

RAFAEL MARQUES PAULINO

**Caracterização molecular e bioquímica de uma esterase
macho-específica em *Zaprionus indianus***

Paulino, Rafael Marques

Caracterização molecular e bioquímica uma esterase macho - específica em *Zaprionus indianus* / Rafael Marques Paulino. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2008.

95 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Carlos Roberto Ceron

Co-orientadora: Claudia Marcia Aparecida Carareto

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

1. Drosophila - Genética. 2. Esterases. 3. *Drosophila melanogaster*. 4. *Zaprionus indianus*. I. Ceron, Carlos Roberto. II. Carareto, Claudia Marcia Aparecida. III. Paulino, Rafael Marques. IV Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. V. Título.

CDU - 575

RAFAEL MARQUES PAULINO

Caracterização molecular e bioquímica de uma esterase

macho-específica em *Zaprionus indianus*

Dissertação apresentada para a obtenção do título de Mestre em 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 Adjunto
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Prof^a. Dr^a. Maura Helena Manfrin
Professor Doutor
USP – Ribeirão Preto

Prof^a. Dr^a. Hermione Elly Melara de Campos
Bicudo
Professor Emérito
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto, 21 de fevereiro de 2008

O presente trabalho foi realizado nos laboratórios de Genética Bioquímica, Evolução Molecular de Insetos 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 da Profa. Dra. Claudia Marcia Aparecida Carareto, com o auxílio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

AGRADECIMENTOS

Algumas pessoas foram fundamentais para a realização deste trabalho e quero registrar aqui a minha gratidão:

Prof Dr. Carlos Roberto Ceron, pelas idéias, orientação e amizade desde o meu estágio básico

Minha co-orientadora, Profa. Dra. Claudia Marcia Aparecida Carareto, pela atenção e pelo exemplo de pesquisadora.

Msc. Nathália Setta, que sempre me acompanhou nos experimentos moleculares.

Prof. Dra. Paula Rahal, responsável pelo seqüenciamento.

Dr. Mário T. Murakami, responsável por toda modelagem molecular.

Meus amigos.

Meus colegas de laboratório (Genética Bioquímica e Evolução Molecular de Insetos), de república (antigos e atuais) e de pós-graduação.

Capes, pelo auxílio financeiro.

Minha família, que dispensa qualquer tipo de comentários.

Deus,

Obrigado

“O ser humano é parte de um todo, conhecido como O Universo. Por ser parte, ele é limitado no tempo e no espaço. Suas sensações e seus pensamentos são percebidos como separados do resto – um tipo de ilusão de ótica de sua consciência. Essa ilusão é como uma prisão para nós, nos restringindo aos nossos desejos imediatos e ao amor por aqueles mais próximos. Nosso objetivo deve ser nos libertarmos dessa prisão, aumentando os nossos círculos de compaixão até englobar todos os seres vivos e a Natureza em toda sua beleza”

Albert Einstein

Dedico
aos meus pais e aos meus amigos.

SUMÁRIO

I. Introdução	1
I.1 Características da espécie	1
I.2 Sobre as esterases	3
I.3 Modelagem molecular	7
II. Objetivos	9
III. Material e Métodos	10
III.1 Espécies e Amostras	10
III.2 Detecção das esterases	10
III.3 Extração do DNA genômico	11
III.4 Reação de Amplificação	12
III.5 Sequenciamento	13
III.5.1 Secagem do DNA após a amplificação	13
III.5.2 Reação de Big Dye para sequenciamento direto	14
III.5.3 Precipitação	14
III.6 Análises das seqüências	14
III.7 Modelagem molecular	15
III.7.1 Identificação e seleção da proteína molde	15
III.7.2 Modelagem molecular e qualidade da análise	15
III.7.3 Diagrama de Ramachandran	16
IV. Resultados	18
IV.1 Análises bioquímicas	18
IV.2 Análises moleculares	25
IV.3 Modelagem molecular	38
V. Discussão	44
V.1 Caracterização bioquímica	44
V.2 Caracterização molecular	47
V.3 Modelagem molecular	51
VI. Conclusão	53
VII. Referências Bibliográficas	54
VIII. Resumo	70
IX. Abstract	71
Apêndice A	72
Apêndice B	76
Apêndice C	77

I. Introdução

I.1 Características da espécie

O gênero *Zaprionus* pertence à família Drosophilidae e supostamente é nativo do continente africano (ARARIPE et al. 2004). Atualmente, 52 espécies estão descritas (CHASSAGNARD & TSACAS, 1993) e distribuem-se também nas regiões Australiana, Oriental e Paleártica (TSACAS et al. 1981). Grande interesse tem sido demonstrado no estudo da espécie *Zaprionus indianus*, principalmente pela recente expansão da sua área de distribuição com a invasão do continente sul-americano, sendo considerada hoje como uma espécie semi-cosmopolita. A **Figura 1** ilustra um mapa com a distribuição dessa espécie pelo mundo. O primeiro registro de sua ocorrência no Brasil data de 20 de março de 1999 (VILELLA, 1999). Nos anos seguintes, *Z. indianus* expandiu sua distribuição com sucesso, sendo encontrada hoje numa amplitude latitudinal de 35°, do Uruguai a Belém (Brasil). A ausência desta espécie em regiões de altas latitudes pode estar relacionada à falta de produção de óvulos e espermatozóides. ARARIPE et al. (2004) demonstraram que a viabilidade dos gametas masculinos de *Z. indianus* é dependente da temperatura, de forma que temperaturas ambientais muito baixas produzem esterilidade em machos e que se o desenvolvimento ocorrer em ambientes com temperaturas de 15°C, todos indivíduos serão estéreis. Apesar de estar restrita aos climas tropical e subtropical quente (KARAN et al. 1999; TIDON et al. 2003), *Z. indianus* mostra características ecológicas generalistas e é capaz de adaptar-se a diferentes condições ambientais (PARKASH & YADAV, 1993). Tal versatilidade ecológica pode ter sido a razão do sucesso da dispersão da espécie.

VILELLA et al. (2000) sugeriram duas hipóteses não excludentes para a introdução de *Z. indianus* no Brasil. O transporte de frutos de locais onde a espécie é nativa (África e Ásia) para o estado de São Paulo é a hipótese mais provável; outra hipótese, menos provável, seria que alguns espécimes tivessem escapado de estoques de drosofilídeos do *Drosophila* Resource Center, Texas, Estados Unidos .

Apesar de não ser considerada uma praga em seu local de origem, a bioinvasão deste drosofilídeo no Brasil trouxe prejuízos à agricultura, onde *Z. indianus* foi classificada como praga e responsável pela perda de 40% da safra de figo, em 1999, na principal região produtora do estado de São Paulo (TIDON et al. 2003). A oviposição e o desenvolvimento de suas larvas nos frutos tornam-nos inadequados ao consumo humano (STEIN et al. 2000). Embora tenha outros frutos hospedeiros, como cítricos, goiaba, acerola e caqui (SOUZA FILHO et al. 2000), *Z. indianus* não se tornou praga nessas culturas. O processo de bioinvasões pode

produzir outras consequências ecológicas, como erosão da biodiversidade, mudança biótica e abiótica do ecossistema invadido (LODGE, 1993) e riscos à saúde pública (RUIZ et al. 2000).

