

VÍTOR BARALDI THOMAZINE

**Adaptabilidade diferencial das variantes moleculares “*slow*” e
“*fast*” da esterase-5 de *Drosophila mulleri***

Thomazine, Vítor Baraldi.

Adaptabilidade diferencial das variantes moleculares “*slow*” e “*fast*” da esterase-5 de *Drosophila mulleri*. / Vítor Baraldi Thomazine. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2007.

51 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Carlos Roberto Ceron

Co-orientador: Gustavo Orlando Bonilla Rodríguez

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

1. Drosophila. 2. Esterases. 3. Aloenzimas - Purificação. 4. *Drosophila mulleri*. I. Ceron, Carlos Roberto. II. Bonilla-Rodríguez, Gustavo Orlando. III. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título.

CDU - 575

VÍTOR BARALDI THOMAZINE

Adaptabilidade diferencial das variantes moleculares “*slow*” e “*fast*” da esterase-5 de
Drosophila mulleri

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

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Carlos Roberto Ceron
Professor Assistente Doutor
UNESP - São José do Rio Preto
Orientador

Prof. Dr. Hamilton Cabral
Professor Doutor
Universidade de São Paulo

Prof^a. Dr^a. Fátima Pereira de Souza
Professor Assistente Doutor
UNESP - São José do Rio Preto

São José do Rio Preto, 29 de fevereiro de 2008

O presente trabalho foi realizado nos laboratórios de Genética Bioquímica, Bioquímica de Proteínas e Genética de Populações do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE) de São José do Rio Preto, da Universidade Estadual Paulista (UNESP), sob a orientação do Prof. Dr. Carlos Roberto Ceron e co-orientação do Prof. Dr. Gustavo Orlando Bonnila-Rodríguez, com o auxílio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Dedico

Aos meus pais, Anibal e Maria Helena,
ao meu irmão, Renan,
à minha namorada, Andresa,
e a todos os meus amigos.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Carlos Roberto Ceron, pela orientação, amizade e respeito desde o estágio básico.

Ao Prof. Dr. Gustavo Orlando Bonnila-Rodríguez, pela co-orientação.

À Eliani, técnica do laboratório, por toda a ajuda e paciência no laboratório.

Ao Prof. Dr. Eduardo Alves de Almeida pela ajuda com os ensaios enzimáticos.

Aos meus amigos de laboratório, pela ajuda e companhia nesta jornada.

Aos meus amigos de república e de pós-graduação.

À Capes, pelo auxílio financeiro.

À minha namorada Andresa, pelo incentivo, carinho e compreensão.

À minha família, que é tudo em minha vida, sem a qual não estaria aqui.

À Deus,

Obrigado

*“Nada é tão contagioso como o entusiasmo.
Ele comove pedras. Encanta brutos.
A verdade é que nada se realiza sem ele;”*

Grantland Rice

RESUMO

Vários trabalhos na literatura têm discutido a importância dos polimorfismos enzimáticos em relação ao estado de ser adaptado dos organismos. Nesse trabalho foram estudadas algumas propriedades bioquímicas das aloenzimas EST-5^S e EST-5^F de *Drosophila mulleri*, que poderiam estar relacionadas às diferenças em valores adaptativos em indivíduos que apresentam essas variantes enzimáticas. Os resultados sugerem que a aloenzima EST-5^S apresenta maior resistência à desnaturação térmica e a agentes caotrópicos, bem como maior atividade em altas concentrações salinas. Os resultados do experimento de produtividade a 29° C mostram que os indivíduos homozigotos para o alelo *Est-5^S* deixam mais descendentes que os indivíduos homozigotos para o alelo *Est-5^F*. Quanto as características cinéticas, essas aloenzimas não diferem de forma significativa. Os valores de V_{max} e K_m obtidos para as enzimas não purificadas foram, respectivamente, para a EST-5^S: 32,54 $\mu\text{M}/\text{min}$ e 1,43 mM, e para a EST-5^F: 33,34 $\mu\text{M}/\text{min}$ e 1,54 mM. A purificação das aloenzimas foi obtida pela separação em SDS-PAGE seguida da remoção dos géis, eluição em agitador magnético para a difusão das enzimas e posterior concentração desse material em membrana filtrante de 50 kDa (Millipore). O concentrado foi então analisado quanto à atividade esterásica e quanto à pureza (SDS-PAGE). Ambas as aleloenzimas apresentaram uma massa molecular entre 66 e 68 kDa para a subunidade, em SDS-PAGE. Os resultados do presente estudo não são concordantes com a hipótese de neutralidade para a manutenção dos polimorfismos, tanto em populações naturais como de laboratório, indicando a atuação da seleção natural sobre as aleloenzimas estudadas.

ABSTRACT

Several works in literature have discussed the importance of the enzymatic polymorphisms in respect to the state of being adapted of the organisms. In this work, some biochemical properties of *Drosophila mulleri* of the allozymes EST-5^S and EST-5^F, which could be related to the differences in fitness values in individuals that present those enzymatic variants, were studied. The results suggest that the EST-5^S allozyme presents larger resistance on the thermic denaturation and the chaotropics agents, as well as higher activity in elevated salt concentrations. The results of the productivity experiment at 29°C show that the homozygous individuals to the *Est*-5^S allele let more offspring than the homozygous individuals to the *Est*-5^F allele. Regarding the kinetic characteristics, those allozymes do not differ in a significant way. The K_m and V_{max} values obtained for crude extracts allozymes were, respectively, to the EST-5^S: 32,54 $\mu\text{M}/\text{min}$ and 1,43 mM, and to the EST-5^F: 33,34 $\mu\text{M}/\text{min}$ and 1,54 mM. The purification of the allozymes was obtained by the separation on SDS-PAGE followed by their removal from gels, elution in magnetic shaker for the diffusion of the enzymes and concentration of this material in filtrant membranes of 50 kDa (Millipore). The concentrated materials were then analyzed regarding to their enzymatic activity and to the purity (SDS PAGE). Both allozymes presented subunit molecular weights around 66 and 68 kDa on SDS PAGE. The results of the present study do not agree to neutrality hypothesis for polymorphisms maintenance, in natural and laboratory populations, indicating a natural selection action of the on the studied allozymes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E TABELA

Figura 1	Gel não-desnaturante, corado especificamente para esterases, ilustrando o padrão de bandas de indivíduos homozigotos e heterozigotos para os alelos S e F do gene <i>Est-5</i> .	18
Figura 2	Gel não-desnaturante, corado especificamente para esterases, com amostras pré-incubadas a temperatura de 50°C.	19
Figura 3	Gel não-desnaturante, corado especificamente para esterases, com amostras pré-incubadas a temperatura de 55°C.	20
Figura 4	Gel não-desnaturante, corado especificamente para esterases, com amostras pré-incubadas em uréia.	21
Figura 5	Gel não-desnaturante, corado especificamente para esterases, com amostras pré-incubadas em NaCl.	22
Figura 6	Gel SDS-PAGE, corado com Nitrato de Prata, mostrando as aleloenzimas EST-5 ^S e EST-5 ^F purificadas.	24
Figura 7	Gel SDS-PAGE, corado especificamente para esterases, mostrando a atividade catalítica das aleloenzimas EST-5 ^S e EST-5 ^F purificadas sobre o substrato β -naftil-acetato.	25
Figura 8	Gel não-desnaturante, corado especificamente para esterases, mostrando a ação do PMSF sobre a esterase-2 de <i>D. mulleri</i> .	28
Figura 9	Gráfico ilustrando a perda da atividade enzimática das amostras pré-incubadas a temperatura de 50°C.	29
Figura 10	Gráfico ilustrando a perda da atividade enzimática das amostras pré-incubadas a temperatura de 55°C.	29
Figura 11	Gráfico ilustrando a perda da atividade enzimática das amostras pré-incubadas a temperatura de 60°C.	30
Figura 12	Gráfico ilustrando a perda da atividade enzimática das amostras pré-incubadas com uréia.	30

Figura 13	Gráfico ilustrando a perda da atividade enzimática das amostras pré-incubadas com NaCl.	31
Figura 14	Gráfico ilustrando a perda da atividade enzimática das amostras em diferentes concentrações do triton X-100.	31
Figura 15	Gráfico ilustrando o perfil de pH das aleloenzimas da esterase-5.	32
Tabela 1	Produtividade média de descendentes por casal a 20 e 29 °C para as linhagens <i>Est-5^S</i> e <i>Est-5^F</i> .	32
Figura 16	Produtividade média de descendentes por casal a 20 (A) e 29°C (B) para as linhagens <i>Est-5^S</i> e <i>Est-5^F</i> .	33

.

.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

pCMB	Para-cloromercuriobenzoato.
bp	Pares de bases nucleotídicas.
kDa	Quilo dalton, medida de massa molecular.
PAGE	Gel de poliacrilamida
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida com SDS
ASN	Asparagina, aminoácido.
ASP	Ácido Aspártico, aminoácido.
THR	Treonina, aminoácido.
ALA	Alanina, aminoácido.
xg	Força centrífuga.
C	Porcentagem de ligações cruzadas no gel, entre a bis-acrilamida e a acrilamida.
TRIS	Tri(hidroximetil)aminometano.
HCl	Ácido clorídrico.
PMSF	Fluoreto de fenil metilssulfonila
DTNB	Ácido 5,5'-dithiobis-2-dinitrobenzóico

SUMÁRIO

I. Introdução	1
I.1 O grupo <i>repleta</i>	1
I.2 Esterases como isoenzimas	2
I.3 O cluster das β -esterases	3
I.4 Polimorfismo no “cluster” das β -esterases do complexo <i>mulleri</i>	5
II. Objetivos	9
III. Material e Métodos	10
III.1 Obtenção e manutenção das moscas	10
III.2 Preparo das amostras	10
III.3 Quantificação da proteína total dos extratos brutos	10
III.4 Teste de resistência à temperatura	10
III.5 Teste de resistência a agentes desnaturantes	10
III.6 Efeito da concentração salina	11
III.7 Teste do efeito do triton X-100	12
III.8 Teste do pH	12
III.9 Mensuração da atividade catalítica	12
III.10 Padronização da Eletroforese	12
III.11 Detecção das esterases nos géis	13
III.12 Ação do fluoreto de fenil metilssulfonila (PMSF) sobre as esterases de <i>D. mulleri</i> sulfonila (PMSF)	13
III.13 Ensaaios enzimáticos	13
III.14 Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE)	14
III.15 Metodologia de purificação das variantes da EST-5	14
III.16 Estudo da produtividade	15
IV. Resultados	16
IV.1 Análise comparativa da atividade enzimática das aloenzimas sobre diferentes condições físico-químicas	16
IV.2 Purificação das aloenzimas EST-5 ^S e EST-5 ^F	23

IV.3 Ensaaios enzimáticos após diferentes condições físico-químicas	26
IV.4 Caracterização Cinética	27
IV.5 Estudo da produtividade	27
V. Discussão	34
VI. Conclusão	41
Referências	42

I - INTRODUÇÃO

I.1 - O grupo *repleta*

O grupo *repleta* do gênero *Drosophila* (Díptera; Drosophilidae) constitui um bom modelo biológico para estudos evolutivos. Atualmente, este grupo compreende cerca de 100 espécies distribuídas nos subgrupos: *fasciata*, *hydei*, *mercatorum*, *mulleri* e *repleta*, dentre os quais o subgrupo *mulleri* é o mais numeroso, contando atualmente com 44 espécies. Cada subgrupo, por sua vez, tem sido subdividido em complexos e *clusters*. O conhecimento atual sobre a filogenia do grupo *repleta* está baseado em dados morfológicos (Throckmorton, 1982a; Vilela, 1983), citológicos (Wasserman, 1982, 1992; Powell, 1997), aloenzimáticos (Zouros, 1973; Richardson et al. 1975; Richardson e Smouse, 1976; Richardson et al. 1977; Heed et al. 1990; Mateus e Sene, 2003) e moleculares (Sullivan et al. 1990; Russo et al. 1995, Spicer, 1995, 1996; Rodríguez et al. 2000; Durando et al. 2000; Tartarenskov e Ayala, 2001).

Como já mencionado, dentro do grupo *repleta* o subgrupo *mulleri* é o mais numeroso com 44 espécies. Este grupo apresenta cinco complexos de espécies, a saber: *anceps*, *eremophila*, *meridiana*, *mulleri* e *buzzatii*. Por sua vez, o complexo *mulleri* reúne as espécies: *Drosophila arizonae*, *Drosophila mojaviensis*, *Drosophila navajoa*, *Drosophila aldrich*, *Drosophila whelleri* e a espécie utilizada neste projeto, a *Drosophila mulleri*. Análises filogenéticas moleculares confirmaram a solidez monofilética do complexo *mulleri* que consiste de membros estritamente relacionados (Durando et al. 2000), o que faz com que esse complexo seja muito utilizado para diversos estudos genéticos e evolutivos.

As espécies do grupo *repleta* ocupam diferentes habitats, mas sem dúvida, a característica mais notável é a capacidade de utilizarem os cladódios em decomposição de vários tipos de cactos neotropicais para realizar a ovoposição e se alimentar de leveduras presentes nesses vegetais. Essa adaptação tem permitido às espécies do grupo ocuparem desertos e as zonas áridas do Novo Mundo e facilitado a exploração de nichos desocupados, permitindo uma rápida evolução e formação de novas espécies (Ruiz e Fontdevila, 1981; Heed, 1982; Etges et al. 2001; Tidon-Sklorz e Sene, 2001). O grau de utilização dos tecidos cactáceos é variado entre as espécies. Por exemplo, a maioria das espécies do subgrupo *mulleri* utiliza as cactáceas como local de criação, chegando a ser indispensável à vida de certas espécies como *Drosophila mojaviensis* que é cactofílica restrita. Já as espécies do grupo *fasciata*, *hydei*, *mercatorum* e *repleta* são generalistas, alimentando-se de outros frutos vegetais (Pereira et al. 1983).

I.2 – Esterases como isoenzimas

Isoenzimas podem ser definidas segundo a comissão de Nomenclatura Bioquímica da IUPAC-IUB (*International Union of Pure and Applied Chemistry and International Union of Biochemistry*), de 1977, “como múltiplas formas moleculares de uma enzima que ocorrem dentro de uma única espécie, como resultado da presença de mais de um gene estrutural”. A importância das isoenzimas do ponto de vista evolutivo, bioquímico e fisiológico, torna-se evidente quando são analisadas algumas de suas características. Formas moleculares múltiplas das enzimas são observadas em todos os organismos, podendo assim desempenhar uma função específica no metabolismo em harmonia com outras enzimas no contexto celular. As isoenzimas frequentemente apresentam distribuições diferentes, tanto celular como tecidual, o que confere versatilidade, flexibilidade e precisão em termos das várias funções metabólicas desempenhadas pelos tecidos. A origem destas formas moleculares múltiplas pode ser atribuída à presença de mais de um loco gênico, ou a mais de um alelo em um mesmo loco. Assim, em ambos os casos, os produtos gênicos são diferentes, e no último caso, em particular, as formas enzimáticas podem ser chamadas de aleloenzimas (ou aloenzimas). Esta classe de isoenzimas é a responsável pelos polimorfismos enzimáticos observados em populações naturais.

As aloenzimas apresentam diferentes padrões de mobilidade eletroforética resultantes de diferenças alélicas e têm se constituído um excelente material para o estudo da questão da adaptabilidade ou neutralidade dos polimorfismos, pois suas propriedades diferem entre os indivíduos de uma mesma espécie ou entre populações que habitam diferentes ambientes.

As esterases encontram-se entre os sistemas enzimáticos que apresentam a maior diversidade de função e formas isoenzimáticas. Presentes em todos os organismos, elas compreendem um grupo multifuncional e heterogêneo de enzimas que participam da hidrólise de ésteres e outros compostos. Nos insetos, estas enzimas estão envolvidas em vários processos metabólicos, incluindo degradação de feromônios e do hormônio juvenil (Kort e Granger, 1981; Jones et al. 1994; Rauschenbach et al. 1994), processos digestórios (Sreerama e Veerahadrappa, 1991; Kerlin e Hugues, 1992; Argentine e James, 1995) e reprodutivos (Richmond e Senior, 1991; Mikhailov e Torrado, 2000). Uma função importante das carboxilesterases nos insetos está relacionada à capacidade de metabolizar vários compostos agroquímicos, incluindo piretróides, organofosforados e carbamatos (Spackman et al. 1994; Gupta et al. 2005; Wheelock et al. 2005). Várias das esterases encontradas nos insetos são

altamente polimórficas, o que justifica suas múltiplas atividades no metabolismo desses organismos.

A classificação mais amplamente aceita para as esterases é baseada na sua sensibilidade a três grupos de inibidores da atividade enzimática (Holmes e Máster, 1967 apud Oakeshott et al. 1993), incluindo os reagentes que se ligam a grupos sulfidrílicos (como exemplo o para-cloromercuriobenzoato – pCMB ou iodoacetamida), os organofosforados (exemplo: malathion) e carbamatos (como exemplo o sulfato de eserina). Com base neste critério, quatro classes de esterases são diferenciadas:

- . acetilesterases - não são afetadas pelos inibidores acima citados e geralmente têm maior afinidade por substratos alifáticos, envolvendo derivados do ácido acético.
- . arilesterase - são inibidas somente por reagentes que se ligam a grupos sulfidrílicos e atuam principalmente sobre substratos aromáticos.
- . carboxilesterases - 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 e pseudocolinesterases.

