RUIZ, A., CANSIAN, A. M., ALVES, M. R., SENE, F. M. Alteração na filogenia cromossômica do subcluster *D. serido*. *Rev. Brasil. Genet. Suppl.* V. 19, p. 269, 1996.

RUSSEL, R. J., ROBIN, G. C., KOSTAKOS, P., NEWCOMB, R. D., BOYCE, T. M., MEDVECZKY, K.M., OAKESHOTT, J. G. Molecular cloning of an α -esterase gene cluster on chromosome 3R of *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, v. 26, n. 3, p. 235-247, 1996.

SASAKI, M., NARISE, S. Molecular weight of esterase isozyme of *Drosophila* species. *Dros. Inform. Serv.*, v. 53, p. 123-124, 1978.

SCOTT, D. Inhibition of female *Drosophila melanogaster* remating by seminal fluid

protein (esterase-6). *Evolution*, v. 40, n. 5, p.1084-1091, 1986.

SENE, F. M., PEREIRA, M. A. Q. R., VILELA, C. R. Contrasting patterns of differentiation inferred from traditional genetic markers in the process of speciation. *Pacific. Science*, v.42, p. 81-88, 1988.

SENE, F. M., PEREIRA, M. A. Q. R., VILELA, C. R. Evolutionary aspects of cactus breeding *Drosophila* species in South America. In: *Ecological genetics and Evolution. The cactus-yeast Drosophila model system*. I. S. F. Baker and W. T. Stamer editors. *Academic Press Australia*, p. 97- 106, 1982.

✂ SERGEEV, P. V., YENIKOLOPOV, G. N., PEUNOVA, N. I., KUZIN, B. A., KHECHUMIAN, R. A., KOROCKIN, L. I., GEORGIEV, G. P. Regulation of tissue-specific expression of the esterase S gene in *Drosophila virilis*. *Nucl. Acids Res.*, v. 21, n. 15, p. 3545-3551, 1993.

SHAPIRO, A. B., WHELOCK, G. D., HAGEDORN, H. H., BAKER, F. C., TSAI, L. W., SCHOOLEY, D. A. Juvenile hormone and juvenile hormone esterase in adult females of mosquito *Aedes aegypti*. *J. Insect. Physiol.*, v. 32, p. 867-877, 1986.

SILVA, A. F. G., SENE, F. M. Morphological geographic variability in *Drosophila serido* (Diptera: Drosophilidae). *Revta. Bras. Entomol.*, v. 35, p. 455-468, 1991.

SPACKMAN, M. E., OAKESHOTT, J. G., SMYTH, K. A., MEDVECZKY, K. M., RUSSEL, R. J. A cluster of esterase genes on chromosome 3R of *Drosophila melanogaster* includes homologues of esterase genes conferring insecticide resistance in *Lucilia cuprina*. *Biochem. Genet.*, v. 32, n. 1/2, p. 39-62, 1994.

TAMARINA, N. A., LUDIWIG, M. Z., RICHMOND, R. C. Divergent and conserved features in the spatial expression of the *Drosophila pseudoobscura* esterase-5B gene and esterase-6 gene of *Drosophila melanogaster*. . *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, v. 94, p. 7735-7741, 1997.

TIDON-SKLORZ, R. *Identificação da fauna de Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) da Cadeia do Espinhaço, e análise morfométrica das populações da espécie



politépica D. serido. Ribeirão Preto, 1992. 115p. Tese (Doutorado em Genética). Faculdade de Medicina, USP.

TIDON-SKLORZ, R., SENE, F. M. *Drosophila seriema* n. sp.: new member of the *Drosophila serido* (Diptera: Drosophilidae) superspecies taxon. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, v. 88, p. 139-142, 1995a.

TIDON-SKLORZ, R., SENE, F. M. Evolution of the *buzzatii* cluster (*Drosophila repleta* species group) in middle south america. *Evolución Biológica*, v. 8, n. 9, p. 71-85, 1995b.

TOSI, D., SENE, F. M. Further studies on chromosomal variability in the complex taxon *Drosophila serido* (Diptera: Drosophilidae). *Rev. Brasil. Genet.*, v. 12, p. 729-745, 1989.

WHITNEY, P. J., VAUGHAN, J. G., HEALE, J. B. A disc electrophoretic study of the proteins of *Verticillium albo-atrum*, *Verticillium dahliae* and *Fusarium oxysporum* with reference to their taxonomy. *J. Exp. Bot.*, v. 19, n. 60, p. 415-426, 1968.

WRIGHT, T. R. F. The genetics of an esterase in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, v. 48, p. 787-801, 1963.

YAMAMOTO, K., CHADAREVIAN, A., PELLEGRINI, M. Juvenile hormone action mediated in male accessory glands of *Drosophila* by calcium and Kinase C. *Science*, v. 239, p. 916-919, 1988.

ZOUROS, E., DELDEN, W. Substrate preference polymorphism at an esterase locus of *Drosophila mojavensis*. *Genetics*, v. 100, p. 307-314, 1982.

ZOUROS, E., DELDEN, W., ODENSE, R., DIJK, H. An esterase duplication in *Drosophila*: differences in expression of duplicate loci within and among related species. *Biochem. Genet.*, v. 20, p. 929-942, 1982.