Anatomicamente, *Z. indianus* tem aproximadamente 3,0 mm de comprimento, cor castanha com faixas longitudinais brancas intercaladas com faixas pretas no dorso da cabeça e tórax, além de olhos vermelhos. A mosca-do-figo, como foi denominada no Brasil, alimenta-se principalmente de bactérias e leveduras que participam da fermentação de substratos ricos em carboidratos, especialmente frutos em decomposição.

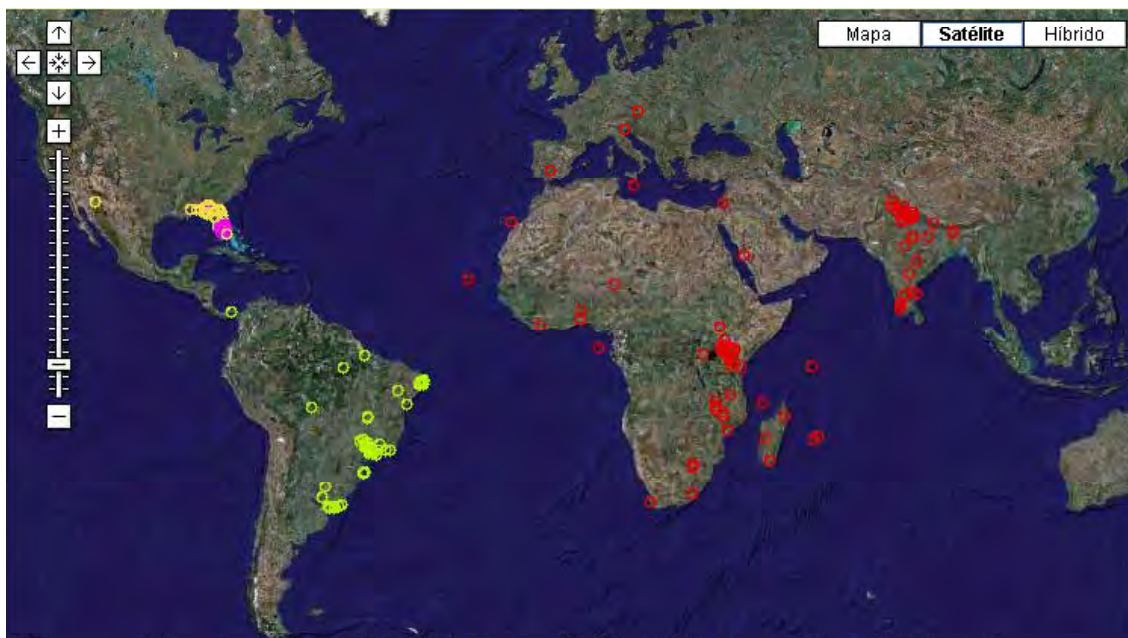


Figura 1. Mapa com a distribuição de *Z. indianus* pelo mundo. Círculos verdes representam a distribuição pela América do Sul (primeiro registro data de 1999), círculos amarelos e rosas nos Estados Unidos (data de registro em 2006 e 2005, respectivamente) e círculos vermelhos na África, Ásia e Europa.

Fonte do mapa: Google maps, extraído do banco de dados de Taxonomy of Drosophilidae.

I.2 Sobre as esterases

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 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 freqüentemente apresentam especificidade celular ou 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 esterases formam um grupo multifuncional e heterogêneo de isoenzimas com característica comum a hidrólise de ésteres e outros compostos, como peptídios, amidas e haletos. Um sítio catalítico composto por uma tríade de resíduos de aminoácidos (Ser-His-Glu/Asp) é o responsável pela hidrólise de ésteres endógenos e exógenos (BENCHARIT et al. 2003). Um quarto resíduo (Ser) pode estar associado à tríade e com potencial catalítico dentro do sítio ativo (STOCK et al. 2004).

As esterases têm sido estudadas em bactérias (SHIMADA et al. 1993), fungos (NISCHIKAWA & LIZUKA, 1993), plantas (CHO et al. 1994; CARVALHO et al. 2003; TEIXEIRA et al. 2004; SOUZA et al. 2005) e animais (CHAKRABORTI et al. 1993; LIMA-CATELANI, et al. 2004; GLYNN et al. 2005) e várias de suas seqüências de aminoácidos e nucleotídeos foram estabelecidas e localizadas cromossomicamente (ROBIN et al. 2000; BALARIKEV, 2003; GOMES & HASSON, 2003). Por apresentarem uma enorme diferenciação em seus padrões enzimáticos, as esterases têm sido amplamente utilizadas para estudos evolutivos e taxonômicos.

Nos insetos, o papel das esterases ainda permanece não totalmente esclarecido, embora muitos estudos indiquem o envolvimento de enzimas deste grupo na regulação dos

níveis do hormônio juvenil (KORT & GRANGER, 1981; ZERA & HOLTMEIER, 1992; GU & ZERA, 1994; NASCIMENTO & BICUDO, 2002; KETHIDI et al., 2005), processos digestórios (KAPIN & AHMAD, 1980; SREERAMA E VEERAHADRAPP, 1991; KERLIN & HUGUES, 1992; ARGENTINE & JAMES, 1995) e reprodutivos (RICHMOND & SENIOR, 1991; MIKHAILOV & TORRADO, 2000).

Uma função importante das carboxilesterases nos insetos está relacionada à capacidade de metabolizar vários compostos agroquímicos, incluindo piretróides, organofosforados e carbamatos. (GUPTA et al. 2005; WHEELLOCK et al. 2005). Uma superprodução de carboxilesterases (como consequência de uma amplificação gênica) pode “seqüestrar” as moléculas de organofosforados, hidrolisando-as antes que estas atinjam o sistema nervoso central. A seleção de variantes enzimáticas com maior eficiência na hidrólise de organofosforados é outra forma de resistência biológica a inseticidas (WHEELLOCK et al. 2005).

A classificação mais amplamente aceita para as esterases é baseada na sua sensibilidade a três grupos de inibidores da atividade enzimática (OAKESHOTT et al. 1993), incluindo os reagentes sulfidrílicos (como exemplo o para-cloromercuriobenzoato – pCMB), os organofosforados (exemplo: malathion) e carbamatos (como exemplo o sulfato de eserina). Com base neste critério, quatro classes de esterases são diferenciadas: (i) acetilesterases, que não são afetadas pelos inibidores e geralmente têm maior afinidade por substratos alifáticos, envolvendo derivados do ácido acético; (ii) arilesterase, que são inibidas somente por reagentes sulfidrílicos e atuam principalmente sobre substratos aromáticos; (iii) carboxilesterases, que são inibidas somente por organofosforados e sua maior afinidade é por ésteres alifáticos, geralmente ácidos de cadeias longas; (iv) colinesterases, que são inibidas por organofosforados e carbamatos e atuam preferencialmente sobre substratos como ésteres de colina a outros ésteres alifáticos e aromáticos, podendo ser separadas em acetilcolinesterases e pseudocolinesterases.