I.3 – O cluster das β -esterases

Como já observado, os organismos multicelulares utilizam um amplo conjunto de enzimas para desempenhar as mais diversas funções bioquímicas, e essas enzimas são, em geral, resultantes da evolução das famílias de multigenes. É suposto que a evolução dessas famílias tenha ocorrido por meio da duplicação gênica e posterior divergência do gene duplicado, que adquire novas funções. As esterases compreendem um sistema isoenzimático que exemplifica esse processo. Há uma significativa similaridade entre as carboxilesterases e colinesterases de eucariotos já seqüenciadas, que podem ser agrupadas em uma família multigênica denominada carboxil/colinesterase. Essa família engloba todas as esterases de *Drosophila* seqüenciadas até o momento. A família das carboxil/colinesterases 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 seqüência de aminoácidos (revisão em Oakeshott et al. 1993) e parecem apresentar um ancestral comum.

Em *Drosophila*, e outros organismos, 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 os substratos sintéticos α -naftil e β -naftil acetatos, respectivamente. Alternativamente, essas enzimas atuam sobre o α e o β -naftil propionato ou α e o β -naftil butirato. Em *Drosophila*, o grupo das α -esterases inclui carboxilesterases, colinesterases e acetilesterases. O grupo das β -esterases é constituído somente por carboxilesterases, entretanto, Mateus (1997) detectou a presença de acetilesterases, características da fase larval, em espécies do complexo *mulleri*.

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. Vários estudos correlacionam a EST-6 de *D.melanogaster* com diferentes β -esterases em outras espécies de *Drosophila*, sugerindo uma provável homologia entre a EST-6 e estas esterases. Homologia de seqüências nucleotídicas também foi observada para a *Est-6* de *D. melanogaster* e a *Est-5* de *Zaprionus indianus*, uma β -carboxilesterase detectada principalmente nos machos desses drosofilídeos (Paulino, 2008). Brady et al. (1992) observaram uma similaridade de 73% nas seqüências codificadoras para os genes *Est-6* de *D. melanogaster* e *Est-5b* de *D. pseudoobscura*. A comparação destas seqüências indicou a distribuição de 2 exons intercalados por um intron, de 55bp no caso de *D. pseudoobscura*, localizado na mesma posição do intron de 51bp observado em *D. melanogaster*. Entretanto, as enzimas correspondentes (EST-6 e EST-5) mostram claras diferenças quanto à estrutura quaternária e ao padrão de expressão tecidual. A EST-5 de *D. pseudoobscura* é um dímero de 100kDa, expressa-se em altas concentrações durante o desenvolvimento e é encontrada nos olhos e na hemolinfa de adultos de ambos os sexos. A EST-6 é um monômero de 62kDa, se expressa primariamente em machos adultos de *D. melanogaster* e sua atividade é encontrada apenas em ductos ejaculatórios. Já na maioria das espécies do grupo repleta avaliadas até o momento, observa-se pelo menos duas β -esterases que tem estrutura dimérica, sendo uma presente em todas as etapas do desenvolvimento e a outra restrita à fase larval, como a EST-1 (todo o ciclo) e EST-J (larval) de *D. buzzatii* (East, 1982), ou EST-5 (todo o ciclo) e EST-4 (fase larval) de *D. mojavensis* (Zouros et al. 1982; Pen et al. 1986) e em *D. arizonae* e *D. mojavensis* (Mateus et al. 2008).

A genética clássica e o avanço das técnicas moleculares permitiram a localização cromossômica dos genes responsáveis pela codificação das 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). 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 e 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*, que codificam a esterase larval e aquela presente em todo o ciclo, respectivamente em cada espécie. Já a *Est-5C* teria se originado por meio de uma duplicação mais recente de *Est-5B* em *D. pseudoobscura*. Segundo Brady e Richmond (1992), a duplicação que originou *Est-5A* e *Est-5B* em *D. pseudoobscura*, e *Est-P* e *Est-6* em *D. melanogaster*, deve ser a mesma que originou os genes para a 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 que atualmente apresentam esses genes duplicados.

Estudos que visam detectar uma grande parcela de atividade esterásica em insetos podem certamente contribuir para um entendimento mais completo destas enzimas do ponto de vista genético. Entre esses trabalhos devem ser citados os de Ritz (1997), com *Megaselia scalaris*, de Castiglioni-Ruiz et al. (1997), com *Hematobia irritans*, de Lapenta et al. (1995, 1998), que utilizaram o padrão de esterases para estabelecer relações de proximidade entre as linhagens de *Drosophila serido* e posteriormente utilizaram o padrão de esterases para caracterizar as espécies do “cluster” *buzzati*, de Nascimento e Bicudo (2002) com espécies de *Drosophila* do subgrupo *saltans* (grupo *saltans*) e de Lima-Catellani et al. (2004) com *Aedes aegypti*.

I.4 – Polimorfismo no “cluster” das β -esterases do complexo *mulleri*

Nas espécies de *Drosophila* do complexo *mulleri*, uma esterase com especificidade para o β -naftil acetato se destaca do conjunto de outras esterases encontradas nesses organismos. Esta enzima foi previamente estudada em espécies do complexo *mulleri*, principalmente em *Drosophila mojavensis* e em *Drosophila arizonae*, e em espécies relacionadas, sendo designada esterase-5 por Zouros et al. (1982). A expressão do loco *Est-5* foi detectada em todo o ciclo de vida desses insetos, sendo a atividade da enzima correspondente (EST-5)

detectada principalmente na hemolinfa e no corpo gorduroso. Uma segunda β -esterase, denominada esterase-4 também foi encontrada em *Drosophila mojavensis* e outras espécies do complexo *mulleri* (Zouros et al. 1982; Pen et al. 1984; Ceron, 1988; Mateus et al. 2008). A esterase-4 é uma enzima exclusivamente larval detectada em larvas de 3º instar e em pupas, com menor atividade. Ambas, esterase-4 e esterase-5 são enzimas diméricas. Assim, os indivíduos homozigotos, para os locos *Est-4* e *Est-5*, apresentam enzimas com subunidades idênticas, detectadas nos géis como uma única banda para cada enzima, enquanto os indivíduos heterozigotos possuem enzimas formadas por subunidades idênticas e diferentes, que em géis de poliacrilamida não-desnaturante são visualizados como três bandas, duas bandas iguais a dos parentais homozigotos e uma banda híbrida intermediária a essas duas, resultado da habilidade de formação de heterodímeros intralocus (Zouros et al. 1982).

Pen et al. (1986) purificaram a esterase-5 de *Drosophila mojavensis*, espécie pertencente ao complexo *mulleri*, e a compararam com a esterase-4, previamente purificada (Pen et al. 1984). A subunidade da esterase-4 apresentou um peso molecular entre 62 e 64 kDa sob SDS-PAGE, enquanto a subunidade da esterase-5 apresentou um peso molecular entre 64 e 66 kDa. Zouros et al. (1982), por meio de várias evidências, já haviam concluído que essas enzimas são produtos de um evento de duplicação. Essas evidências foram reforçadas pela análise da composição de aminoácidos da esterase-4 e 5, e determinação das seqüências dos primeiros 40 aminoácidos da extremidade *N*-terminal dessas enzimas, as quais se mostraram largamente idênticas (Pen et al. 1986).

Ceron (1988) isolou duas linhagens homozigotas para a esterase-5 de *Drosophila mulleri* que mostraram diferentes velocidades de migração sob géis não-desnaturantes, cujos alelos foram designados *Est-5^S* (do inglês “slow”: migração lenta) e *Est-5^F* (de “fast”: migração rápida). Observou-se que nas populações de laboratório a frequência do alelo *Est-5^S* era de aproximadamente 70%, contra 30% do alelo *Est-5^F*.

Em estudos populacionais posteriores, Lourenço et al. (2001) mostraram uma adaptabilidade diferencial para os alelos *Est-5^S* e *Est-5^F* em *Drosophila mulleri*. Foram estimados vários componentes do valor adaptativo para os genótipos *Est-5^S/Est-5^S*, *Est-5^S/Est-5^F* (com o alelo F de origem materna), *Est-5^F/Est-5^S* (com o alelo S de origem materna) e *Est-5^F/Est-5^F*. Doze componentes foram analisados, incluindo longevidade, produtividade e viabilidade. Estes parâmetros foram usados para estimar o valor adaptativo total para cada genótipo. O melhor valor adaptativo foi alcançado para os indivíduos portadores do genótipo *Est-5^S/Est-5^S* (valor adaptativo de 1.000), seguido pelo valor adaptativo de 0.892 apresentado pelo genótipo *Est-5^F/Est-5^S*, 0.863 para o *Est-5^F/Est-5^F*, e 0.842 para *Est-5^S/Est-5^F*. Estes

resultados sugeriram uma maior adaptabilidade relativa do genótipo *Est-5^S/Est-5^S*, seguido pelo heterozigoto *Est-5^F/Est-5^S* que possuía o alelo *Est-5^S* de origem materna, o que é incompatível com a predição de um polimorfismo neutro neste loco.

Dados da literatura reforçam a hipótese de adaptabilidade diferencial para as variantes alélicas. Por exemplo, em *Drosophila melanogaster* a variante “slow” para a EST-6 é a mais comum em localidades mais distantes do equador (Oakeshott et al. 1981; Bubliy et al. 1999).

Já em populações experimentais de *Drosophila melanogaster*, mantidas a 29°C, iniciando-se com uma relação 1:1 dos alelos *Est-6^S* e *Est6^F*, houve um aumento da frequência do alelo S (Totskii et al. 1994). A sequência completa de aminoácidos para as variantes S e F da EST-6 de *Drosophila melanogaster* já foi determinada, diferindo em 2 aminoácidos: ASN/ASP na posição 237 e THR/ALA na posição 247, respectivamente para as aloenzimas F e S. Essas duas trocas foram consideradas os sítios mais prováveis de seleção atuando sobre a distribuição diferencial desses alelos em função da latitude (Cooke e Oakeshott, 1989). Estes estudos também revelaram uma única variante aloenzimática de termoestabilidade, EST6^S-8 dentro do grupo EST6^S, que é muito mais comum que outras variantes, e pode ser produto de um processo seletivo contemporâneo. Outros estudos correlacionam a alta variabilidade genética de locos esterásicos em populações naturais de pássaros das espécies *Parus major*, *P. caeruleus* e *P. ater* com um aumento do valor adaptativo desses indivíduos, permitindo o aparecimento de resistência múltipla a vários componentes tóxicos, além da possibilidade de utilização de novos recursos alimentares (Driesel et al. 2004).

Outros estudos relacionados à evolução molecular da EST-6 em *D.melanogaster* mostraram que a distribuição diferencial desses alelos em função da latitude poderia ser explicada pela interação de processos seletivos atuando nas suas regiões promotoras e codificadoras (Balakirev et al. 2002). Estes estudos suportam a hipótese que a variação em loco estrutural altamente polimórficos em populações naturais devem ser material para a seleção natural, e esta variação deve ser mantida em populações pela força da seleção balanceada. Ayala et al. (2002) em seus estudos, da mesma forma, obtiveram evidências indicando que a seleção direcional e a balanceadora estariam impactando separadamente a região promotora e codificante do loco *Est-6*. Estes estudos também revelaram um pico de polimorfismo silencioso próximo das duas substituições codificantes do polimorfismo, ASN/ASP na posição 237 e THR/ALA na posição 247, o qual não é consistente com a predição da teoria neutra da evolução molecular.

A comparação das sequências nucleotídicas e de aminoácidos entre proteínas homólogas de espécies diferentes, e de variantes protéicas dentro de uma mesma espécie

fornece elementos para entendermos suas relações evolucionárias interespecíficas bem como as diferenças em valores adaptativos entre os indivíduos de uma espécie. Além disso, caracterizações bioquímicas e comparações entre as linhagens homozigotas para essas variantes são importantes no fornecimento de informações sobre a questão da adaptabilidade diferencial das isoenzimas. Esse foi o objetivo do presente trabalho, com base na caracterização bioquímica e em estudos de produtividade, envolvendo as linhagens homozigotas da *Est-5^S* e *Est-5^F* de *D. mulleri* para o reforço, ou não, da questão da adaptabilidade diferencial dessas variantes enzimáticas.

II - OBJETIVOS

- a) Verificar e comparar a atividade das aloenzimas EST-5^S e EST-5^F de extratos brutos de linhagens homozigotas de *Drosophila mulleri* frente a vários parâmetros: temperatura, agentes desnaturantes, efeito da concentração salina e variação do pH;
- b) Purificar, identificar e seqüenciar os fragmentos *N*-terminais das aleloenzimas EST-5^S e EST-5^F para a construção de oligonucleotídeos iniciadores, visando o sequenciamento do gene e, desta forma, estabelecer as diferenças em suas seqüências nucleotídicas e de aminoácidos;
- c) Caracterizar cineticamente as aloenzimas para tentar ajudar na diferenciação dessas variantes alelonzimáticas em *Drosophila mulleri*.
- d) Mensurar e comparar a produtividade das linhagens homozigotas da esterase-5 de *D.mulleri* em diferentes temperaturas
- e) Correlacionar os dados obtidos nos itens acima para o reforço, ou não, da questão da adaptabilidade diferencial dessas variantes enzimáticas em *D. mulleri*.

III - MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Genética Bioquímica e no Laboratório de Bioquímica de Proteínas do Departamento de Química e Ciências Ambientais. Também foi utilizado o Laboratório de Populações do Departamento de Biologia da UNESP, campus de São José do Rio Preto.

III.1 - Obtenção e manutenção das amostras

Duas linhagens de *Drosophila mulleri* foram utilizadas: a linhagem *Est-5^S* que é homozigota para o alelo que codifica a isoenzima EST-5^S, de migração mais lenta, e a linhagem *Est-5^F*, homozigota para o alelo que codifica a isoenzima EST-5^F, de migração mais rápida em relação ao ânodo. As duas linhagens foram mantidas no Departamento de Biologia da UNESP, campus de São José do Rio Preto, em garrafas de vidro de 250 mL, contendo meio de banana-ágar, em câmaras de temperatura constante a 25°C, com fotoperíodo de aproximadamente 12 horas. As culturas-estoques das moscas foram mantidas por meio de repiques a cada 25 dias.

III.2- Preparo das Amostras

Para verificação das possíveis diferenças entre as aleloenzimas da esterase-5, estas foram submetidas a tratamentos físicos e químicos (temperaturas, agentes desnaturantes, entre outros) que serão descritos nos itens.III.4 a III.9. Para cada experimento foi feito um extrato bruto recém-preparado, que consistiu em um total de 15 moscas macerado em tampão TRIS-HCl 0,5M pH 8,8 contendo glicerol a 12% e azul de bromofenol a 0,01%. O macerado foi centrifugado a 10.000xg a 4°C por 5 minutos e, em seguida, o sobrenadante de cada uma das amostras foi submetido aos tratamentos específicos.

III.3 - Quantificação da proteína total dos extratos brutos e amostras purificadas

Com o intuito de garantir que os extratos e proteínas purificadas das linhagens *Est-5^S* e da *Est-5^F* de *Drosophila mulleri*, aplicados nos géis e utilizados nos ensaios enzimáticos, apresentassem a mesma concentração de proteínas totais, determinamos a concentração das mesmas, utilizando-se o método de Bradford (1976).

III.4 - Teste de resistência à temperatura

Nestes experimentos foram realizadas pré-incubações dos sobrenadantes dos extratos brutos em diferentes temperaturas. Os sobrenadantes foram mantidos às temperaturas de 50° e 55° C, em banho-maria, por 5, 10 e 15 minutos. Após esses procedimentos, os sobrenadantes foram submetidos à eletroforese e à coloração usual. Neste experimento, as amostras controles permaneceram incubadas em gelo durante o tratamento das amostras. O teste de temperatura foi repetido com 50 e 55° C, pré-incubando-se também os extratos brutos à temperatura de 60°C. Além disso, foi adicionado o tempo de pré-incubação de 20 minutos, após esses tratamentos, as amostras foram analisadas quanto à atividade esterásica por meio do ensaio enzimático específico para carboxilesterase.

III.5 - Teste de resistência a agentes desnaturantes

A observação do efeito de agentes desnaturantes sobre a atividade das aloenzimas foi realizada pré-incubando-se os extratos brutos das aloenzimas EST-5^S e EST-5^F a uma concentração de uréia 2 M, nos tempos de 10, 20, 30, 45 e 60 minutos a 37° C. As amostras controle foram pré-incubadas em tampão sem uréia por 60 minutos a 37° C. Após esses procedimentos, as amostras foram submetidas à eletroforese não desnaturante, seguida da coloração específica das esterases, para a visualização da atividade enzimática das aloenzimas. O teste de resistência a uréia foi repetido pré-incubando-se os extratos brutos a uma concentração de 2 M de uréia por 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos a 37° C, e, após esses tratamentos, as amostras foram analisadas quanto a atividade esterásica por meio do ensaio enzimático específico para carboxilesterase.

III.6 - Efeito da concentração salina

O experimento com o cloreto de sódio foi realizado pré-incubando-se os extratos brutos das aloenzimas com NaCl na concentração de 2,5 M por 15 minutos à 37°C, sendo que, neste experimento, ambas aloenzimas foram misturadas. Após este tratamento, o extrato bruto das aloenzimas misturadas foi utilizado para a eletroforese. Neste experimento, as amostras controles foram pré-incubadas sem o NaCl por 15 minutos à 37°C. A análise do efeito da concentração salina foi repetida pré-incubando-se os extratos brutos a uma

concentração de 2,5 M de cloreto de sódio por 10, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos a 37° C, e, após esse tratamento, as amostras foram analisadas quanto a atividade esterásica por meio de ensaio enzimático específico para carboxilesterases.

III.7 – Teste do efeito do triton X-100

Neste experimento não houve pré-incubação do extrato bruto. O triton X-100 foi diluído no tampão de homogeneização do ensaio enzimático nas concentrações de 0,01; 0,1; 1; 2 e 5 %. Portanto, no experimento com triton X-100, a atividade enzimática das aleloenzimas foi mensurada apenas por meio dos ensaios enzimáticos.

III.8 - Teste do pH

Neste experimento, como no item III.8, não houve pré-incubação do extrato bruto. A mudança do pH foi realizada através da mudança do tampão de homogeneização para tampões com os seguintes pHs: 5,4; 5,7; 6,2; 6,5; 7,0; 7,5 e 8,5. Para cada pH foi preparado um branco da reação. Portanto, nos experimentos com variação de pH, a atividade enzimática das aleloenzimas foi mensurada apenas por meio dos ensaios enzimáticos.

III.9 – Mensuração da atividade catalítica

Após os tratamentos, descritos acima, a atividade enzimática foi mensurada de duas formas: através da visualização da atividade catalítica das aleloenzimas sobre géis não desnaturantes, após a coloração específica das esterases, como será descrito no item III.10 e III.11, e por meio de ensaio enzimático específico para carboxilesterases, que será descrito no item III.13.

III.10 - Padronização da Eletroforese

Após os tratamentos, os sobrenadantes foram utilizados para a eletroforese em géis de poliacrilamida a 10% (C = 5%), confeccionados com tampão TRIS-HCl 1,5 M pH 8,8. A corrida eletroforética foi de 3 horas e meia a uma voltagem constante de 180V, com tampão da cuba TRIS-glicina 0,1M pH 8,3, seguida da coloração específica para as esterases como será descrito no item III.11.

III.11 - Detecção das esterases nos géis

Após a eletroforese, os géis foram pré-incubados numa solução de tampão fosfato 0,1M, pH 6,2 por 40 minutos. Ao término da pré-incubação, os géis foram submetidos à coloração em 50 mL de tampão fosfato 0,1M pH 6,2 contendo 20 mg de alfa-naftil-acetato e 20 mg de beta-naftil-acetato como substratos das enzimas, 60 mg de Fast Blue RR, e 5 mL de n-propanol. O Fast Blue acopla-se com o produto da reação das esterases (alfa ou beta naftol) formando um precipitado que é visualizado nos géis com bandas pretas, no caso das α -esterases, ou vermelhas, no caso das esterases específicas para o beta-naftil-acetato (β -esterases). O propanol foi adicionado para melhorar a visualização das bandas no gel. O tempo de coloração foi o menor possível para ressaltar as diferenças entre as aloenzimas submetidas aos diferentes tratamentos. Após a coloração o gel foi transferido para a solução decolorante contendo: água, ácido acético, e etanol comercial, na proporção de 3: 1: 3, mais 12% de glicerina comercial, e submetido à secagem de acordo com Ceron et al. (1992).

III.12 - Ação do fluoreto de fenil metilssulfonila (PMSF) sobre as esterases de *D. mulleri*

Extratos brutos das linhagens homozigotas da esterase-5 de *Drosophila mulleri* foram pré-incubados por 5 min à temperatura ambiente com o fluoreto de fenil metilssulfonila (PMSF), numa concentração final de 1 mM. Em seguida, os extratos foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante e a coloração usual para as esterases, como descritos no item III.3, tendo como controle extratos brutos de ambas as linhagens sem a pré-incubação com o PMSF.

III.13 – Ensaio enzimáticos

A atividade esterásica foi medida de acordo com Ellman et al. (1961). O feniltiocetato foi usado como substrato para a carboxilesterase e monitorado pela liberação de tiol-derivados em 412 nm. Os ensaios foram realizados em triplicata em tampão de homogeneização TRIS-HCl 100 mM pH 8,0 com 1mM de DTNB, mais PMSF 1mM. A reação catalítica foi mensurada por 1 min. Brancos sem substrato ou amostras foram incubadas em 25°C por 5 min para calcular a reação-cruzada endógena com o DTNB. Os ensaios começaram pela adição do substrato. As atividades específicas foram expressadas em U mg proteína⁻¹; 1 U é a quantia de enzima que hidrolisa 1 μ mol de substrato por min. A concentração de proteínas dos

extratos brutos foi determinada de acordo com o Método de Bradford (1976). Nestes experimentos foi utilizado um espectrofotômetro GBC Cintra 10e.

Os gráficos foram construídos através da utilização do programa computacional Origin 6.0. A atividade catalítica foi determinada como porcentagem do controle sem o tratamento físico ou químico. Nos gráficos, os valores foram representados pelas médias $\pm$ desvio padrão ($\bar{x} \pm \text{S.D.}$) das leituras, em porcentagens.

Os experimento cinéticos dos extratos brutos das aleloenzimas EST-5^S e EST-5^F foram realizados fixando-se a concentração da enzima e aumentando a concentração do substrato. Os valores cinéticos foram obtidos pelo mesmo programa computacional citado acima, plotando-se os recíprocos dos valores das velocidades iniciais em função dos recíprocos da concentração do substrato. Através deste gráfico, o gráfico de Lineweaver-Burk, foi possível determinar os valores de V_{max} e K_m de ambas aloenzimas.

III.14 - Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE)

A eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) foi realizada em gel de corrida a 11 % e o de empilhamento a 4% de concentração (Laemmli, 1970). Para a corrida eletroforética foi preparado um tampão de corrida TRIS-HCl pH 8,3 com SDS a 1%. A corrida foi realizada aplicando uma voltagem de 110V, por aproximadamente 2 horas e 30 minutos. As amostras foram preparadas com tampão TRIS-HCl 0,5M pH 6,8 contendo glicerol a 10%, mais azul de bromofenol a 0,05%, mercaptoetanol a 0,715M e SDS a 2,5% (Dodecil Sulfato de Sódio) e, além disso, as amostras foram fervidas por 5 minutos.

III.15 - Metodologia de purificação das variantes moleculares da EST-5

O método de purificação consistiu na separação em gel de poliacrilamida - SDS, como descrito acima, de uma amostra contendo extrato bruto de aproximadamente 200 moscas, que foram aplicadas em cinco géis. Neste caso, as amostras foram preparadas conforme o item III.2. Os géis foram confeccionados com pentes que formaram um único e grande poço. Após a corrida eletroforética, que nesse caso durou cinco horas, os cinco géis foram pré-incubados por 40 minutos em 100 ml de tampão fosfato 0,1 M pH 6,2 mais 2,5 mL de triton X-100, para a remoção do SDS, e renaturação das proteínas. Em seguida, os géis foram lavados em água destilada até a retirada total do triton X-100, submetidos à coloração para identificação das esterases e posterior remoção da enzima. Uma fina tira de gel na qual se visualizava a

atividade da esterase-5 (S ou F em cada caso) foi cortada e macerada em tampão TRIS-HCl 50 mM pH 8,0, colocado em um agitador a 4°C em geladeira por 12 horas para a difusão da enzima do gel. Após esse procedimento, a solução foi filtrada e concentrada em membrana filtrante de 50 kDa (Millipore). O concentrado foi então analisado quanto a proteínas totais (SDS-PAGE) para a verificação da pureza das amostras. Neste caso, as amostras das enzimas purificadas foram diluídas em tampão de amostra conforme descrito no item III.14. Também foram utilizados marcadores de peso molecular com proteínas coloridas RainbowTM na faixa de 14.3 - 220 kDa (Amersham Pharmacia Biotech). A coloração usada para a detecção das proteínas nos géis foi o Nitrato de Prata segundo o método de See (1989). Para verificação da atividade, foi utilizado o mesmo procedimento da extração da enzima do gel, procedimento este que preserva a atividade da enzima.

III.16 – Estudo da produtividade

Foram realizados cruzamentos por casal em tubos, contendo meio de cacto, para ambas as linhagens, nas temperaturas de 20 e 29°C. Cinquenta casais, formados por indivíduos virgens com 7 dias foram mantidos em câmara de germinação tipo B.O. D. a 20 e a 29° C. Após seis dias, os casais foram descartados e os tubos que continham a progênie foram mantidos na mesma temperatura até a eclosão dos descendentes. Contagens diárias do número de machos e fêmeas recém-eclodidos nos cruzamentos em tubos foram realizadas durante 8 dias para ambas as linhagens nas duas temperaturas.

IV – RESULTADOS

A EST-5 é uma carboxilesterase presente em todos os estágios do ciclo de vida de *Drosophila mulleri*, indicando que desempenha funções importantes. Em eletroforese em géis não desnaturantes, essa esterase é a enzima mais fortemente corada que apresenta atividade preferencial pelo substrato sintético beta-naftil acetato, corando-se em vermelho. Além disso, as aloenzimas EST-5^S e EST-5^F apresentam estrutura quaternária dimérica e em cruzamentos entre indivíduos homozigotos, obtém-se, nos descendentes, um padrão eletroforético de três bandas, característico da formação de uma enzima híbrida, resultante da agregação de uma cadeia EST-5^S com uma EST-5^F (figura 1).

IV.1 – Análise comparativa da atividade enzimática das aloenzimas sobre diferentes condições físico-químicas.

Foram realizados vários experimentos com os extratos brutos contendo as aloenzimas EST-5^S e EST-5^F em diferentes temperaturas, concentrações de uréia e NaCl. De modo geral, observou-se que a aloenzima EST-5^S sofre um menor efeito da temperatura, das concentrações de uréia e NaCl sobre sua atividade, indicando uma maior estabilidade desta isoenzima em relação a EST-5^F. Nestes experimentos, comparou-se a atividade enzimática das aloenzimas pela intensidade de coloração das bandas no gel. Também foi mantida a mesma concentração de proteínas por amostra, em torno de 65 µg/uL.

Os resultados obtidos com os experimentos de temperatura foram os seguintes: a 50°C (figura 2) notou-se uma atividade enzimática levemente maior para EST-5^S, pois as bandas desta aloenzima estão levemente mais intensas. Na temperatura de 55°C (figura 3) observou-se para as duas aloenzimas uma redução da atividade em função do tempo de pré-incubação. Além disso, esta temperatura demonstrou que a EST-5^S apresenta maior resistência à desnaturação térmica que a EST-5^F, pois como visualizado, no tempo de 5 minutos houve uma intensa atividade catalítica da EST-5^S (colunas 2 e 3), enquanto nesse mesmo tempo foi detectado uma menor atividade da EST-5^F. Já no tempo de 10 minutos (colunas 4 e 5) não foi detectada nenhuma atividade enzimática para a EST-5^F, enquanto a EST-5^S mostrou-se ainda com alguma atividade, detectada pela coloração no gel.

O experimento de pré-incubação com uréia está exibido na figura 4. Da mesma forma, notou-se uma maior resistência da aloenzima EST-5^S à desnaturação pela uréia que a EST-5^F, pois esta teve a atividade reduzida no tempo de 10 minutos (coluna 2), perdendo totalmente a

atividade catalítica no tempo de 20 minutos (coluna 3), enquanto a aleloenzima EST-5^S só apresentou sinal de desnaturação no tempo de 20 minutos, tornando-se inativa aos 30 minutos (coluna 4).

Na figura 5, observa-se o resultado da pré-incubação das isoenzimas misturadas e tratadas com cloreto de sódio à concentração de 2,5 M. Percebe-se, neste caso, que as aleloenzimas têm a migração alterada pelo efeito do NaCl, por isso, migram menos que seus respectivos controles. Um dos objetivos deste experimento era de verificar a dissociação das subunidades e a consecutiva formação da aloenzima EST-5^S/EST-5^F, que seria a representação de uma enzima híbrida, contudo, isso não foi observado. O resultado mais relevante nesse experimento foi a comprovação da maior resistência da EST-5^S sobre a sua correlata EST-5^F, perante o efeito salino, como pode ser observado pela intensidade de coloração da banda nos géis.

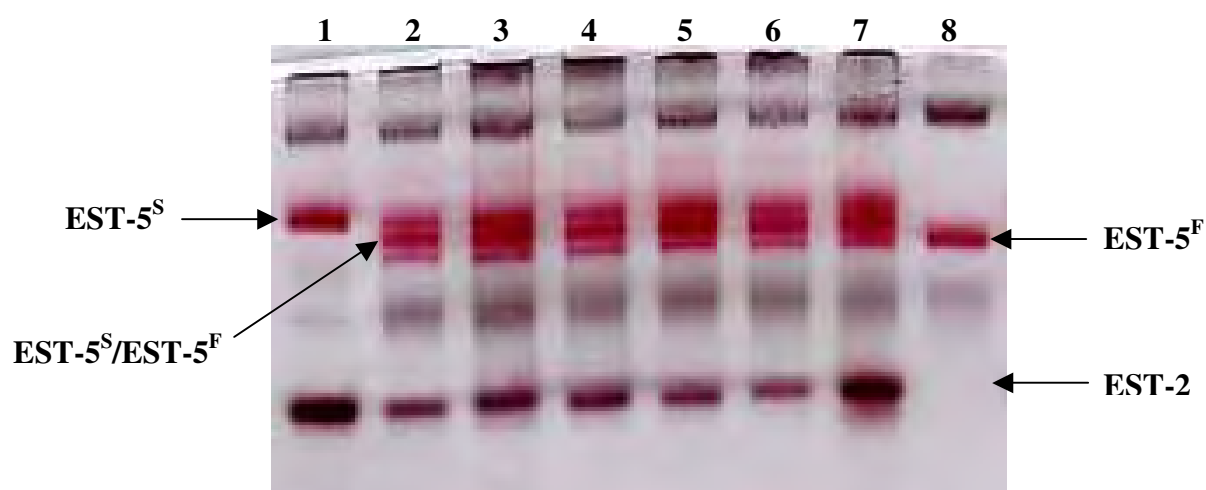


Figura 1: Imagem digitalizada de gel não-desnaturante, corado especificamente para esterases, ilustrando o padrão de bandas apresentado por uma mosca da linhagem homozigota *Est-5^S* (coluna 1), da linhagem *Est-5^F* (coluna 8), e por moscas heterozigotas resultantes de cruzamentos entre moscas das linhagens acima citadas (colunas 2-7). Observa-se que a amostra 8 é de um indivíduo homozigoto *Est-5^F* e “alelo nulo” para o loco *Est-2*.

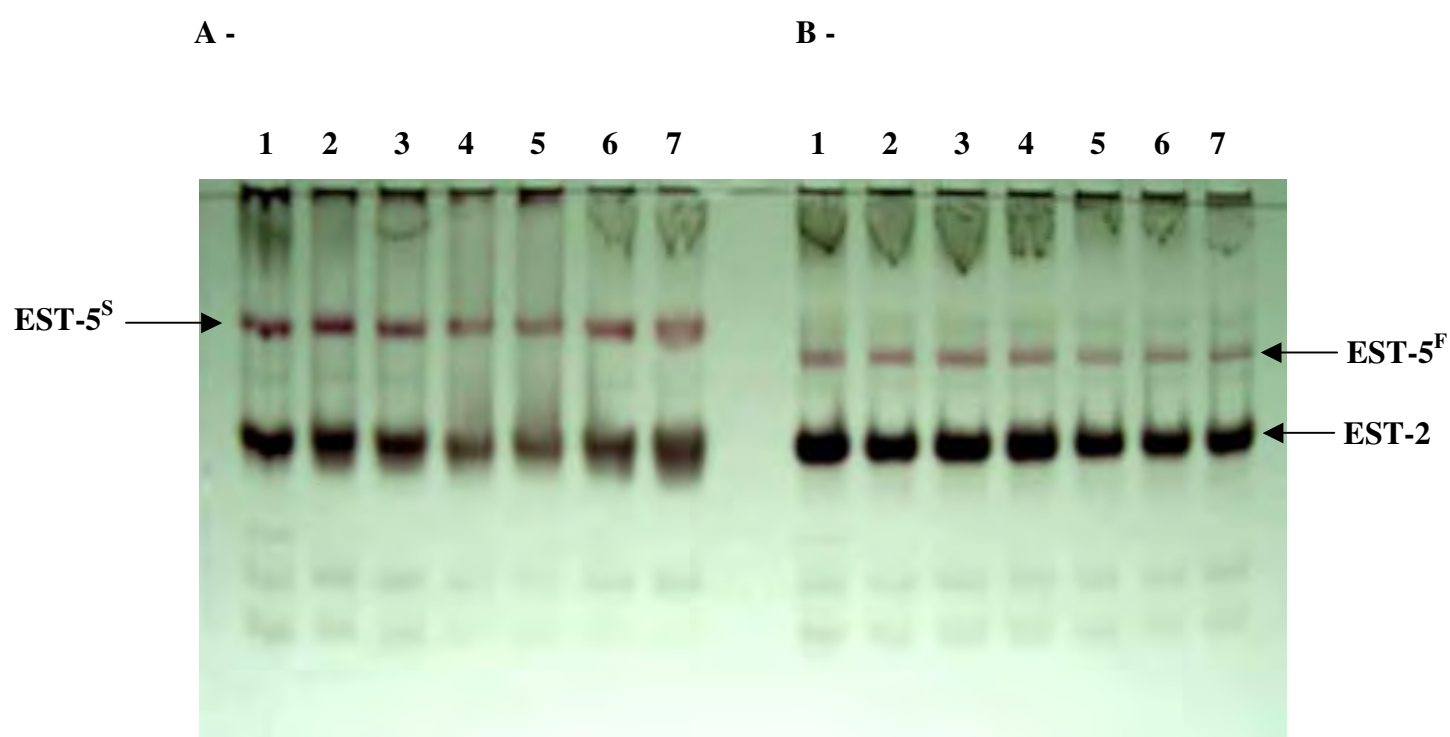


Figura 2: Imagem digitalizada de gel não-desnaturante contendo amostras da linhagem *Est-5^S* (A) e *Est-5^F* (B), corado especificamente para esterases. As amostras foram pré-incubadas à temperatura de 50°C nos tempos de 5 (colunas 2 e 3), 10 (colunas 4 e 5) e 15 minutos (colunas 6 e 7). Amostras não tratadas (colunas 1-A e 1-B).