Em *Z. indianus*, PARKASH & YADAV (1993) encontraram, em géis de amido, um alto grau de polimorfismo para as esterases em populações isoladas de várias regiões da Índia. Esses autores postularam a existência de pelo menos sete locos que codificam essas diferentes esterases. Em estudos do nosso laboratório com populações de *Z. indianus* recentemente isoladas em áreas suburbanas de São José do Rio Preto, foram identificadas seis regiões com atividade esterásica em géis de poliacrilamida, as quais foram denominadas EST-1, EST-2, EST-3, EST-4, EST-5 e EST-6. Dentre estas enzimas, polimorfismos foram

detectados apenas para EST-2 e EST-3 (GALEGO et al. 2006). Além disso, EST-2 e EST-5 apresentaram atividade acentuada nos machos e parecem relacionadas com a maturidade sexual desses indivíduos. (PAULINO & CERON, 2005; GALEGO et al., 2006). Segundo estes mesmos autores, o peso molecular dessas enzimas monoméricas foi de 126KDa para a EST-5, enquanto a EST-2, exclusiva de machos, foi de cerca de 42KDa.

Esterases macho-específicas pertencentes ao cluster β são freqüentes no gênero *Drosophila*, sendo encontradas em *D. duni* (CARRASCO et al. 1984), *D. virilis* (KOROCHKIN et al. 1990; SERGEEV et al. 1995), *D. arizonae* e *D. mulleri* (CERON, 1988) e espécies do cluster *buzzatti* (LAPENTA et al. 1998).

Dentre as esterases com possíveis funções relacionadas à reprodução em insetos, em *Drosophila melanogaster* foi encontrada uma esterase designada esterase-6 (EST-6), com expressão majoritariamente no ducto ejaculatório anterior dos machos adultos e que é transferida às fêmeas no fluido seminal durante a cópula. Esta enzima desempenha funções reprodutivas nestes organismos, especificamente alterando o comportamento reprodutivo da fêmea, estimulando a oviposição e inibindo a receptividade à outros machos (SHEEHAN et al. 1979; RICHMOND et al. 1991). Em machos, o nível e a quantidade de EST-6 afeta vários componentes do valor adaptativo, como a viabilidade do indivíduo pré-adulto, tempo de desenvolvimento, tempo de cópula, freqüência de recópula, produção de ovos e fertilidade (GAME & OAKESHOTT, 1990).

A seqüência completa da região codificadora do gene da EST-6 em *D. melanogaster* já foi determinada (COOK & OAKESHOTT, 1989; BALAKIREV et al. 2002). Sua estrutura revelou uma região codificadora de 1686bp, consistindo de 2 exons de respectivamente 1387bp (exon 1) e 248bp (exon 2), intercalados por 1 intron com 51bp. O exon 1 apresenta-se altamente conservado na espécie, sendo comum a várias linhagens de *D. melanogaster* (BALAKIREV et al. 2002). O gene está duplicado, mas há evidências de que a cópia “in tandem”, referida como *Est-P* por COLLET et al. (1990), seja um pseudogene (ψ *Est-6*, BALAKIREV & AYALA, 1996). Os genes *Est-6* e ψ *Est-6* possuem uma estrutura exon-intron muito similar, estão proximamente ligados e localizados no braço esquerdo do cromossomo 3 no mapa citogenético de *D. melanogaster*.

Vários estudos correlacionam a EST-6 com diferentes β -esterases em outras espécies de *Drosophila*, sugerindo uma provável homologia entre a EST-6 e estas esterases. 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, expressa-se primariamente em machos adultos de *D. melanogaster* e sua atividade é encontrada principalmente em ductos ejaculatórios. A hipótese aventada por BRADY et al. (1990) é a de que uma esterase presente no ancestral comum destas espécies apresentava um padrão de expressão “generalista”. Após a divergência das espécies, mutações regulatórias e/ou pressões seletivas devem ter ocorrido resultando em variantes dos produtos desses genes. EST-5 passou a atuar mais nos olhos; em contrapartida, mutações similares no gene da EST-6 possibilitaram sua maior expressão nos ductos ejaculatórios.

Em *Drosophila virilis* também ocorre uma esterase macho-específica, a esterase-S, encontrada no epitélio dos bulbos ejaculatórios dos machos adultos, sendo transferida às fêmeas durante a cópula (SERGEEV et al. 1995). A estrutura exon-intron dos genes *Est-S* e *Est-6* é muito similar. A comparação entre as seqüências deduzidas de aminoácidos das duas enzimas mostrou uma homologia de 50%. Os mesmos autores conseguiram, por manipulação genética de embriões, a transferência da região reguladora e parte do gene *Est-S* para *D. melanogaster*. A EST-S expressou-se na mosca transgênica no mesmo estágio de vida e com a mesma especificidade tecidual encontrada em *D. virilis*.

Como descrito acima, várias esterases encontradas em espécies do gênero *Drosophila* compartilham propriedades funcionais e padrões de expressão similares. Em nosso projeto de iniciação científica (PAULINO & CERON, 2005) foram comparadas as esterases macho-específicas de *Z. indianus* e de *D. melanogaster*. Estas enzimas mostraram várias características em comum, como por exemplo, (1) sua detecção principalmente nos tecidos reprodutivos dos machos, (2) o aumento de sua atividade com a idade desses indivíduos, (3) especificidade pelo substrato beta-naftil acetato, produzindo bandas coradas em vermelho em géis de poliacrilamida, e (4) padrões de inibição semelhantes quando os géis foram submetidos aos testes com inibidores de esterases (malathion, perfection, PMSF e cloreto de mercúrio). Além disso, obtivemos sucesso na amplificação de um fragmento de aproximadamente 1,6Kb pela técnica de PCR, utilizando-se DNA genômico de *Z. indianus* e

oligonucleotídeos iniciadores específicos que se hibridizam com a sequência do gene *Est-6* de *D. melanogaster*. Estes resultados sugerem ortologia entre os genes codificadores destas duas enzimas. Embora os resultados obtidos sejam concordantes com resultados previamente descritos, análises subseqüentes foram conduzidas com o intuito de determinarmos se a seqüência amplificada em *Z. indianus* refere-se, assim como em *D. melanogaster*, a uma esterase macho-específica relacionada com o processo reprodutivo. Dessa forma, seriam reforçadas as hipóteses evolutivas de parentesco entre estes drosofilídeos, onde *Z. indianus* é incluído no gênero *Drosophila* (TATARENKOV, (1999) e TARRÍO et al. (2001)