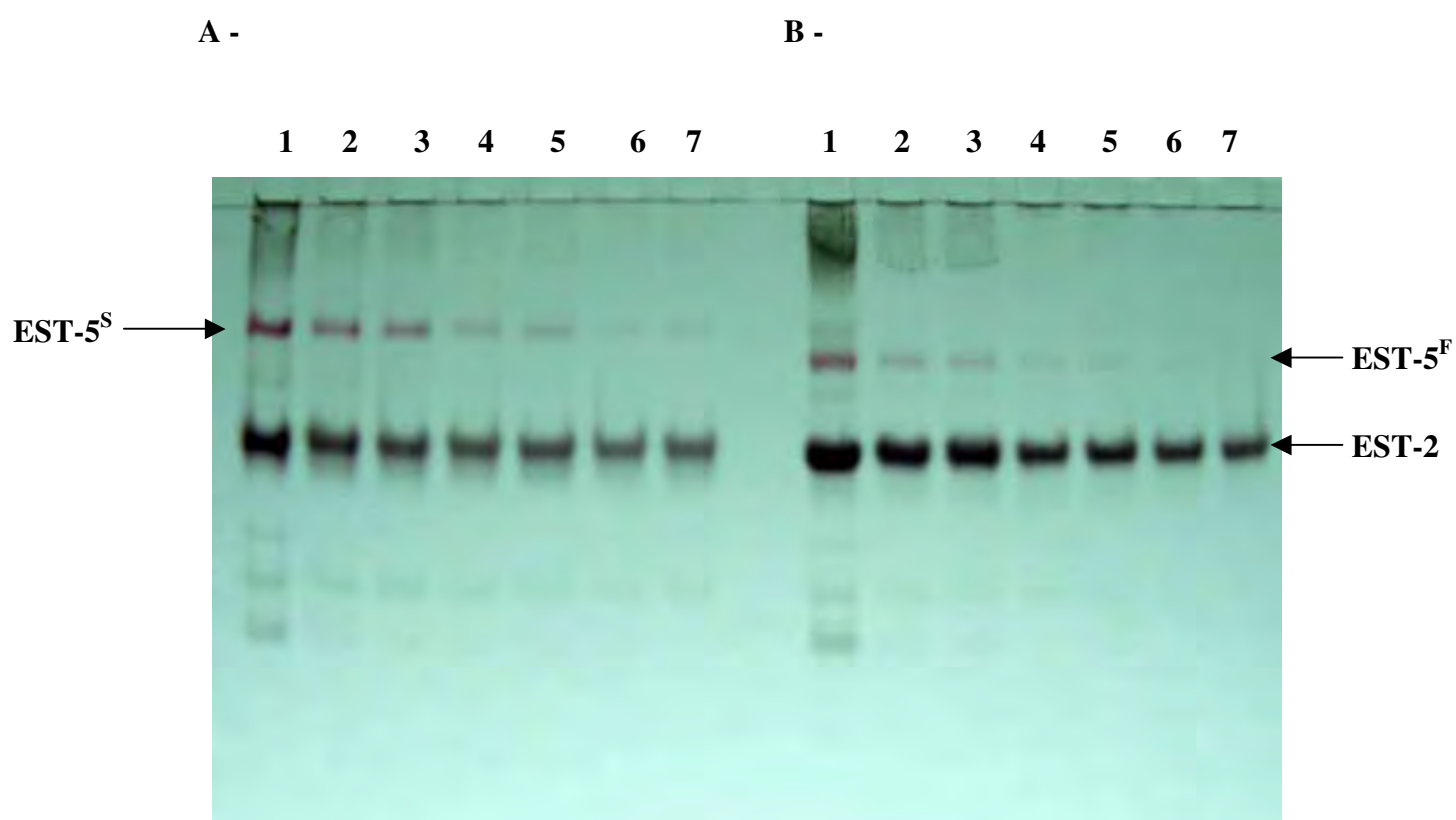


Figura 3: Imagem digitalizada de gel não-desnaturante contendo amostras da linhagem *Est-5^S* (A) e *Est-5^F* (B), corado especificamente para esterases. As amostras foram pré-incubadas à temperatura de 55°C nos tempos de 5 (colunas 2 e 3), 10 (colunas 4 e 5) e 15 minutos (colunas 6 e 7). Amostras não tratadas (colunas 1-A e 1-B).

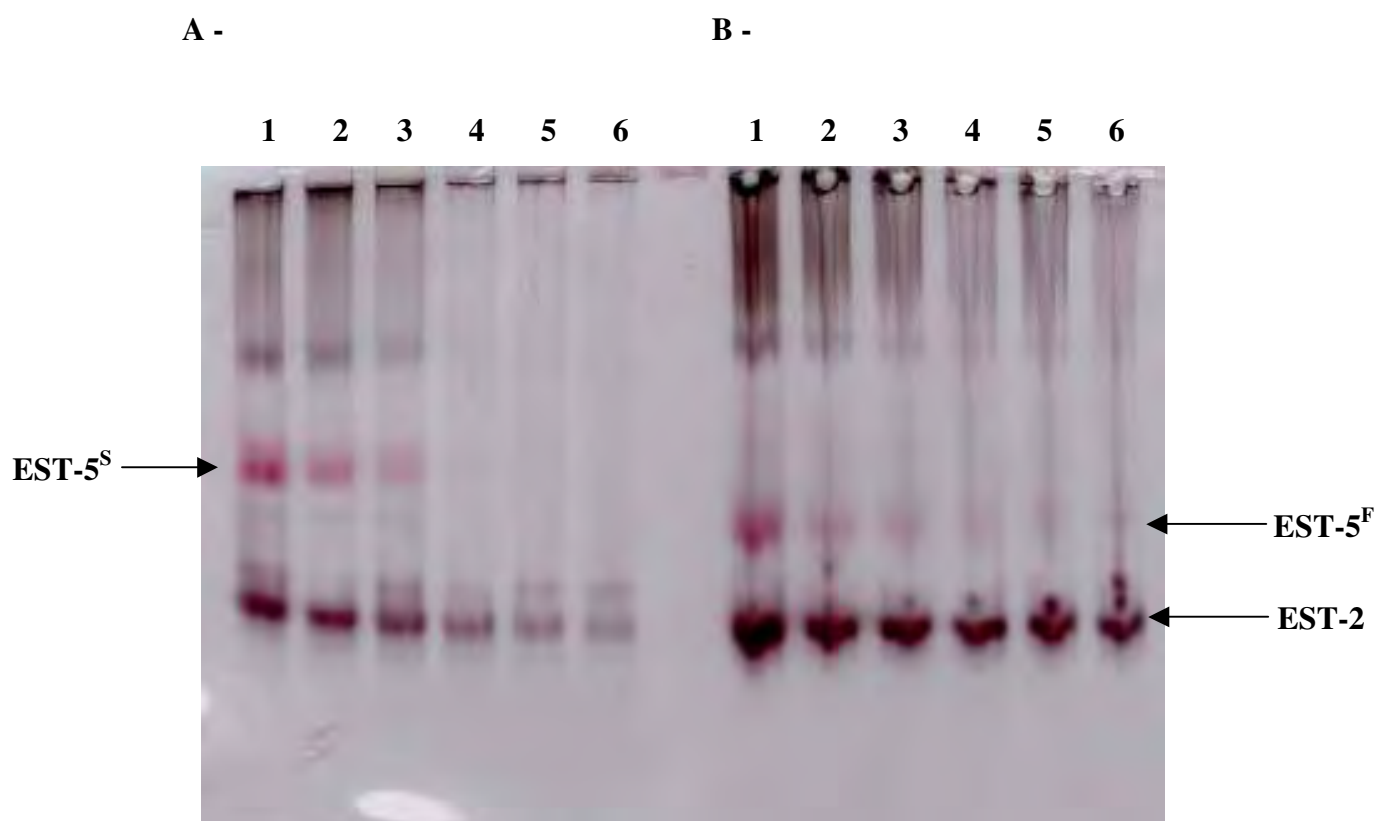


Figura 4: Imagem digitalizada de gel não-desnaturante contendo amostras da linhagem *Est-5^S* (A) e *Est-5^F* (B), corado especificamente para esterases. As amostras foram pré-incubadas em uréia na concentração de 2 M nos tempos de 10 (colunas 2-A e 2-B), 20 (colunas 3-A e 3-B), 30 (colunas 4-A e 4-B), 45 (colunas 5-A e 5-B) e 60 minutos (colunas 6-A e 6-B). Amostras não tratadas (colunas 1-A e 1-B).

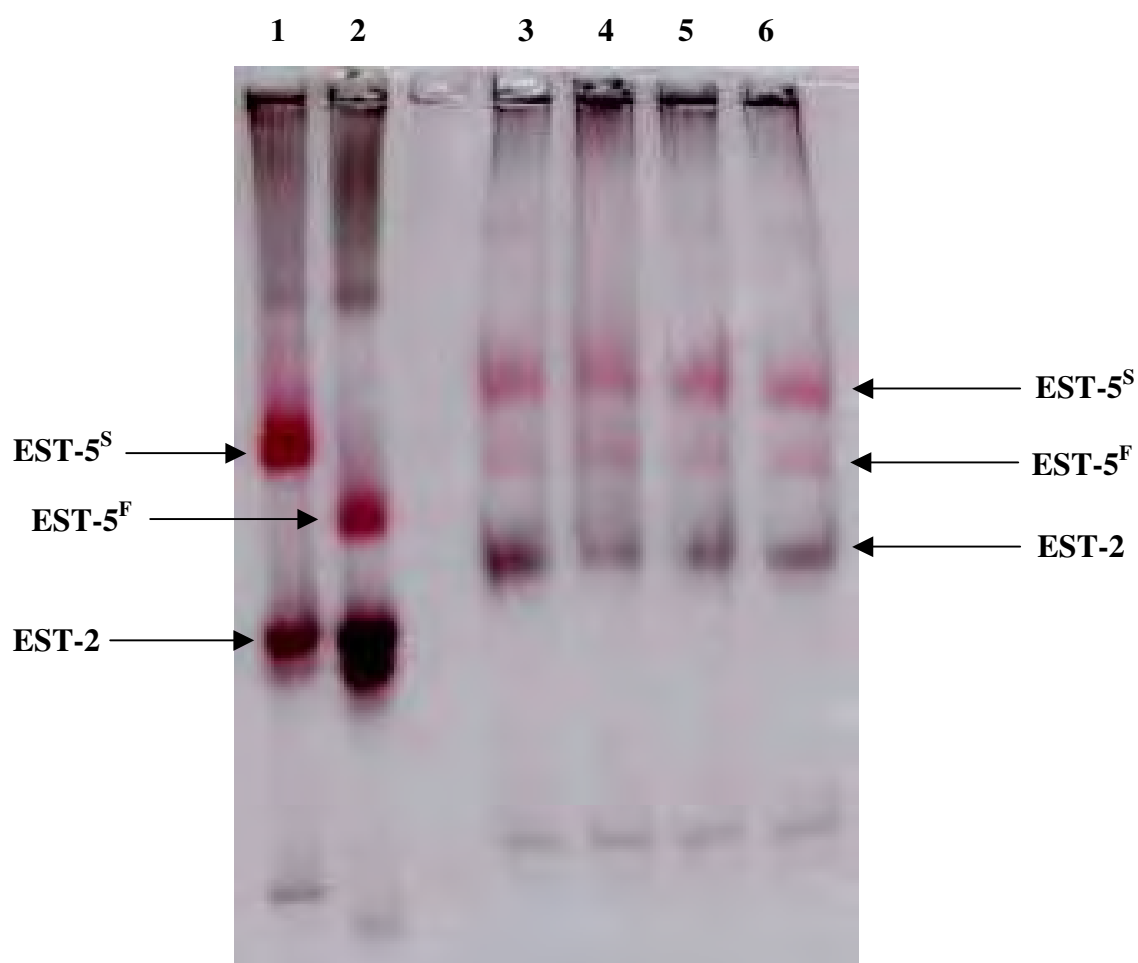


Figura 5: Imagem digitalizada de gel não-desnaturante contendo amostras da linhagem *Est-5^S* e *Est-5^F* submetida a uma pré-incubação com NaCl 2,5 M e corado especificamente para esterases. Colunas 3, 4, 5, e 6 amostras *EST-5^S* e *EST-5^F* combinadas e pré-incubadas com NaCl por 15 minutos a 37° C. Coluna 1 e 2: amostra *EST-5^S* e *EST-5^F* não tratadas.

IV.2 – Purificação das aloenzimas EST-5^S e EST-5^F.

Inicialmente, foram realizados testes de purificação das aloenzimas utilizando-se métodos clássicos. Ao redor de 8 gramas de moscas suspensas em 15 mL de tampão TRIS-HCL 10 mM com 0,22 M de NaCl pH 7,5 foram trituradas com auxílio de um homogenizador manual Power Gen 35 (Fischer Scientific), filtradas através de 4 camadas de gaze e centrifugadas a 10.000 xg durante 45 minutos a 4°C em centrífuga refrigerada Jouan CR3i.

O material foi concentrado por centrifugação em concentradores Amicon Centricon 50 e submetido a cromatografias de exclusão de massa molecular em Sephacryl S-100 HR e em Sephacryl S-300 HR e uma troca iônica em resina Q-Sepharose. Contudo, os resultados não mostraram um grau de purificação satisfatório, em virtude do qual decidimos isolar a enzima pelo método eletroforético descrito no item III. 16 de Material e Métodos.

A purificação das aloenzimas EST-5^S e EST-5^F foi obtida através da remoção de ambas de géis de poliacrilamida, contendo SDS. A visualização das enzimas purificadas foi feita em gel de poliacrilamida – SDS com a posterior coloração de prata. A figura 6 mostra esses resultados, onde as aloenzimas EST-5^S e EST-5^F estão totalmente purificadas e apresentam subunidades de mesma massa molecular, em torno de 66 e 68 kDa.

Para demonstrar que o material obtido continha de fato as aloenzimas EST-5^S e EST-5^F purificadas, amostras do mesmo material foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida – SDS, porém, neste caso, as amostras foram diluídas em tampão de amostra sem SDS e mercaptoetanol, e não foram fervidas (item III.2). Além disso, após a corrida eletroforética, o gel foi pré-incubado em tampão fosfato com triton X-100 2,5 % para a retirada do SDS e renaturação da enzima e, posteriormente, foi corado especificamente para esterases. O resultado é visto na figura 7, onde pode ser observado as atividades das aloenzimas purificadas EST-5^S e EST-5^F, utilizando-se o substrato β -naftil-acetato (colunas 2 e 3 da figura 7, respectivamente). Observa-se ainda, que as aloenzimas apresentaram migrações distintas e que a EST-5^F apresenta-se menos intensamente corada, provavelmente devido à ação do triton.

Amostras das aloenzimas purificadas EST-5^S e EST-5^F foram encaminhadas para o Laboratório Nacional de Luz Síncrona - LNLS, no Laboratório de Espectrometria de Massas, em Campinas, SP, para a identificação de alguns fragmentos de seqüências primárias. Ainda não temos esses resultados disponíveis.

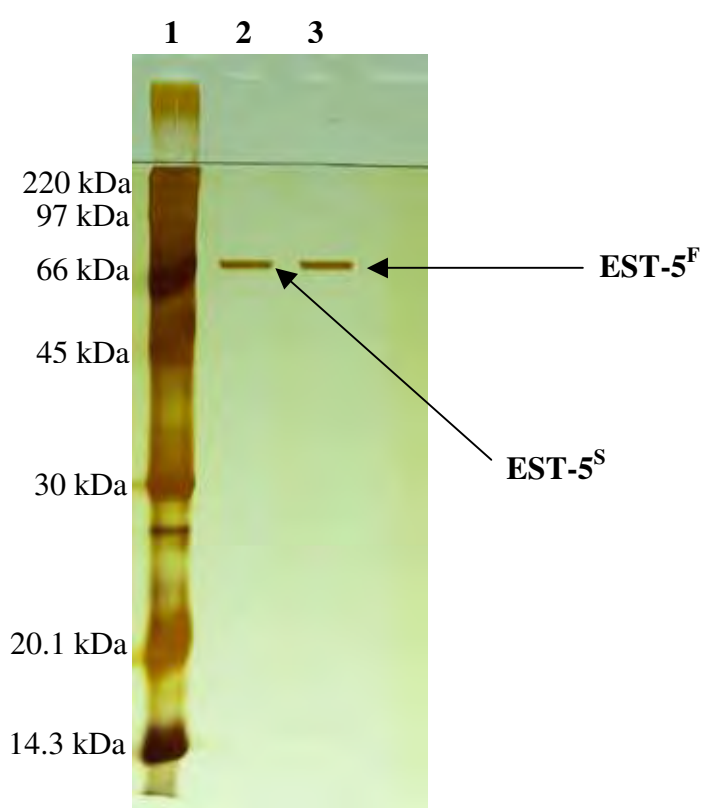


Figura 6: Imagem digitalizada de gel de poliacrilamida-SDS, corado com Nitrato de Prata. Coluna 1: marcador de peso molecular colorido RainbowTM; coluna 2: amostra EST-5^S purificada; coluna 3: amostra EST-5^F purificada.