I.3 Modelagem molecular

Apesar das consideráveis inovações técnicas, sobretudo nas áreas de cristalografia por raios X e ressonância magnética nuclear (RMN), muitos problemas básicos ainda persistem na determinação de estruturas tridimensionais (estruturas terciárias e quaternárias) de proteínas (NORVELL et al. 2000; TERWILLIGER, 2000; YOKOYAMA, 2000; HEINEMANN, 2000). A obtenção de amostras em quantidade suficiente para os ensaios necessários é difícil em muitos casos e os cristais obtidos nem sempre têm qualidade necessária para as experiências (MAGGIO & RAMNARAYAN, 2001). Por outro lado, a elucidação das seqüências de aminoácidos (estruturas primárias) é uma tarefa relativamente mais simples. Por isso, há uma grande diferença entre o número de estruturas primárias e tridimensionais disponíveis. Em *D. melanogaster*, apenas a acetilcolinesterase (AChE) possui sua seqüência tridimensional completamente resolvida.

Entre todas as aproximações teóricas atuais, a modelagem molecular comparativa de estruturas de proteína (*comparative protein modeling*) (BLUNDELL et al. 1987; MARTI-RENOM et al. 2000), também conhecida como modelagem por homologia, é o único método computacional que tem o potencial de construir um modelo tridimensional para uma proteína de estrutura desconhecida (alvo) baseada em uma ou mais proteínas relacionadas de estruturas conhecidas (moldes), com precisão e confiança comparáveis a estruturas experimentais de baixa resolução a partir da seqüência de aminoácidos. Esta abordagem está fundamentada em alguns padrões gerais que foram observados no processo de evolução biológica: (i) homologia entre seqüências de aminoácidos implica em semelhança estrutural e funcional; (ii) proteínas homólogas apresentam regiões internas conservadas (constituídas principalmente de elementos de estrutura secundária: α hélices e fitas- β);(iii) as principais

diferenças estruturais entre proteínas homologas ocorrem nas regiões externas, constituídas principalmente por alças (*loops*) (SANTOS FILHO et al. 2001).

Outro fato importante é que as proteínas se unem em um número limitado de famílias tridimensionais. Existem cerca de 40.000 famílias protéicas (ROBERT, 2005). Conseqüentemente, quando se conhece a estrutura de pelo menos um representante de uma família, é geralmente possível modelar, por homologia, os demais membros da família (SANTOS FILHO et al. 2001). O presente trabalho apresenta a modelagem comparativa, ou por homologia, do gene seqüenciado de *Z. indianus*, utilizando como molde uma lipase do fígado de *Homo sapiens*.

II. Objetivos

O objetivo deste trabalho foi a caracterização das esterases macho-específicas (EST-2 e EST-5) em *Z. indianus* e a sua comparação com a também macho-específica EST-6 de *D. melanogaster*, por meio de:

- análises bioquímicas por meio de eletroforeses em géis de poliacrilamida, ilustrando o padrão da atividade esterásica em diferentes idades, tecidos e estágios de vida em *Z. indianus* e *D. melanogaster*;
- análises moleculares por meio do seqüenciamento do fragmento amplificado em *Z. indianus* com iniciadores da *Est-6* de *D. melanogaster*;
- modelagem molecular da possível esterase seqüenciada de *Z. indianus* com base na similaridade com a lipase do fígado humana.

III. Material e Métodos

III. 1 Espécies e Amostras

Neste estudo foi utilizada uma linhagem de laboratório de *Z. indianus* iniciada a partir de moscas coletadas em São José do Rio Preto. Para *D. melanogaster* foi utilizada a linhagem IN(1)AB, cedida pela Profa. Dra. Margaret G. Kidwell da Universidade do Arizona em Tucson, EUA. Ambas as linhagens foram mantidas em garrafas de vidro de 250 ml em meio de banana-ágar, acondicionadas em estufas a 25°C do Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE), da Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus de São José do Rio Preto, SP. Os repiques foram feitos a cada 30 dias.

III. 2 Detecção das esterases

As esterases de ambas as espécies foram analisadas por meio de eletroforese de extratos dos organismos inteiros ou de seus tecidos. Os indivíduos foram macerados individualmente em microtubos de 1,5ml contendo 15µl de Tampão de Amostra (Tris-HCl 0,1M, pH 8,8) e centrifugados a 10.000RPM por 3 minutos. De cada uma das amostras foi utilizado 10µl de sobrenadante, que foi aplicado em gel de poliacrilamida a 10% de concentração, com porcentagem de ligações cruzadas igual a 5%, em Tampão Tris-HCl 0,2M e pH 8,8. Como tampão de corrida foi utilizado o Tampão Tris-Glicina 0,1M pH 8,3, sendo que a eletroforese vertical foi conduzida durante 5 horas e 30 minutos em voltagem constante de 180V.

Após a eletroforese, o gel foi pré-incubado por 60 minutos em Tampão Fosfato 0,1M, pH 6,2 e em seguida corado, evidenciando-se assim as bandas com atividade esterásica. Como substratos foram utilizados 40mg de α -naftil acetato e 40mg de β -naftil acetato previamente diluídos em 1,0ml de acetona. Como corante foram utilizados 120mg de Fast Blue RR Salt. Estes compostos foram adicionados a 100ml de Tampão Fosfato 0,1 M pH 6,2 contendo 10ml de n-propanol. O tempo de coloração foi de aproximadamente 60 minutos. Após esse período, os géis foram colocados em uma solução descorante (álcool comercial/ácido acético/ água 3:1:3) por no mínimo 24 horas e posteriormente secados, de acordo com o método de CERON et al. (1992).

Para a análise da expressão das esterases em função da idade, machos virgens foram coletados e mantidos isolados em tubos contendo meio de banana-ágar até atingirem 1,

5, 10, 15, 20 ou 30 dias de idade. Extratos brutos desses indivíduos foram utilizados para eletroforese em gel de poliacrilamida e coloração de esterases como descrito acima.

O teste realizado com indivíduos em diferentes estágios de vida incluiu larvas, pupas e adultos. Larvas de 3º estágio tardio foram coletadas entre aquelas que já tinham abandonado o meio de cultura e se movimentavam pela parede das garrafas. As pupas foram coletadas no meio de cultura e paredes das garrafas. Após a coleta, larvas, pupas e adultos foram submetidas a análises eletroforéticas.

A identificação da atividade esterásica tecido-específica comparou o padrão de esterases produzido por indivíduos inteiros, pela cabeça e pela região contendo o aparelho reprodutor de machos. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida e posterior detecção das esterases, comparando-se cada um dos padrões de bandas obtidos.