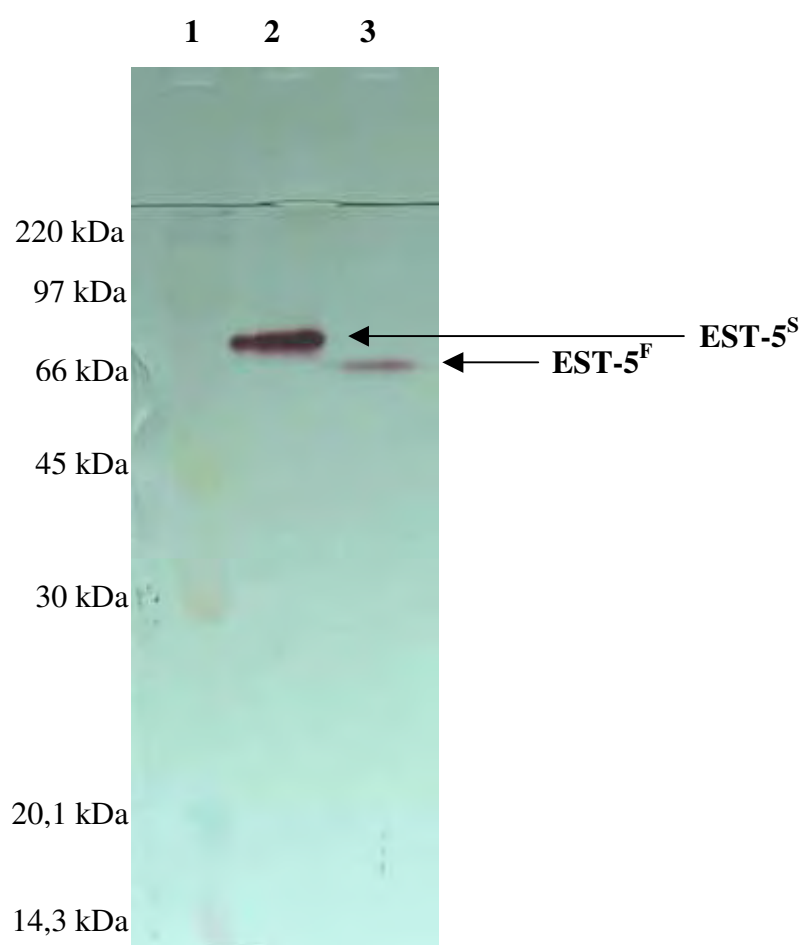


Figura 7: Imagem digitalizada de gel de poliacrilamida-SDS, contendo amostras não desnaturadas das aloenzimas **EST-5^S** e **EST-5^F** purificadas, e, em seguida, corado especificamente para as esterases. Coluna 1: marcador de peso molecular RainbowTM; coluna 2: amostra **EST-5^S**; coluna 3: amostra **EST-5^F**.

IV.3 – Ensaio enzimáticos após diferentes condições físico-químicas.

O processo de purificação não teve um bom rendimento em termos quantitativos, desta forma, a atividade enzimática das aleloenzimas foi medida com os extratos brutos das linhagens homozigotas da esterase-5 de *Drosophila mulleri*, acrescido de fluoreto de fenil metilssulfonila (PMSF). O PMSF é um inibidor de serino-proteases e não tem ação sobre a esterase-5. Como o ensaio enzimático usado neste trabalho é específico para carboxilesterases, o uso deste composto foi necessário para inibir a esterase-2, uma α -esterase que também apresenta atividade como carboxilesterase. A figura 8 evidencia a ação deste inibidor.

Os resultados dos ensaios enzimáticos corroboram os resultados obtidos no item IV.1. Nos dois experimentos foi avaliada a resistência das formas aloenzimáticas EST-5^S e EST-5^F à desnaturação térmica, a desnaturação por agentes caotrópicos e o efeito salino, a diferença baseou-se na metodologia empregada para mensurar a atividade catalítica. Também foi mantida a mesma concentração de proteínas por amostra, em torno de 65 $\mu\text{g/uL}$.

Os ensaios enzimáticos precedidos pela pré-incubação à temperatura de 50, 55 e 60°C estão mostrados respectivamente nas figuras 9, 10 e 11. Observa-se que nas três figuras as aleloenzimas apresentam curvas semelhantes, demonstrando um padrão na perda da atividade enzimática em função do tempo de pré-incubação. Contudo, a característica a ser ressaltada é a predominância da curva da EST-5^S sobre a EST-5^F. Em todas as figuras, a atividade catalítica é mostrada como porcentagem do controle sem o tratamento físico ou químico.

O efeito da uréia sobre atividade enzimática está demonstrado na figura 12. Semelhantemente às curvas com o efeito da temperatura, as aleloenzimas tratadas com uréia exibiram um padrão semelhante e gradativo de redução da atividade catalítica, porém, com uma maior evidência da diferença de resistência das isoenzimas à desnaturação. Os resultados do cloreto de sódio e do triton X-100 (figura 13 e 14, respectivamente) também mostraram maior divergência entre as curvas das aleloenzimas. A queda abrupta da atividade catalítica da EST-5^F no tempo de 20 minutos e nas concentrações de 0,01 a 1% são conseqüências da maior sensibilidade da EST-5^F a estes compostos. Em ambos os casos, a diferença entre as aloenzimas diminuiu no final com o aumento do tempo de pré-incubação e a concentração do detergente.

O experimento realizado em diferentes pHs não mostrou diferenças no perfil de atividades de ambas as aloenzimas. Na figura 15, observa-se que ambas as enzimas

apresentam curvas de pH semelhantes, com atividade máxima na região alcalina e menor atividade em pHs ácidos.

IV.4 - Caracterização Cinética.

Para a caracterização cinética foram realizados ensaios enzimáticos, conforme descrito no item III.13. Com os valores das velocidades iniciais e concentração do substrato construiu-se o gráfico de Lineweaver-Burk, obtendo-se para a *EST-5^S* os valores de 32,54 $\mu\text{M}/\text{min}$ de V_{max} e 1,43 mM de K_m , e para a *EST-5^F* os valores de 33,34 $\mu\text{M}/\text{min}$ de V_{max} e 1,54 mM de K_m .

IV.5 – Estudo da produtividade.

O resultado do estudo da produtividade para as linhagens homozigotas da esterase-5 nas temperaturas de 20 e 29°C está mostrado na tabela 1 e na figura 16 (A e B). A tabela 1 mostra a média do número total de descendentes por casal de ambas as linhagens nas duas temperaturas, enquanto a figura 16 mostra a média de descendentes por casal por dia, a figura 16-A a 20°C e a figura 16-B a 29°C.

Observa-se na tabela, que as proporções de machos e fêmeas estão próximas do esperado. Na temperatura de 20°C, a linhagem *Est-5^S* produziu um total de 49,25% de machos e 50,75% de fêmeas, enquanto a linhagem *Est-5^F* produziu um total de 46,15% de machos e 53,85% de fêmeas. Na temperatura de 29°C, a linhagem *Est-5^S* produziu um total de 47,3% de machos e 52,7% de fêmeas, enquanto a linhagem *Est-5^F* produziu um total de 51,35% de machos e 48,68% de fêmeas.

Ainda na tabela 1, pode-se observar que na temperatura de 20°C houve uma produtividade maior, de 30% em favor da linhagem *Est-5^F*, em contrapartida, na temperatura de 29°C a linhagem *Est-5^S* deixou em torno de 50% a mais de descendentes que a linhagem *Est-5^F*. A figura 16 ilustra melhor essa diferença, mostrando a diferença por dia. Nesta figura também pode-se perceber que a temperatura alta (figura 16-B) acelera o tempo de desenvolvimento das moscas, já que nos tubos mantidos a 29°C as moscas eclodiram nove dias antes que aquelas mantidas a 20°C (figura 16-A).

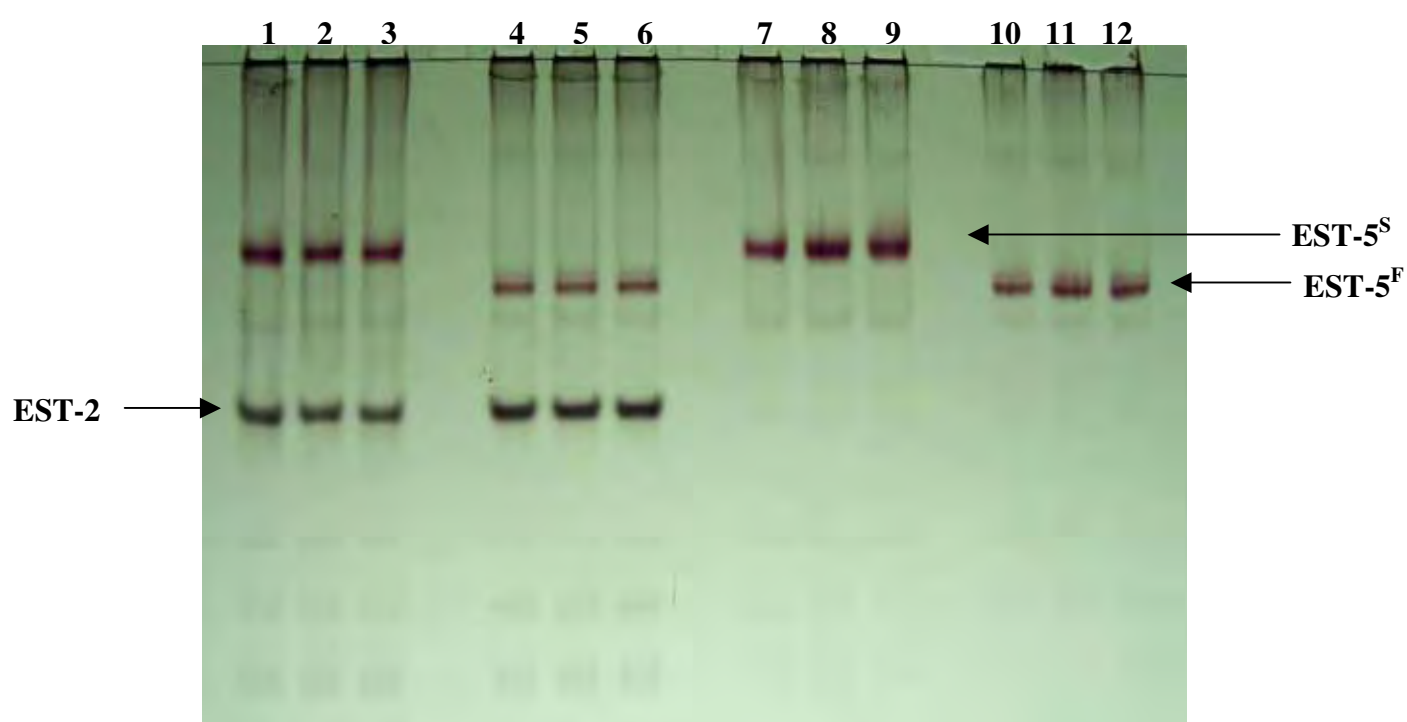


Figura 8: Imagem digitalizada de gel não-desnaturante, corado especificamente para esterases, mostrando ação do PMSF sobre as esterases das linhagens *Est^S* e *Est^F* de *D. mulleri*. Colunas 1-3 e 4-6: extratos brutos das linhagens *Est^S* e *Est^F* não tratadas com o PMSF (controle). Colunas 7-9 e 10-12: extratos brutos das mesmas linhagens pré-incubados por 5 min a temperatura ambiente com PMSF 1 mM.

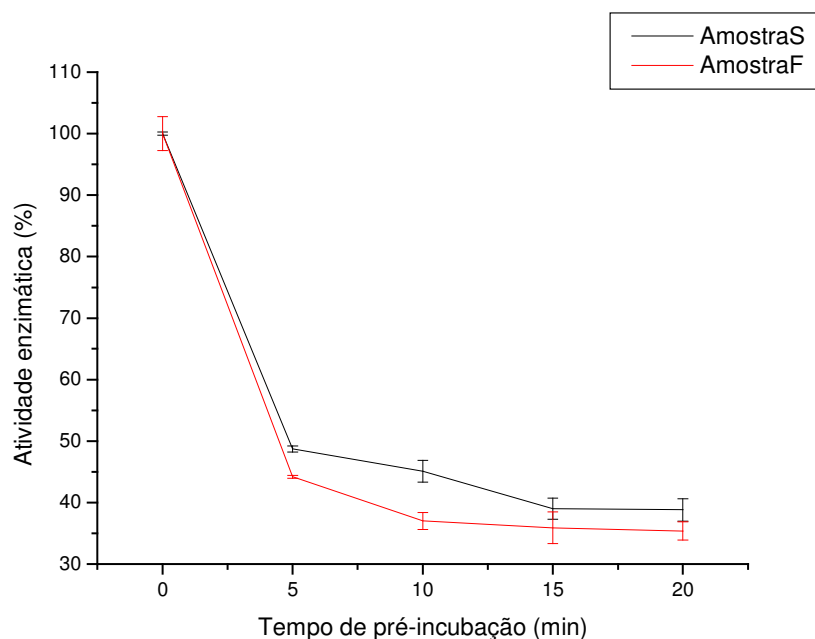


Figura 9: Efeito do tempo de pré-incubação à temperatura de 50°C sobre a atividade das aloenzimas EST-5^S e EST-5^F. As barras verticais indicam o desvio padrão. Os ensaios foram realizados em triplicata.

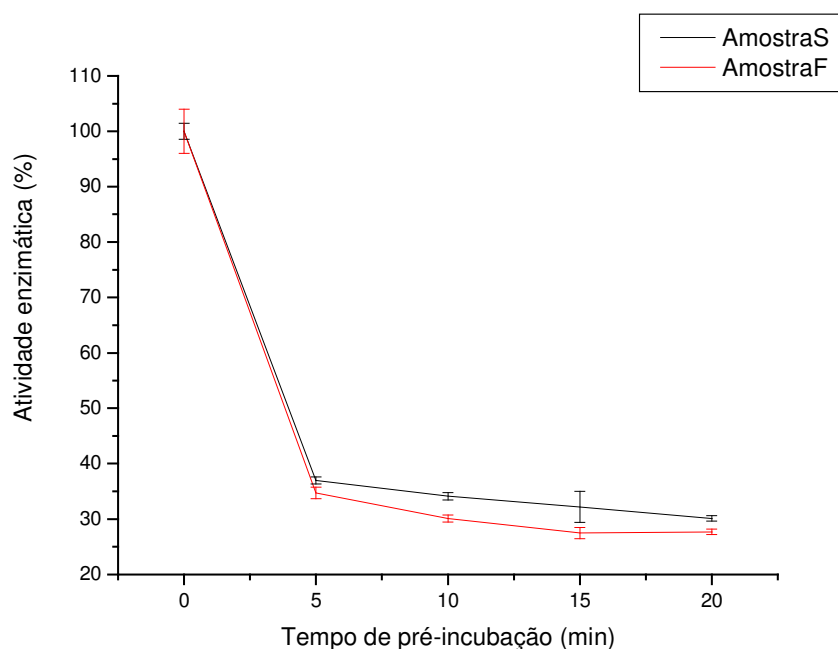


Figura 10: Efeito do tempo de pré-incubação à temperatura de 55°C sobre a atividade das aloenzimas EST-5^S e EST-5^F. As barras verticais indicam o desvio padrão. Os ensaios foram realizados em triplicata.

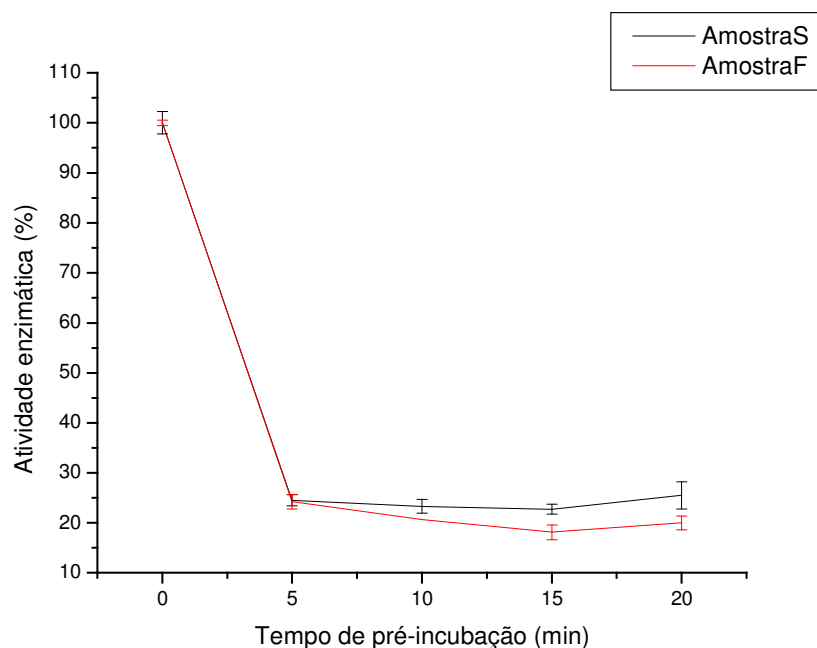


Figura 11: Efeito do tempo de pré-incubação à temperatura de 60°C sobre a atividade das aloenzimas EST-5^S e EST-5^F. As barras verticais indicam o desvio padrão. Os ensaios foram realizados em triplicata.

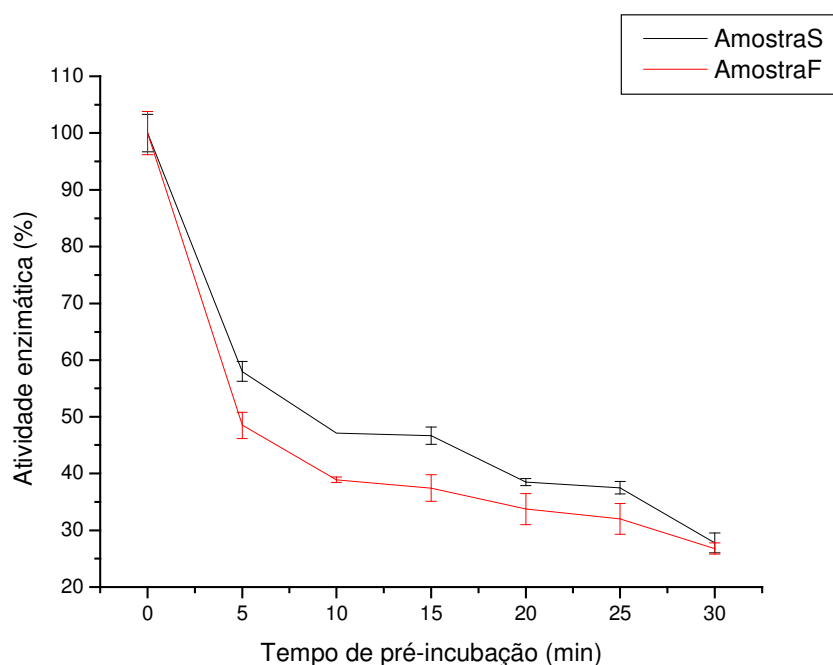


Figura 12: Efeito do tempo de pré-incubação em uréia na concentração 2M sobre a atividade das aloenzimas EST-5^S e EST-5^F. As barras verticais indicam o desvio padrão. Os ensaios foram realizados em triplicata.

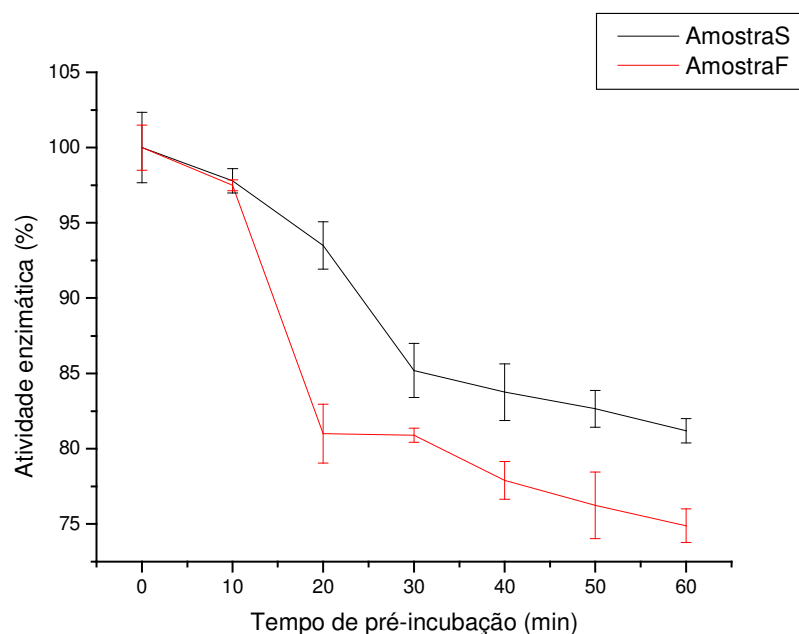


Figura 13: Efeito do tempo de pré-incubação com cloreto de sódio na concentração 2,5 M sobre a atividade das aloenzimas EST-5^S e EST-5^F. As barras verticais indicam o desvio padrão. Os ensaios foram realizados em triplicata.

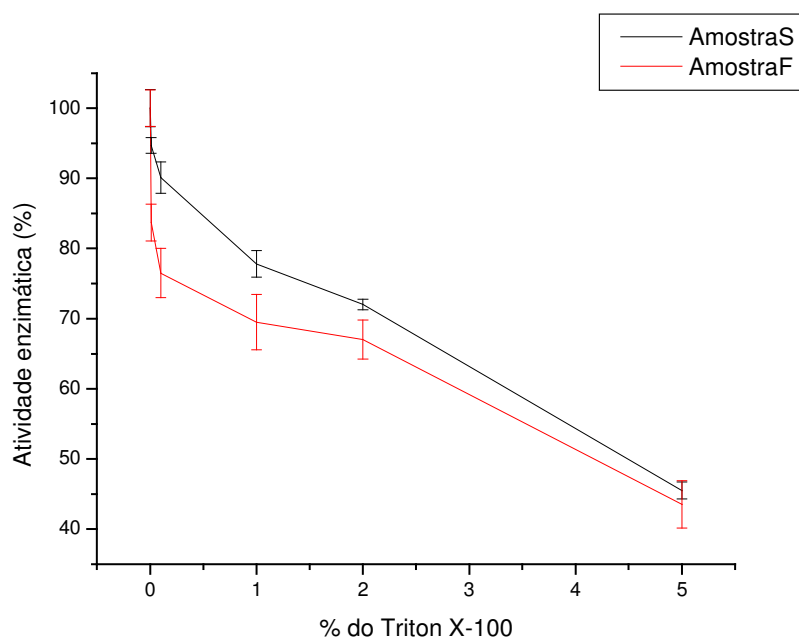


Figura 14: Efeito da concentração do triton X-100 sobre a atividade das aloenzimas EST-5^S e EST-5^F. As barras verticais indicam o desvio padrão. Os ensaios foram realizados em triplicata.

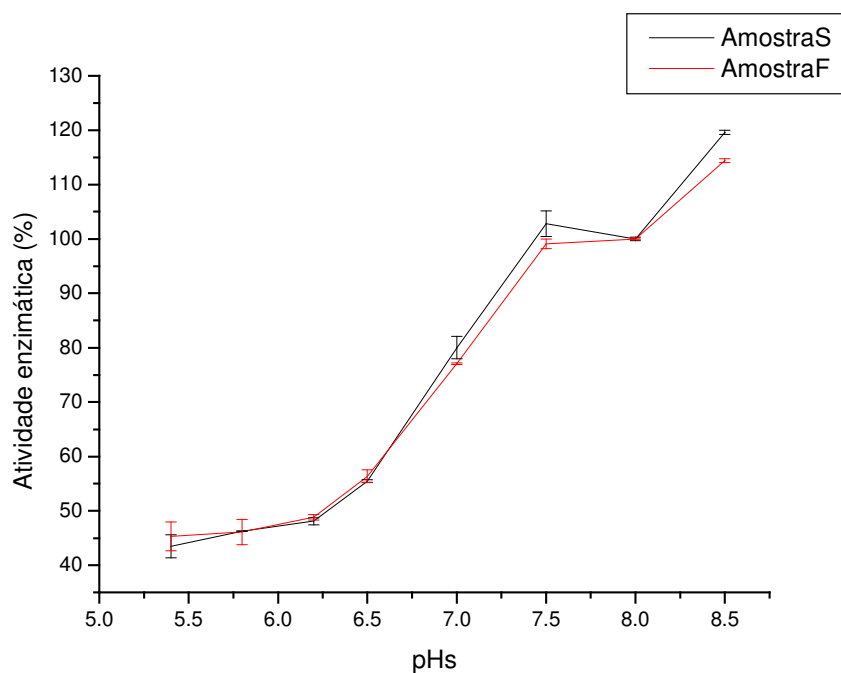
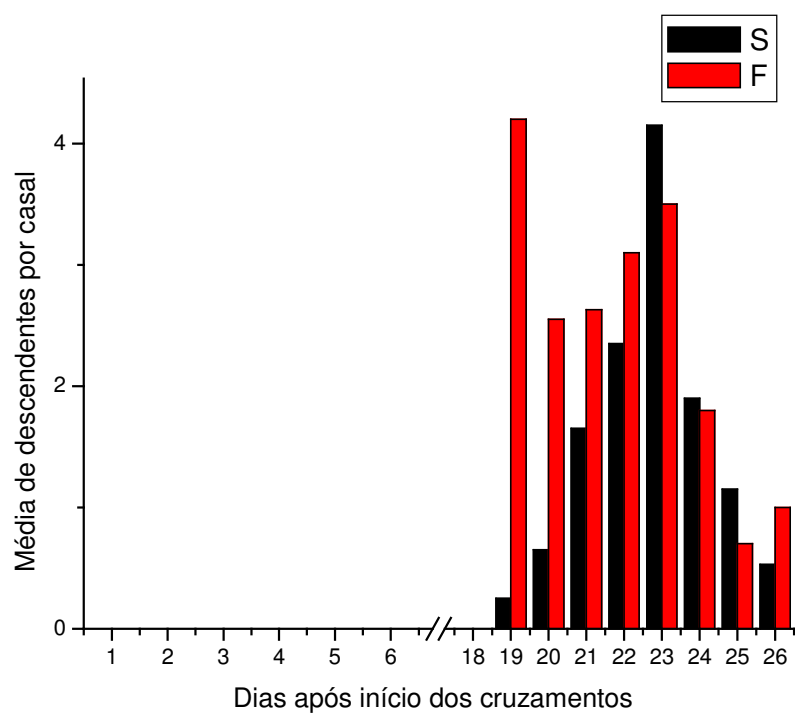


Figura 15: Efeito da variação do pH sobre a atividade das aloenzimas EST-5^S e EST-5^F. As barras verticais indicam o desvio padrão. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Tabela 1: Produtividade média de descendentes por casal a 20 e 29°C para as linhagens *Est-5^S* e *Est-5^F*.

Linhagens	Média do Número de Descendentes por Casal					
	20°C			29°C		
	N	Macho	Fêmea	N	Macho	Fêmea
<i>Est-5^S</i>	19	6.5	6.7	31	19.5	22
<i>Est-5^F</i>	36	9	10.5	39	11.2	10.7

A –



B –

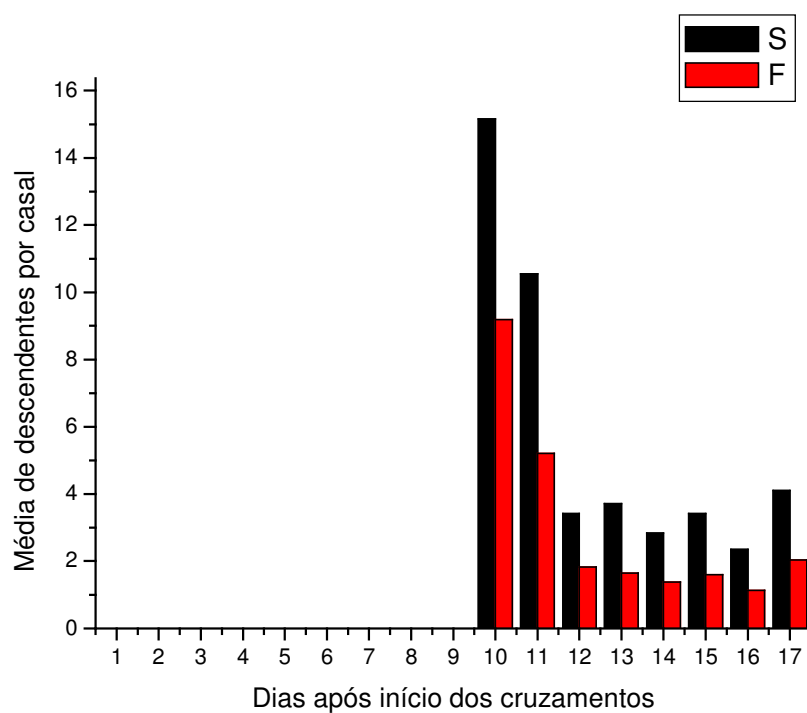


Figura 16 (A e B): Produtividade média de descendentes por casal para as linhagens *Est-5^S* (barras pretas) e *Est-5^F* (barras vermelhas), a 20 (A) e 29°C (B).

V - DISCUSSÃO

Neste trabalho estudou-se o polimorfismo da esterase-5 em *D. mulleri*, no intuito de se compreender quais os mecanismos que atuam na manutenção destas variantes genéticas. Segundo Árnason (1991), que estudou o polimorfismo do loco da *esterase-5* (alelos 100 e 106), loco este ligado ao cromossomo X em *Drosophila pseudoobscura*, assume que a hipótese de seleção balanceada é rejeitada em favor da hipótese nula (Kimura, 1983). Árnason trabalhou com um total de 22 populações réplicas, com onze começando com alta frequência de 76% (população N) do alelo 106 e outras onze com uma baixa frequência de 21% (população U) do mesmo alelo. Depois de 200-300 dias, as frequências alélicas mudaram direcionalmente e diminuíram em ambas as populações U e N como grupo, e alcançaram o equilíbrio de 60 e 14 %, respectivamente. A princípio, esta mudança sugere seleção natural. Contudo, com uma posterior reperturbação das frequências alélicas em cada população, criando-se assim 22 adicionais populações reperturbadas EN e EU, e tendo como controle a população original, foi obtido um resultado diferente, pois as frequências alélicas não mudaram direcionalmente entre as populações reperturbadas como um grupo, concluindo desta maneira, que os alelos 100 e 106 do loco *Est-5* não diferem no valor adaptativo dentro das condições ambientais do laboratório de populações.

Resultados opostos à teoria da neutralidade foram obtidos por Ochando, et al. (1999) que estudaram o valor adaptativo de fêmeas selvagens de *Drosophila melanogaster* com relação às variantes aloenzimáticas das seguintes enzimas: GPDH, ADH, PGM e EST-C. Os componentes do valor adaptativo foram estimados sobre diferentes condições ambientais: duas temperaturas (22 e 28° C) e duas densidades (escasso e lotado). Os parâmetros medidos do valor adaptativo foram fecundidade, taxa de ovoposição e produtividade. O parâmetro densidade teve um significativo efeito sobre produtividade; a temperatura teve um significativo efeito sobre fecundidade, taxa de oviposição e taxa de desenvolvimento. Diferenças no valor adaptativo entre os genótipos aloenzimáticos ocorreram para todos os componentes do valor adaptativo, exceto taxa de oviposição. Mas qual genótipo é superior depende das condições ambientais: heterozigotos exibiram um maior valor adaptativo que os homozigotos em alguns casos, mas inferior em outros. No todo, os experimentos mostraram que os polimorfismos aloenzimáticos são associados com os efeitos de seleção.

No presente trabalho, as duas formas aloenzimáticas mais comuns em *D. mulleri*, as aloenzimas EST-5^S e EST-5^F, foram submetidas a tratamentos físicos e químicos na tentativa de se verificar diferenças entre essas variantes enzimáticas. Além disso, as duas linhagens

homozigotas da esterase-5 foram comparadas em termos de produtividade, em condições de laboratório, nas temperaturas de 20 e 29°C.

Trabalhos realizados submetendo aloenzimas a diferentes condições ambientais vêm sendo realizados há algum tempo. Dentre esses, os mais comuns são aqueles realizados com a temperatura. Khaustova et al. (1992) com alelos da enzima álcool desidrogenase e Totskii et al. (1994) com alelos da esterase-6 de *Drosophila melanogaster* também utilizaram os efeitos das altas temperaturas para identificar os mecanismos atuantes na manutenção destes polimorfismos.

No presente estudo, os experimentos de variação de temperatura revelaram um fator seletivo a favor do alelo *Est-5^S*, pois, como já relatado, a aloenzima EST-5^S resistiu muito mais aos efeitos da temperatura que sua correlata EST-5^F. Além disso, o experimento de produtividade em alta temperatura (29°C) mostrou que indivíduos com o genótipo homozigoto para o alelo *Est-5^S* deixam mais descendentes que indivíduos com o genótipo homozigoto *Est-5^F/Est-5^F*. Esses resultados corroboram os resultados obtidos por Lourenço et al. (2001), que detectaram uma maior adaptabilidade relativa do genótipo *Est-5^S/Est-5^S* seguido pelo heterozigoto *Est-5^F/Est-5^S* que possuía o alelo *Est-5^S* de origem materna, o que é incompatível com a predição de polimorfismo neutro. Neste trabalho, a longevidade foi considerada diretamente como um dos principais componentes associados com o valor adaptativo total. A observação que moscas com o genótipo *Est-5^S/Est-5^S* são significativamente mais longevas sugeriram que esses indivíduos têm a chance de persistir na população por mais tempo e então teriam a possibilidade de produzir mais descendentes. Por outro lado, os machos *Est-5^F/Est-5^F* apresentaram um período de longevidade menor. Os resultados obtidos para produtividade revelaram uma outra possível associação para a frequência aumentada do alelo *Est-5^S* na população. A maior produtividade para os cruzamentos cujas fêmeas parentais tinham o genótipo *Est-5^S/Est-5^S*, principalmente em comparação com o genótipo *Est-5^F/Est-5^F*, certamente contribuiu para a maior performance exibida pelo alelo *Est-5^S*. Em adição, a produtividade média de machos e fêmeas em todas as combinações indicou uma vantagem para as fêmeas portadoras do alelo *Est-5^S*. Este fato, adicionado a maior longevidade dos indivíduos *Est-5^S/Est-5^S* capacitou a classificação deste genótipo como aquele que apresenta maior adaptabilidade.