III. 3 Extração do DNA genômico

O DNA genômico de *Z. indianus* e *D. melanogaster* foi isolado de acordo com o protocolo descrito por DANIELS & STRAUSBAUGH (1986), com algumas modificações. Aproximadamente 50 indivíduos de cada espécie e de ambos os sexos foram macerados em microtubos em 700µl de Tampão de Extração com uréia (uréia 3,33M; NaCl 0,07M; Tris 0,05M; EDTA 0,02M; N-lauril 0,017M, pH 8,0). A seguir, os microtubos foram incubados a 56°C durante 1 hora, sendo então adicionados 700µl de fenol. Após 10 minutos de agitação cuidadosa, os microtubos foram centrifugados durante 10 minutos, a 12.000RPM, a 15°C, e o sobrenadante foi retirado e transferido para um tubo novo.

O procedimento de centrifugação acima foi repetido duas vezes, adicionando-se na primeira repetição um volume igual ao do sobrenadante de solução (1:1) de fenol clorofórmio/álcool isoamílico (2%). Após a última centrifugação, os sobrenadantes foram transferidos para tubos novos adicionando-se dois volumes de álcool etílico (PA) gelado e 1/5 do volume de acetato de sódio (3M, pH 5,2), agitando-se levemente. Para favorecer a precipitação do DNA, os microtubos foram mantidos a -20°C *overnight*.

Após a precipitação, os microtubos foram centrifugados durante 5 minutos, a 12.000RPM, 15°C, e os precipitados foram desidratados com um banho de álcool etílico 70% durante 10 minutos e secos em estufa por 30 minutos, a 37°C. A seguir, foram adicionados a cada tubo 50µl de água ultrapura autoclavada e esses foram mantidos durante 30 minutos em

banho-maria, 37°C, para que ocorresse a completa eluição do DNA. A solução obtida foi tratada com 0,01mg de RNase H durante 1 hora, 37°C. O DNA extraído foi quantificado por espectrofotometria e posteriormente evidenciado em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo.

III.4 Reação de Amplificação

Os oligonucleotídeos iniciadores usados nas reações de PCR foram desenhados pelo programa Primer 3 (ROZEN & SKALETSKY 2000) com base no gene *Est-6* de *D. melanogaster* (COLLET et al. 1990), que foi dividido em três partes para facilitar o seqüenciamento posterior (**Figura 2**). Conseqüentemente, foram desenhados 3 pares de iniciadores (*forward* e *reverse*), que se alinham com o DNA genômico extraído de *Z. indianus* e *D. melanogaster* (controle positivo). A **Tabela 1** apresenta a seqüência dos iniciadores utilizados.

Tabela 1. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados, sua seqüência e o tamanho do fragmento amplificado.

Primer	Seqüência	Tamanho do fragmento
1F	ACTGGGACTTATCATTGTGC	1138bp
1R	CATATCCTTTTTGGTCTTCG	
2F	ACTGGGACTTATCATTGTGC	400bp
2R	GCGATAGCTTATCTTCACCA	
3F	TTTGCTCCATTTAGTCCTGT	700bp
3R	TGGCAGCCATCAATATAAA	

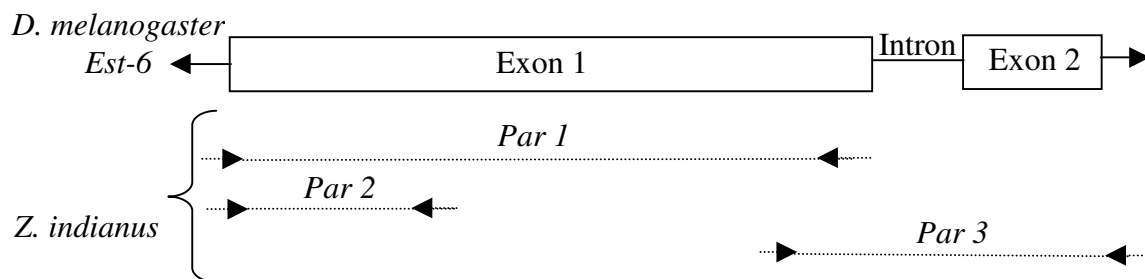


Figura 2. Representação esquemática do gene *Est-6* de *D. melanogaster*, composto por 2 exons e 1 intron. As setas correspondem aos iniciadores descritos na **Tabela 1** e as linhas tracejadas às seqüências amplificadas pela reação de PCR no DNA genômico de *Z. indianus*.

As reações de PCR foram realizadas sob as seguintes condições: 5,0µl de PCR Buffer (10x); 1,0µl de dNTPs (10mM); 2,0µl de MgCl₂ (50mM); 1,0µl iniciador *forward* (10mM); 1,0µl de iniciador *reverse* (10mM); 0,15µl Taq DNA Polimerase Platinum(Invitrogen), 1,0µl de DNA genômico (100ng), 14,35µl de água autoclavada. Os ciclos utilizados foram: desnaturação a 95°C por 5 minutos seguidos de 40 ciclos de 95°C por 1 minuto (fusão), 45°C por 1 minuto (hibridização), 72°C por 1 minuto (polimerização) e finalmente extensão final a 72°C por 10 minutos. Os amplificados foram corados com brometo de etídeo e separados a 90V por 30 minutos em gel de agarose 1%.

III. 5 Sequenciamento

O sequenciamento direto dos fragmentos amplificados em *Z. indianus* foi realizado no Laboratório de Estudos Genômicos do Departamento de Biologia deste Instituto. As análises foram realizadas através do sequenciador automático ABI Prism 377.

III.5.1 Secagem do DNA após amplificação

A partir de 100µl da reação de PCR, foram adicionados 200µl de isopropanol e 20µl de acetato de amônio 4M. A seguir, os microtubos foram centrifugados por 30 minutos a 13.000RPM e o sobrenadante descartado. Mais 500µl de etanol 70% foram adicionados e os microtubos foram novamente centrifugados por 5 minutos a 13.000RPM. O sobrenadante foi descartado; os microtubos foram secos por 30 minutos a 37°C e diluídos em 10µl de água.

III.5.2 Reação de Big Dye para sequenciamento direto

As reações seguiram as seguintes condições: 4,0µl de Big Dye Terminator, 6,4µl de iniciador (*F* ou *R*), 4,0µl de Sequencing Buffer (5x), 3,0µl de DNA e 2,6µl de água.

Os ciclos de amplificação foram: 96°C por 2 segundos seguidos de 37 ciclos de 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos.

III.5.3 Precipitação

Aos microtubos foram adicionados 40µl de isopropanol 75% e incubados por 20 minutos na geladeira. A seguir, foram centrifugados por 40 minutos a 4.000RPM e 20°C. O sobrenadante foi seco por inversão; mais 200µl de etanol 70% foram adicionados e novamente centrifugados por 10 minutos a 4.000RPM e 20°C. O sobrenadante foi descartado por inversão e foi realizado um rápido *spin* invertido. Os microtubos foram secos a 37°C por 1 hora.

Após a precipitação, o material foi ressuscitado através da adição de 1,4µl de Loading Buffer e ressuscitado 30 vezes. A seguir, foi desnaturado a 95°C por 2 minutos e os microtubos foram colocados imediatamente no gelo.

III.6 Análises das Seqüências

Foram utilizados os dados de COLLET et al. (1990) para a *Est-6* de *D. melanogaster* (acesso GenBank M33780). As seqüências das demais espécies do subgrupo *melanogaster* são de BALAKIREV et al. (2005, acesso GenBank AY695919-AY695924). A seqüência da *Est-6* de *D. yakuba* foi obtida por OAKESHOTT et al. (2001, acesso Genbank AJ279007), e a *Est-5b* de *D. pseudoobscura* por VEUILLE & KING (1995, acesso Genbank X89093).

As seqüências foram manipuladas e alinhadas no programa BioEdit Sequence Alignment Editor (HALL, 1999). A pressão seletiva foi estimada por meio da razão $\omega = d_N/d_S$, onde d_N é a taxa de substituições nucleotídicas não sinônimas por sítio não sinônimo e d_S é a taxa de substituições sinônimas por sítio sinônimo. Mutações deletérias normalmente são eliminadas pela seleção negativa (purificadora), produzindo uma taxa d_S maior que a taxa d_N ($\omega < 1$). A razão $\omega > 1$ normalmente é um indicativo de seleção positiva. Na neutralidade, as taxas sinônimas e não sinônimas esperadas são similares ($\omega \approx 1$). Além das seqüências referentes às esterases, esta estimativa também foi feita para os genes de *Z. indianus* e *D. melanogaster*, respectivamente: *Amyrel* (GenBank EF458322, YASSIN et al. não publicado; AY322194, SEUNG et al. 2003), *Amd* (AY699263, ROBE et al. 2005; NM 057244 HOSKINS et

al. 2007) e *Citocromo Oxidase* subunidade I (EF632368, YASSIN et al. não publicado; EF531192, TORP et al. 2007). O programa utilizado para este estudo foi DnaSP (ROZAS, 2003) que utiliza o método de NEI & GOJOBORI (1986) para estimar o número de substituições nucleotídicas.

O possível modelo evolutivo que atua nas seqüências de esterases também foi investigado segundo o modelo de pressão seletiva variável entre os sítios M8 (YANG et al. 2000) com o auxílio do programa Selecton (STERN et al. 2007). Neste programa, a razão d_N/d_S é estimada a cada resíduo de aminoácido, ao contrario do programa DnaSP (ROZAS, 2003), onde a razão d_N/d_S é estimada para toda uma seqüência. Em essência, um modelo evolucionário descreve em termos probabilísticos quais caracteres (neste caso, códons) diferem ao longo de uma linhagem evolutiva. O principal objetivo de um modelo evolucionário é ser expressivo o suficiente para descrever a realidade biológica, mesmo que tal modelo não se aplique a todas as seqüências analisadas. O modelo M8 é um modelo Bayesiano que permite a detecção de evolução positiva que ocorre na proteína, assumindo uma distribuição estatística para a contagem em diferentes valores de d_N/d_S entre os códons.

III.7 Modelagem molecular

III.7.1 Identificação e seleção da proteína molde

A primeira etapa da modelagem por homologia foi a identificação de uma proteína cuja estrutura tridimensional seja conhecida, que serviu de molde para a determinação da estrutura da proteína alvo. Uma busca baseada na similaridade seqüencial da proteína alvo madura (sem o peptídeo sinal), indicou a presença do domínio esterase-lipase com o maior *score* o alinhamento com *human bile salt activated lipase (BAL)*, acesso *Protein Data Bank*: 1f6w (TERZYAN et al. 2000). Após a escolha da proteína molde, foi feito um alinhamento entre esta e a proteína alvo, que considera características estruturais conservadas, como elementos da estrutura secundária e o centro catalítico. Este alinhamento foi então processado pelo programa MODELLER (SALI & BLUNDELL, 1993) para gerar os modelos tridimensionais da proteína alvo.

III.7.2 Modelagem molecular e qualidade da análise

A modelagem foi realizada utilizando o software MODELLER (SALI & BLUNDELL, 1993), que implementa uma abordagem automatizada para a modelagem por homologia de estruturas tridimensionais de proteínas baseada na satisfação de restrições

espaciais (ASZODI & TAYLOR, 1996; SRINIVASAN & MARCH, 1993). As alças foram otimizadas usando ModLoop (FISER & SALI, 2003). Foram gerados modelos 3D para a sequência alvo contendo todas as sequências principais e cadeias laterais dos átomos sem o hidrogênio. No caso deste trabalho, foram gerados 1000 modelos para cada complexo, e a escolha dos melhores modelos foi baseada na qualidade estereoquímica.

Após a construção do modelo da proteína alvo, é necessário realizar a otimização e a validação deste modelo. As interações desfavoráveis entre átomos não ligados, bem como as energias de ângulos de torção e de ligação são otimizadas por mecânica molecular, que também avalia a qualidade do empacotamento global da proteína, os possíveis erros estruturais em regiões localizadas e os parâmetros estereoquímicos (JOHNSON, 1994). A qualidade do modelo final da proteína alvo foi avaliada através dos programas VERIFY3D (EISENBERG et al., 1997), PROSA (WIEDERSTEIN & SIPPL, 2007) e VADAR (WILLARD et al., 2003), que medem a compatibilidade entre a sequência primária e a estrutura 3D de uma proteína. Para a visualização, análise e comparação das proteínas modeladas foi usado o programa PYMOL (DELANO, 2005).

III.7.3 Diagrama de Ramachandran

A conformação de uma cadeia polipeptídica pode ser simplesmente descrita pelos valores dos ângulos diédricos na estrutura principal da proteína (ângulo descrito pelo nitrogênio e carbono alfa e o ângulo descrito pelo carbono alfa e carbono da carbonila). Estes ângulos são denominados ângulos de torção livre ϕ (phi) e ψ (psi) (GIBAS & JAMBECK, 2001). A ligação peptídica (ângulo ω), por ser uma ligação parcialmente dupla, está quimicamente restrita a ser planar. Sendo assim, os valores de ϕ e ψ para cada resíduo de aminoácido fornecem uma descrição completa da estrutura da cadeia principal da proteína.

O diagrama de Ramachandran (RAMACHANDRAN et al. 1963; RAMAKRISHNAN & RAMACHANDRAN, 1965) indica a distribuição dos ângulos ϕ e ψ dos resíduos pertencentes a uma determinada estrutura. Uma estrutura de boa qualidade deve ter 90% ou mais de seus resíduos nas regiões favoráveis. No diagrama, as áreas em branco correspondem a regiões onde existem os choques estereoquímicos na proteína. Estas regiões não permitidas estericamente são para todos os aminoácidos, exceto a glicina (Gly), que não possui cadeia lateral e pode adotar os ângulos de torção ϕ e ψ em todos os quadrantes do diagrama de Ramachandran. As regiões azuis correspondem à conformação onde não há nenhum choque estereoquímico, ou seja, são as regiões permitidas e onde se encontram as α -hélices e folhas β .