O resultado de maior resistência da aloenzima EST-5^S à temperatura, obtido no presente trabalho, poderia realmente conferir maior valor adaptativo aos seus portadores em ambientes de elevada temperatura, pois, como visto nas figuras 3, 9, 10 e 11, a atividade enzimática da aloenzima EST-5^F decresce mais rapidamente com o aumento do tempo de pré-

incubação que a sua correlata, portanto, os portadores do alelo *EST-5^S* sobreviveriam melhor nesses ambientes, sendo mais longevos, produzindo maior descendência. Essa hipótese foi reforçada pelos experimentos de produtividade, no qual os genótipos homozigotos *Est-5^S/Est-5^S* deixaram mais descendentes a 29°C.

Os dados obtidos do presente trabalho corroboram os resultados de Totskii et al. (1994), que estudaram os efeitos do sistema gene-enzima da esterase-6 sobre a expressão dos traços de viabilidade em *Drosophila melanogaster* em diferentes temperaturas. Os resultados desses trabalhos indicaram que a aloenzima S, que tem menor mobilidade eletroforética, é mais resistente a altas temperaturas (57°C) que a aloenzima F. Comparando as linhagens, as moscas homozigotas S foram mais resistentes a altas temperaturas e foram duas vezes mais férteis que as moscas homozigotas F. Esta vantagem seletiva da linhagem S foi monitorada por 40 gerações em altas temperaturas (29°C). Além disso, nas populações experimentais que começaram com uma razão 1:1 da *Est-6^F* e *Est-6^S*, e que foram mantidas em 29°C, foi demonstrado um aumento na frequência do alelo S. Khaustova et al. (1992) também concluíram que influências constantes (período de vida de 25 gerações) de elevada temperatura mudaram a estrutura genética das populações, devido às vantagens seletivas do alelo S da enzima álcool desidrogenase, sobre estas condições. Lourenço (2000) também examinou o conjunto de populações de *Drosophila mulleri* iniciadas com diferentes frequências iniciais do alelo *Est-5^S* na temperatura de 25°C. Foi demonstrado que depois de 12 gerações o genótipo *Est-5^S/Est-5^S* foi o mais frequente em todas as populações, independentemente das frequências iniciais deste alelo quando as populações foram estabelecidas.

Nos experimentos de produtividade do presente trabalho, também foi observado que na temperatura de 20°C houve uma vantagem da linhagem *Est-5^F/Est-5^F*, que deixou mais descendentes, em torno de 30% a mais que a linhagem *Est-5^S/Est-5^S*. Entretanto, há um efeito claro da temperatura de 29°C em relação ao genótipo *Est-5^S*. Esses resultados poderiam explicar a manutenção do alelo F nas populações, pois a vantagem seletiva depende das condições ambientais, que ora favorece um alelo, ora o outro.

De maneira semelhante, Bulyi et al. (1994) concluíram que a seleção natural é quem mantém o polimorfismo nas populações naturais. Esses autores estudaram as frequências alélicas de três locos aloenzimático, o ADH, o alfa-GPDH e o EST-6, em populações naturais de *Drosophila melanogaster* do leste europeu, do Cáucaso e da Ásia Central. Os dados obtidos por eles foram combinados com dados de outros autores sobre o polimorfismo do

ADH, do alfa-GPDH e do EST-6 em outras regiões da Eurásia. Esses dados foram analisados na tentativa de se encontrar um padrão de diferenciação geográfica em escala continental. A frequência do alelo ADH-S apresentou-se negativamente correlacionada com a latitude e a média de chuva do mês mais seco, e positivamente correlacionadas com a temperatura média do mês mais frio e a média de chuvas do mês mais chuvoso. A frequência do alfa-GPDH-S aumentou na parte oeste da Eurásia e não foi associada com variabilidade climática. A frequência do alelo *Est-6^S* aumentou em direção ao centro do continente e foi positivamente correlacionada com a temperatura do mês mais frio e com a média de chuvas do mês mais seco. Esses resultados reforçam que a variação genética deve ser mantida em populações pela força da seleção balanceada.

Os resultados obtidos com a uréia (figuras 4 e 12) também condizem com os resultados obtidos com os experimentos de temperatura. Em ambas as figuras, os resultados indicam que a aloenzima EST-5^S resiste a um maior tempo que a EST-5^F sobre a concentração de uréia 2M. Na figura 12, a atividade catalítica da EST-5^S permanece maior em todos os pontos, até que, aos 30 minutos, ambas atingem uma atividade enzimática perto dos 30 %. Esses resultados sugerem que devam existir diferenças, mesmo que sutis, na estrutura das aloenzimas que permita que a aloenzima EST-5^S resista mais, tanto às altas temperaturas como a agentes desnaturantes.

Da mesma maneira que a temperatura e a uréia, elevadas concentrações de cloreto de sódio mostraram um efeito maior sobre a aloenzima EST-5^F. Na figura 5, observa-se-se que os controles de ambas as aloenzimas apresentam níveis idênticos de atividade enzimática, isso é notado pela coloração, enquanto nas alíquotas tratadas nota-se uma diferença nos níveis de atividade, isto é a EST-5^F apresenta menor atividade catalítica do que a sua correlata, mesmo que com uma pequena diferença metodológica, pois as aloenzimas foram pré-incubadas juntas no NaCl. Todavia, a figura 14 ilustra melhor essa diferença entre as aleloenzimas, apesar destas não apresentarem tanto prejuízo na suas atividades enzimáticas perante o cloreto de sódio, 82,5 % para a EST-5^S e 75% para EST-5^F.

O triton X-100 é um detergente não-iônico comumente usado em tampão de extração de enzima destinado a ensaios enzimáticos. Contudo, trabalhos mais recentes concluíram que o triton X-100 altera e modula atividade de acetilcolinesterases e butirilcolinesterases (Jaganathan e Boopaty, 1998; Marcel et al.,2000; Rosenfeld et al., 2001). E, também, reduz a atividade de carboxilesterases com o aumento de sua concentração (Vioque-Fernández et al.2007), experimento este, realizado com camarões-d'água-doce da espécie *Procambarus clarkii*, cuja atividade esterásica foi reduzida a menos da metade em concentrações acima de 2

%. De maneira similar, o resultado do experimento com o triton X-100 (figura 14) do presente trabalho também demonstrou a diminuição da atividade das carboxilesterases frente a este detergente e, possibilitou ainda, a diferenciação das aloenzimas.

Em relação ao pH, os dados da figura 15 mostram que ambas as aloenzimas apresentam curvas de pH semelhantes. Assim, o pH não deve influir na distinção entre elas.

Portanto, os resultados em conjunto sugerem que a aloenzima EST-5^S apresenta um comportamento de maior resistência à desnaturação térmica ou por agentes caotrópicos, bem como maior atividade em altas concentrações salina, além da maior produtividade nos experimentos a 29°C, o que poderia conferir uma maior vantagem adaptativa aos seus portadores.

Tem sido dada tanta importância às esterases, que em diversas espécies, essas têm sido purificadas e caracterizadas quanto às suas propriedades, proporcionando um maior entendimento das funções delas. A maioria dos trabalhos com purificação e caracterização é relativa à área de resistência a inseticidas, que tentam esclarecer as funções das esterases em linhagens resistentes a produtos agroquímicos.

Entre esses trabalhos, foi encontrado o de Prabhakaran e Kamble (1995), que purificaram e caracterizaram as formas mais ativas das esterases E5, E6, e E7, em *Blattella germanica* (barata da Alemanha), tanto das linhagens resistentes como das linhagens susceptíveis a inseticidas desta espécie. Os resultados desses autores sugerem que a resistência aos inseticidas nesta espécie de barata seja devido ao aumento da produção da isoenzima E6, cuja atividade principal deve ser a de sequestrar as moléculas dos inseticidas, seguida de uma hidrólise mais lenta.

Em outro estudo, Lee et al. (2000) purificaram e caracterizaram uma esterase que conferia resistência ao coleóptero da espécie *Oryzaephilus surinamensis* frente a vários inseticidas organofosforados. A esterase da linhagem resistente, designada como A, não encontrada na linhagem susceptível, foi purificada e caracterizada pelas técnicas de cromatografia e eletroforese, com uma massa molecular de 130 kDa, consistindo de duas subunidades de 65 kDa, estimada por SDS-PAGE.

Haubruge et al. (2002) utilizaram muitas técnicas para conseguir a purificação de uma carboxilisterase que confere resistência específica a linhagens de *Tribolium castaneum* ao malathion. A enzima purificada apresentou um peso molecular de 62 kDa.

Srinivas et al. (2006) purificaram e caracterizaram uma isoenzima esterásica envolvida na hidrólise de compostos organofosforados de uma peste resistente a inseticida, a *Helicoverpa armigera*, coletada de safra de campos. A massa molecular determinada por

SDS-PAGE foi de 66 kDa. A enzima foi parcialmente seqüenciada e identificada como alcalino fosfatase.

Neste trabalho realizamos a purificação das aloenzimas EST-5^S e EST-5^F em *D. mulleri* a partir de linhagens homozigotas para essas enzimas. Com a intenção de se obter as diferenças nas seqüências de aminoácidos entre as aleloenzimas, estas foram encaminhadas para a identificação no Laboratório Nacional de Luz Síncrona - LNLS, no Laboratório de Espectrometria de Massas, em Campinas, SP, cujos resultados ainda não foram obtidos. O sequenciamento de fragmentos das aloenzimas purificadas serão oportunamente utilizados para o desenho de oligonucleotídeos iniciadores, visando o sequenciamento do gene da esterase-5.

Ambas as aloenzimas foram purificadas, como mostrado nas figuras 6 e 7. Na figura 6, as massas moleculares encontradas para as subunidades das EST-5^S e EST-5^F são idênticas e estimadas em torno de 66 e 68 kDa por SDS-PAGE. Esses resultados reforçam a idéia de que a migração diferente em géis não desnaturantes seja devido ao efeito de carga elétrica, provavelmente envolvendo mutações que tenham substituídos aminoácidos de cargas opostas ou aminoácidos neutros por aminoácidos eletricamente carregados.

Os resultados da purificação foram confirmados utilizando-se um sistema que preserva a atividade enzimática. A figura 7 mostra a separação das esterases em gel de poliacrilamida - SDS, onde as amostras não foram fervidas. Após a corrida eletroforética, o gel foi pré-incubado em tampão fosfato com triton X-100 2,5 %, para remoção do SDS, e, posteriormente, foi corado especificamente para esterases. Portanto, as bandas que são visualizadas neste gel são o resultado da atividade catalítica das aloenzimas purificadas sobre o substrato β -naftil-acetato, dessa forma, assegurando que as proteínas purificadas na figura 6 são realmente as EST-5^S e EST-5^F. Contudo, nesta figura 7, as aleloenzimas apresentaram migrações diferentes, explicado pela metodologia empregada. Nesse caso, o SDS deve ter contribuído para a dissociação das subunidades que ainda apresentaram atividade catalítica. Como as isoenzimas não foram totalmente desnaturadas, mas apenas dissociadas em suas subunidades observou-se, nesse caso, que a migração também teve a influência da carga total das subunidades das proteínas, e não devido ao peso molecular, como é o caso da figura 6. Além disso, a figura 7 também pode ser explorada para ilustrar a diferença de resistência das aleloenzimas frente ao triton, pois como visualizado, a atividade esterásica da EST-5^S foi mais expressiva que a EST-5^F, que apresentou atividade catalítica mais reduzida.

Pen et al. (1986) também purificaram as duas principais variantes da esterase-5 de *D. mojavensis*, espécie pertencente ao mesmo complexo *mulleri*. Da mesma forma, as EST-5⁹⁶ e

EST-5¹⁰⁰ foram purificadas de linhagens homozigotas para os alelos codificantes destas isoenzimas. E, semelhantemente aos nossos resultados, as aleloenzimas apresentaram massas moleculares iguais em SDS-PAGE. As subunidades das EST-5⁹⁶ e EST-5¹⁰⁰ de *Drosophila mojavensis* apresentaram uma massa molecular entre 64 e 66 kDa, um pouco menor que a esterase-5 de *Drosophila mulleri*.

Lee *et al.* (2000) também realizaram ensaios enzimáticos com a enzima em extrato bruto e só depois purificaram uma das esterases (designada como A). Esses autores purificaram e caracterizaram a esterase A (enzima não encontrada nas linhagens susceptíveis ao inseticida) que conferia resistência ao coleóptero da espécie *Oryzaephilus surinamensis* frente a vários inseticidas organofosforados. As atividades esterásicas dos extratos brutos das linhagens resistentes (linhagem VOSF) e susceptíveis (linhagem VOS48) foram realizadas com três substratos: ρ -nitrofenil acetato, α -naftil acetato e β -naftil acetato. A linhagem VOSF mostrou elevada atividade esterásica em comparação a linhagem VOS48, demonstrando assim o nível de esterases em insetos adultos para as duas linhagens.

Haubruge *et al.* (2002) caracterizaram cineticamente a carboxilisterase que confere resistência ao malathion (MCE) em *Tribolium castaneum*. A MCE de linhagens resistentes apresentou um K_m 17 vezes menor e uma V_{max} 4,6 vezes maior do que a MCE de linhagens susceptíveis. No entanto, a MCE das linhagens susceptíveis hidrolisou o α -naftil acetato mais rápido do que a MCE de linhagens resistentes. A constante de especificidade para as duas esterases estudadas mostrou que a MCE de linhagens susceptíveis preferem o α -naftil acetato ao malathion, por outro lado, a MCE de linhagens resistentes apresentou uma melhor especificidade ao malathion comparado ao α -naftil acetato. Desta forma os autores concluem que a resistência específica ao malathion é devido à presença de uma esterase qualitativamente diferente.

Como observado, há trabalhos comparando os valores cinéticos de variantes isoenzimáticas, principalmente aquelas variantes que proporcionam resistência a inseticidas. E essas, na maioria dos casos, apresentam características cinéticas distintas. Em contrapartida, nos resultados do presente trabalho, os valores de V_{max} e K_m foram semelhantes para ambas as aloenzimas, o que sugere que a diferença entre elas não esteja relacionada à atividade do sítio catalítico, mas talvez as diferenças sutis em suas estruturas, causadas por trocas de aminoácidos, que originaram a resistência diferencial entre elas.

VI – CONCLUSÃO

Os resultados dos extratos brutos contendo as aloenzimas EST-5^S e EST-5^F submetidos a tratamentos físicos e químicos, juntamente com os resultados dos experimentos de produtividade e dados da literatura, são incompatíveis com a hipótese da neutralidade para a manutenção do polimorfismo no loco da *esterase-5* de *Drosophila mulleri*, devido ao fator seletivo a favor do alelo *Est-5^S* nas condições estudadas.

Os experimentos de purificação reforçaram importantes dados sobre as aloenzimas, pois estas apresentaram subunidades de mesma massa molecular, o que deixa claro que a migração diferente em géis não desnaturantes seja devido ao efeito de carga elétrica, provavelmente envolvendo mutações que tenham substituídos aminoácidos de cargas opostas ou aminoácidos neutros por aminoácidos eletricamente carregados.

A caracterização cinética forneceu os valores de V_{max} e K_m , que embora semelhantes, sugeriram que a diferença entre elas não esteja relacionada à atividade do sítio catalítico, mas talvez as diferenças sutis em suas estruturas, causadas por trocas de aminoácidos, que provavelmente originaram a resistência diferencial entre elas.

REFERÊNCIAS

- ANDERSON, P. R.; OAKESHOTT, J. G. Parallel geographic patterns of allozymic variation in two sibling *Drosophila* Species. *Nature*, v.308, p.729-731, 1984.
- ÁRNASON, E. Perturbation-reperturbation test of selection vs. hitchhiking of the two major alleles of *esterase-5* in *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics*, v.129, p.145-168, 1991.
- ARGENTINE, J. A.; JAMES, A. A. Characterization of a salivary gland-specific esterase in the vector mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect. Biochem. Mol. Biol.*, v. 25(5), p.621–630, 1995.
- AYALA, F. J.; BALAKIREV, E. S.; SÁEZ, A. G. Genetic polymorphism at two linked loci, *Sod* and *Est-6*, in *Drosophila melanogaster*. *Gene*, v. 300, p.19–29, 2002.
- BALAKIREV, E. S.; BALAKIREV, E. I.; AYALA, F. J. Molecular evolution of the *Est-6* gene in *Drosophila melanogaster*: contrasting patterns of DNA variability in adjacent functional regions. *Gene*, v. 288, p.167-177, 2002.
- BALAKIREV, E. S.; BALAKIREV, E. I.; RODRIGUEZ-TRELLES, F.; AYALA, F. J. Molecular evolution of two linked genes, *Est-6* and *Sod*, in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, v.153, p.1357-1369, 1999.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v.72, p.248-254, 1976.
- BRADY, J. P.; RICHMOND, R. C. "Molecular analysis of evolutionary changes in the expression of *Drosophila* esterases" *Proc. Nat. Acad. Sci.*, v. 87, p. 8217-8221, 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*. *Molecular Biology and Evolution*, v.7, 1990.

- BUBLIY, O. A.; KALABUSHKIN, B. A.; IMASHEVA, A. G. Geographic variation of six allozyme loci in *Drosophila melanogaster*: An analysis of data from different continents. *Hereditas*, v.130, p. 25, 1999.
- BUBLIY, O. A.; IMASHEVA, A. G.; LAZEBNYI, O. E. Geographic variability of Adh, alpha-Gpdh, and Est-6 loci in natural Eurasia *Drosophila melanogaster* populations. *Genetika*, v.4, p.467- 477, 1994.
- CASTIGLIONI-RUIZ, L.; BICUDO, H. E. M. C.; CERON, C. R. Esterase patterns in four brazilian populations of *Haematobia irritans*. *Cytobios*, v.90, p.81-94, 1997.
- CERON, C. R. *Padrão de esterases no desenvolvimento de Drosophila mulleri, D. arizonensis e seus híbridos*. 1988. 142f. Tese (Doutorado em Genética) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1988.
- CERON, C. R.; SANTOS, J. R.; BICUDO, H. E. M. C. The use of gelatin to dry cellophane wound slab gels in an embroidering hoop. *Rev. Brasil. Genet.*, v.15, p.201-3, 1992.
- COOKE, P. H.; OAKESHOTT, J. G. Amino-acid polymorphisms for esterase-6 in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, v.86(4), p.1426-1430, 1989.
- DRIESEL, S.; BACHMANN, L.; STAUSS, M.; SEGELBACHER, G.; FLACH, D.; TOMIUK, J.; KOMPFF, J. High genetic variability of esterase loci in natural populations of *Parus major*, *P. caeruleus*, and *P. ater*. *Biochemical Genetics*, v.42, p.109-119, 2004.
- DURANDO, C. M.; BAKER, R. H.; ETGES, W. J.; HEED, W. B.; WASSERMAN, M.; DESALLE, R. Phylogenetic analysis of the repleta species group of the genus *Drosophila* using multiple sources of characters. *Mol. Phylogenet. Evol.*, v.16, p. 296–307, 2000.
- EAST, P. D. Non-specific esterases of *Drosophila buzzatii*. In: BARKER, I. S. F.; STAMER, W. T. (Ed.). *Ecological genetics and evolution: the cactus-yeast Drosophila model system*. Sidney: Academic Press, 1982. p. 323-338.

- ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRESS, V.; FEATHERSTONE, M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, v.4, p.88–95, 1961.
- ETGES, W. J.; JACKSON, L. L. Premating isolation is determined by larval rearing substrates in cactophilic *Drosophila mojavensis*. VI. Epicuticular hydrocarbon variation in *Drosophila mojavensis* cluster species. *J. Chem. Ecology.*, v.27, p. 2125–2149, 2001.
- GUPTA, S. C.; SIDDIQUE, H. R.; SAXENA, D. K.; CHOWDHURI, D. K. Hazardous effect of organophosphate compound, dichlorvos in transgenic *D. melanogaster* (*hsp70-lacZ*): induction of hsp70n anti-oxidant enzymes and inhibition of acetylcholinesterase. *Biochem. Et Biophys. Acta.*, v.1725, p.81-92, 2005.
- HAUBRUGE, E.; AMICHOT, M.; CUANY, A.; BERGE, J. B.; ARNAUD, L. Purification and characterization of carboxylesterase involved in malathion-specific resistance from *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Insect Biochem. And Mol. Biology*, v 32, p. 1181-1190, 2002.
- HEED, W. B. The origin of *Drosophila* in the Sonoran Desert, In: BARKER, J. S. F.; STARMER, W. T. (Ed.). *Ecological genetics and evolution: the cactus-yeast-Drosophila* model system. Sydney: Academic Press, 1982. p. 65-80.
- HEED, W. B.; SANCHEZ, A.; ARMENGOL, R.; FONTDEVILA, A. Genetic differentiation among island populations and species of cactophilic *Drosophila* in the West Indies. In: BARKER, J. S. F.; STARMER, W. T.; MACINTYRE, R. J. (Ed.). *Ecological and Evolutionary Genetics of Drosophila*. New York: Plenum Press, 1990. p. 447-490.
- HOLMES, R. S.; MASTERS, C. J. The developmental multiplicity and isoenzyme status of cavian esterases. *Biochem. Biophys. Acta.*, v.132; p. 379-399, 1967.
- IUPAC-IUB COMISSION on Biochemical Nomenclature. Nomenclature of multiples forms of enzymes. Recommendations (1976). *J. Biol. Chem.*, v.252, p.5939-41, 1977.

- JAGANATHAN, L.; BOOPATY, R. Interaction of Triton X-100 with acyl pocket of butyrylcholinesterase: effect on esterase activity and inhibitor sensitivity of the enzyme. *Indian. J. Biochem.*, v.35, p.142–147, 1998.
- JONES, G.; VENKATARE, B. R.; RIDLEY, B.; O'MANOY, P.; TURNER, H. Structure, expression and gene sequence of a juvenile hormone esterase-related protein from metamorphosing larvae of *Trichoplusia ni*. *Biochem. J.*, v.302, p. 827-35, 1994.
- KHAUSTOVA, N. D.; TOTSKII, V. M.; STREL'TSOVA, N. A. Gene-enzyme system of alcohol dehydrogenase and adaptation of *Drosophila* to increased temperature. *Genetika*, v.5, p.73-80, 1992.
- KERLIN, R. L.; HUGHES, S. Enzymes in saliva from four parasitic arthropods. *Med. Ved. Entom.*, v.6, p.121-126, 1992.
- KIMURA, M. *The neutral theory*. Cambridge: University Press, 1983.
- KORT, C. A.; GRANGER, N. A. Regulation of the juvenile hormone titer. *Ann. Rev. Entomol.*, v.26, p.1-20, 1981.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature*, v.227, p. 680-685, 1970.
- LAPENTA, A. S.; BICUDO, H. E. M. C.; CERON, C. R. Esterase patterns of species in the *Drosophila buzzatii* cluster. *Cytobios*, v.84, p.13–29, 1995.
- LAPENTA, A. S.; BICUDO, H. E. M. C.; CERON, C. R.; CORDEIRO, J. A. Esterase patterns and phylogenetic relationships of species and strains included in the *Drosophila buzzatti* cluster. *Cytobios*, v.96, p. 95-107, 1998.
- LEE, S.; LEES, E. M.; CAMPBELL, B. C. Purification and characterization of an esterase conferring resistance to fenitrothion in *Oryzaephilus surinamensis* (L.) (Insecta, Coleoptera, Silvanidae). *J. Agric. Food Chem.*, v.48, p.4991-4996, 2000.

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

LOURENÇO, M. F. *Efeito de variantes moleculares da esterase-8 sobre o valor adaptativo de Drosophila mulleri*. 2000. 162f. Tese (Doutorado em Genética) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, SP, 2000.

LOURENÇO, M. F.; CERON, C. R.; CARARETO, C. M. A. Evaluation of fitness components in strains of *Drosophila mulleri* carrying different genotypes for an esterase. *Cytobios*, v.106, p.125-138, 2001.

MARCEL, V.; ESTRADA-MONDACA, S.; MAGNÉ, F.; STOJAN, J.; KLAÉBÉ, A.; FOURNIER, D. Exploration of the *Drosophila* acetylcholinesterase substrate activation site using a reversible inhibitor (Triton X-100) and mutated enzymes. *J. Biol. Chem.*, v.275, p.11603–11609, 2000.

MATEUS, R. P. Caracterização da esterase larval em espécies de *Drosophila* do complexo *mulleri* (grupo *repleta*). 1997. 76f. (Mestrado em Genética). Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 1997.

MATEUS, R. P.; SENE, F. M. Temporal and spatial allozyme variation in the South American cactophilic *Drosophila antonietae* (Diptera; Drosophilidae). *Biochemical Genetics*, v. 41, 2003.

MATEUS, R. P.; CABRAL, H.; BONILLA-RODRIGUEZ, G. O; CERON, C. R. Molecular weight estimation of esterase isoenzymes in closely related *Drosophila* species (Díptera: Drosophilidae) in non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 2008. No prelo.

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

- NASCIMENTO, A. P.; BICUDO, H. E. M. C. Esterase patterns and phylogenetic relationships of *Drosophila* species in the *saltans* subgroup (*saltans* group). *Genetica*, v.114, p.41-51, 2002.
- OCHANDO, M. D.; AYALA, F. J. Fitness of wild-caught *Drosophila melanogaster* females: allozyme variants of GPDH, ADH, PGM, and EST. *Genetica*, v.105, p.7-18, 1999.
- OAKESHOTT, J. G.; CHAMBERS, G. K.; GIBSON, J. B.; WILLCOCKS, D.A. Latitudinal relationships of esterase-6 and phosphoglucomutase gene frequencies in *Drosophila melanogaster*. *Heredity*, v.47, p.385-396, 1981.
- OAKESHOTT, J. G.; PAPENRECHT, E. A.; BOYCE, T. M.; HEALY, M. J.; RUSSELL, R. J. Evolutionary genetics of *Drosophila* esterases. *Genetica*, v.90, p.239-268, 1993.
- PAULINO, R. M. Sequenciamento de uma esterase macho-específica em *Zaprionus indianus*. 2008. 79f. (Mestrado em Genética) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2008.
- 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.
- PEN, J.; BEEUMEN, J. V.; BEINTEMA, J. J. Estrutural comparison of two esterases from *Drosophila mojavensis* isolated by immunoaffinity chromatography. *Biochem. J.*, v.238, p.691-699, 1986.
- PEREIRA, M. A.; VILELA, C. R.; SENE, F. M. Notes on breeding and feeding sites in some species of *repleta* group of genus *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae). *Cien. e Cult.*, v.35, p. 1313-1319, 1983.
- POWELL, J. R. *Progress and prospects in evolutionary biology: the Drosophila model*. New York: Oxford University Press, 1997.

- PRABHAKARAN, S. K.; KAMBLE, S. T. Purification and characterization of an esterase isozyme from insecticide resistant and susceptible strains of german cockroach, *Blattella germanica* (L.). *Insect. Biochem. Molec. Biol.*, v.25, p.519-524, 1995.
- RAUSCHENBACH, I. Y.; LUKASHINA, N. S.; KOROCKKIN, L. I. Role of pupal esterase in regulation of hormonal status in two *D. virilis* stocks differing in response to high temperature. *Develop. Genet.*, v22, p.65-80, 1994.
- RICHARDSON, R. H.; RICHARDSON, M. E.; SMOUSE, P. E. Evolution of electrophoretic mobility in the *Drosophila mulleri* complex. In: MARKERT, C. L (Ed.). *Isozymes IV: Genetics and Evolution*. New York: Academic Press, 1975. p. 533–545.
- RICHARDSON, R. H.; SMOUSE, P. E. Patterns of molecular variation. I. Interspecific comparison of electromorphs in the *Drosophila mulleri* complex. *Biochem. Genet.*, v.14, p. 447–465, 1976.
- RICHARDSON, R. H.; SMOUSE, P. E.; RICHARDSON, M. E. Patterns of molecular variation. II. Associations of electrophoretic mobility and larval substrate within species of the *Drosophila mulleri* complex. *Genetics*, v.85, p.141–154, 1977.
- 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 p. 849-853, 1991.
- RITZ, F. R. C. Padrão de esterases em *Megaselia scalaris*. 1997. 128f. Tese (Doutorado em Genética) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 1997.
- RODRIGUEZ, C.; PICCINALI, R.; LEVY, E.; HASSON, E. Contrasting population genetic structures using allozymes and the inversion polymorphism inversion in *Drosophila buzzatii*. *J. Evol. Biol.*, v.13, p.976, 2000.
- RUIZ, A.; FONTDEVILA, A. Ecología y evolución del grupo *mulleri* de *Drosophila* en Venezuela y Colombia. *Acta. Cient. Venezolana.*, v.32, p. 338-345, 1981

- ROSENFELD, C.; KOUSBA, A.; SULTATOS, L. G. Interactions of rat brain acetylcholinesterase with the detergent Triton X-100 and the organophosphate paraoxon. *Toxicol. Sci.*, v.63, p.208–213, 2001.
- RUSO, C. A. M.; TAKEZAKI, N.; NEI, M. Molecular phylogeny and divergence times of *Drosophilid* species. *Mol. Biol. Evol.*, v.12, p.391–404, 1995.
- SAAD, M.; GAME, A. Y.; HEALY, M. J.; OAKESHOTT, J.G. Associations of esterase-6 allozyme and activity variation with reproductive fitness in *Drosophila melanogaster*. *Genetica*, v.94, p.43-56, 1994.
- SEE, Y. S.; JACKOWSKI, G. Estimating molecular weights of polypeptides by SDS gel electrophoresis. In: CREIGHTON, T.E. *Protein structure: a practical approach*. New York: IRL, 1989. p. 1-19.
- SRINIVAS, R.; JAYALAKSHMI, S. K.; SREERAMULU, K.; SHERMAN, N. E.; RAO, J. Purification and characterization of an esterase isozyme involved in hydrolysis of organophosphorus compounds from an insecticide resistant pest, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctüidae). *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1760, p.310–317, 2006.
- SPACKMAN, M. E.; OAKESHOTT, J. G.; SMITH, K.; MEDVECZKY, K. M.; RUSSEL, R. J. A cluster of esterase genes on chromosome 3R of *D. melanogaster* includes homologues of esterase genes conferring insecticide resistance in *Lucilia cuprina*. *Biochem. Genet.*, v.32, p.39-62, 1994.
- SPICER, G. S. Phylogenetic utility of the mitochondrial cytochrome oxidase gene: Molecular evolution of the *Drosophila buzzatii* species complex. *J. Mol. Evol.*, v.41, p.749 –759, 1995.
- SPICER, G. S.; PITNICK, S. Molecular systematics of the *Drosophila hydei* subgroup as inferred from mitochondrial DNA sequences. *J. Mol. Evol.*, v. 43, p.281–286, 1996.
- SREERAMA, L.; VEERABHADRAPPA, P. S. Purification and properties of carboxylesterases from the mid-gut of the termite *Odontotermis worni*. *Insect Biochem.*, v.21(8), p.833–844, 1991.

- SULLIVAN, D. T.; ATKINSON, P. W.; BAYER, C. A.; MENOTTI-RAYMOND, M. The evolution of Adh expression in the *repleta* group of *Drosophila*. In: BARKER, J. S. F.; STARMER, W. T.; MACINTYRE, R. J. (Ed.). *Ecological and evolutionary Genetics of Drosophila*. New York: Plenum Press, 1990. p. 407–418.
- TARTARENKOV, A.; AYALA, F. Phylogenetic relationships among species groups of the virilis-repleta radiation of *Drosophila*. *Mol. Phylogen. Evol.*, v.21, p. 327-331, 2001.
- TIDON-SKLORZ, R.; SENE, F. M. Two newspecies of the *Drosophila serido* sibling set (Diptera, Drosophilidae). *Iheringia. Ser. Zool.*, v.90, p.141, 2001.
- THROCKMORTON, L. H. Pathways of evolution in the genus *Drosophila* and the founding of the *repleta* group. In: BARKER, J. S. F.; STARMER, W. T. (Ed.). *Ecological genetics and evolution: the cactus–yeast–Drosophila model system*. New York: Academic Press, 1982. p. 33-48.
- TOTSKII, V. N.; ESERKEPOVA, E. V.; DZHAN, Z. U. Esterase-6 gene-enzyme system and resistance of *Drosophila* to increased temperature. *Genetika*, v.3, p.342-348, 1994.
- VILELA, C. R. A revision of the *D. repleta* species group (Diptera, Drosophilidae). *Rev. Brás. Ent.*, v.27, p.1-114, 1983.
- VIOQUE-FERNÁNDEZ, A.; ALMEIDA, E. A.; LÓPEZ-BAREA, J. Esterases as pesticide biomarkers in crayfish (*Procambarus clarkii*, Crustácea): tissue distribution, sensitivity to model compounds and recovery from inactivation. *ScienceDirect*, v.145, p.404-412, 2007.
- WASSERMAN, M. Cytological evolution in the *Drosophila repleta* species group. In BARKER, J. S. F.; STARMER, W. T. (Ed.). *Ecological genetics and evolution: the cactus–yeast–Drosophila model system*. New York: Academic Press, 1982. p. 49–64.
- WASSERMAN, M. Cytological evolution of the *Drosophila repleta* species group. In: KRIMBAS, C. B.; POWELL, J. R (Ed.). *Drosophila inversion polymorphism*. Boca Raton: Boca Raton, 1972. p.455-552.

WHEELLOCK, C. E.; SHAN, G.; OTTEA, J. Overview of carboxylesterases and their role in the metabolism of insecticides, *J. Pestic. Sci.*, v.30(2), p.75-83, 2005.

ZOUROS, E. Genic differentiation associated with the early stages of speciation in the *mulleri* subgroup of *Drosophila*. *Evolution*, v.27, p.601, 1973.

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.

Autorizo a reprodução xerográfica para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, 13/02/2008

Assinatura