As áreas em azul claro correspondem às regiões adicionalmente permitidas, e generosamente permitidas.

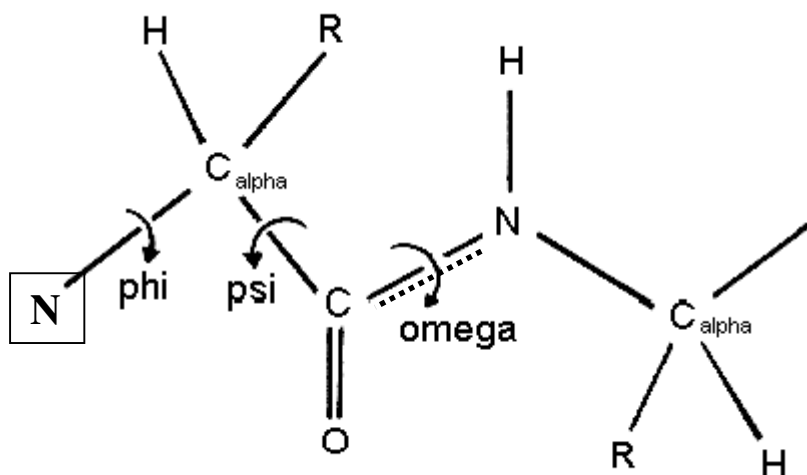


Figura 3. Ilustração dos ângulos de torção em uma cadeia polipeptídica. Os ângulos ϕ e ψ são os únicos com rotação razoavelmente livres.

IV. Resultados

IV.1 Análises Bioquímicas

Bandas esterásicas que apresentam as mesmas características bioquímicas e ocupam uma mesma posição no gel são interpretadas como enzimas produzidas pelo mesmo loco gênico, sendo sua síntese controlada por um ou vários alelos. Assim, cada loco, dependendo da sua disposição no gel, recebe uma denominação específica. A população de *Z. indianus* estudada apresentou seis locos esterásicos diferentes: EST-1, EST -2, EST- 3, EST -4, EST -5 e EST -6, enquanto que em *D. melanogaster* foram identificados sete locos esterásicos: AChE, EST-1, EST-2, EST-3, EST-4, EST-5 e EST-6 (**Figura 4**).

Dois grupos de esterases podem ser distinguidos com base no substrato hidrolisado *in vitro*, o grupo das α esterases e o grupo das β esterases, que hidrolisam preferencialmente substratos como o α naftil e o β naftil acetato, respectivamente. O grupo das α esterases inclui carboxilesterases, colinesterases e acetilcolinesterases. As β esterases são representadas principalmente pelas carboxilesterases. As esterases EST-1, EST-3, EST-4 e EST-6 de *Z. indianus* e as esterases EST-1, EST-2, EST-3, EST-4, EST-5 e AChE de *D. melanogaster* demonstraram maior afinidade pelo α naftil acetato, produzindo bandas pretas no gel de poliacrilamida. As enzimas EST-2 e EST-5 de *Z. indianus* e a EST-6 de *D. melanogaster* mostraram maior afinidade pelo β naftil acetato, o que pode ser notado pela produção de bandas vermelhas no gel. A **Figura 5** apresenta um gel de poliacrilamida a 10% que ilustra o padrão de bandas com atividade esterásica de adultos de ambos os sexos de *Z. indianus* e *D. melanogaster*. Bandas monomórficas foram observadas para todas as esterases de *Z. indianus* e *D. melanogaster*. Entretanto, o estudo de GALEGO et al. (2006) identificou polimorfismos para a EST-2 e EST-3 de *Z. indianus*.

Em *Z. indianus*, duas enzimas apresentaram atividade macho-específica (**Figura 5**): EST-2 e EST-5, sendo que a primeira é exclusiva de machos e a segunda apresentou atividade acentuada nestes. Estas enzimas, assim como a EST-6 de *D. melanogaster*, estão relacionadas à biologia reprodutiva destes animais. Tais enzimas foram encontradas principalmente em tecidos do aparelho reprodutor (**Figura 6A e 6B**) e sua expressão aumenta significativamente em machos virgens após o 3º dia de emergência (**Figura 7A**). A EST-6 de *D. melanogaster* também apresentou expressão significativamente maior em machos a partir do 5º dia de emergência (**Figura 7B**).

A EST-2 e a EST-4 de *Z. indianus* foram observadas somente em adultos (**Figura 8A**), enquanto as demais esterases (EST-3, EST-5 e EST-6) foram observadas nos três estágios de vida estudados (larva, pupa e adulto). Em moscas de *D. melanogaster*, duas

esterases foram detectadas exclusivamente em pupas (não classificas neste trabalho) enquanto a EST-3 e EST-4 estavam presentes em larvas e adultos. Foi observada fraca atividade da EST-6 em larvas e pupas e uma forte atividade da EST-5 foi observada em larvas (**Figura 8B**).

<i>Zaprionus indianus</i>				<i>Drosophila melanogaster</i>			
<u>♂</u>		<u>♀</u>		<u>♂</u>		<u>♀</u>	
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>
EST-6	—	—	—	—	—	—	—
EST-5	—	—	—	—	—	—	—
EST-4	—	—	—	—	—	—	—
EST-3	—	—	—	—	—	—	—
EST-2	—	—	—	—	—	—	—
EST-1	—	—	—	—	—	—	—
				AChE	—	—	—
				EST-6	—	—	—
				EST-5	—	—	—
				EST-4	—	—	—
				EST-3	—	—	—
				EST-2	—	—	—
				EST-1	—	—	—

Figura 4. Zimograma comparativo do padrão de esterases encontrado em indivíduos adultos e de ambos os sexos de *Z. indianus* e *D. melanogaster*. *1,2*: *Z. indianus*, machos *3,4*: *Z. indianus*, fêmeas *5,6*: *D. melanogaster*, machos; *7,8*: *D. melanogaster*, fêmeas.

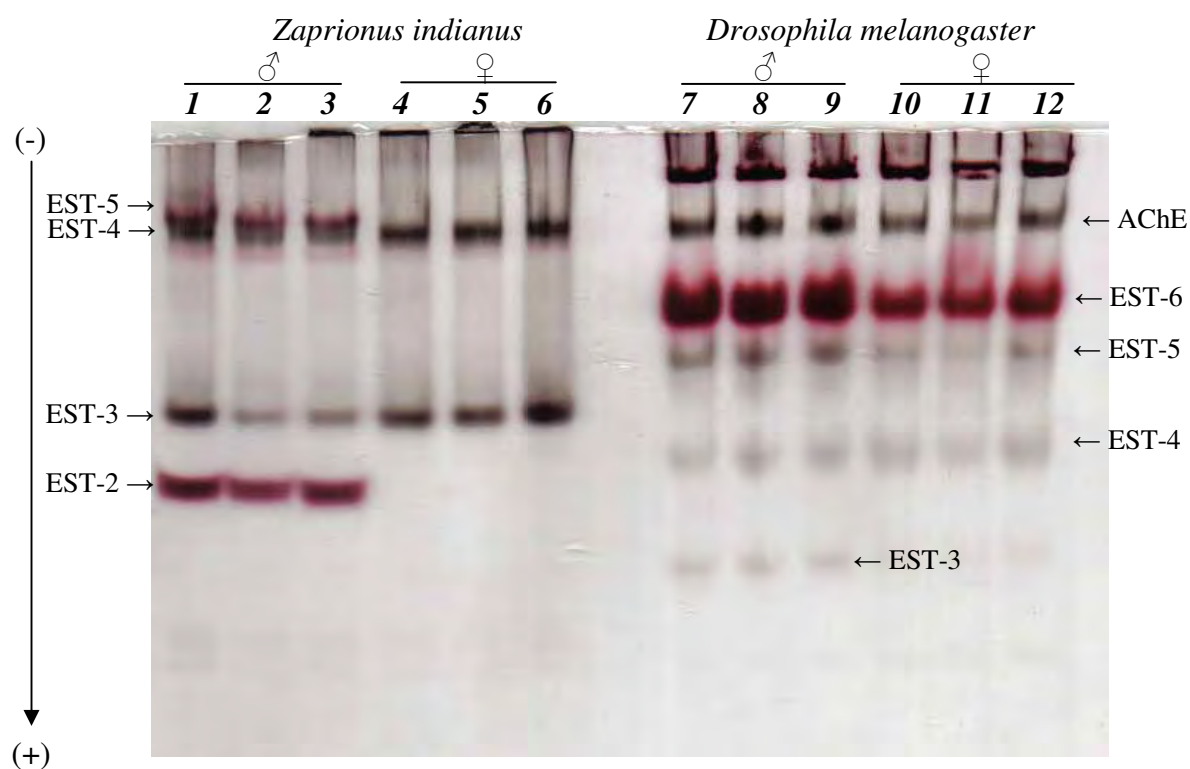


Figura 5. Padrão de esterases em moscas adultas de ambos os sexos em *Z. indianus* e *D. melanogaster* em géis de poliacrilamida 10%. A EST-1 e a EST-6 de *Z. indianus* e a EST-1 e EST-2 de *D. melanogaster* não foram observadas neste gel.

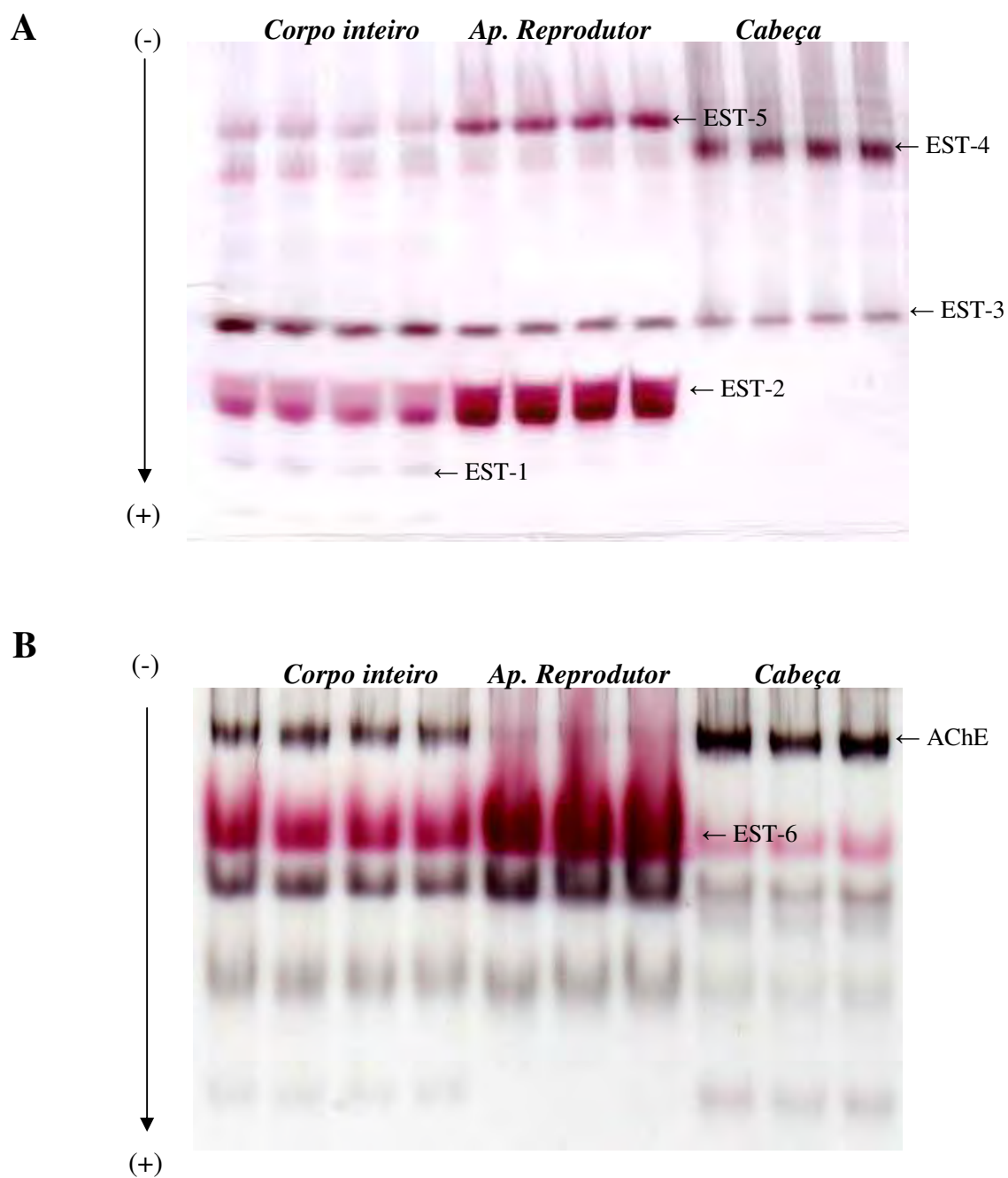


Figura 6. Expressão esterásica tecido-específica de *Z. indianus* (A) e *D. melanogaster* (B) em gel de poliacrilamida a 10%. Indivíduos inteiros (*Corpo inteiro*), região do aparelho reprodutor (*Ap. reprodutor*) e cabeças de machos adultos, para as figuras A e figura B.

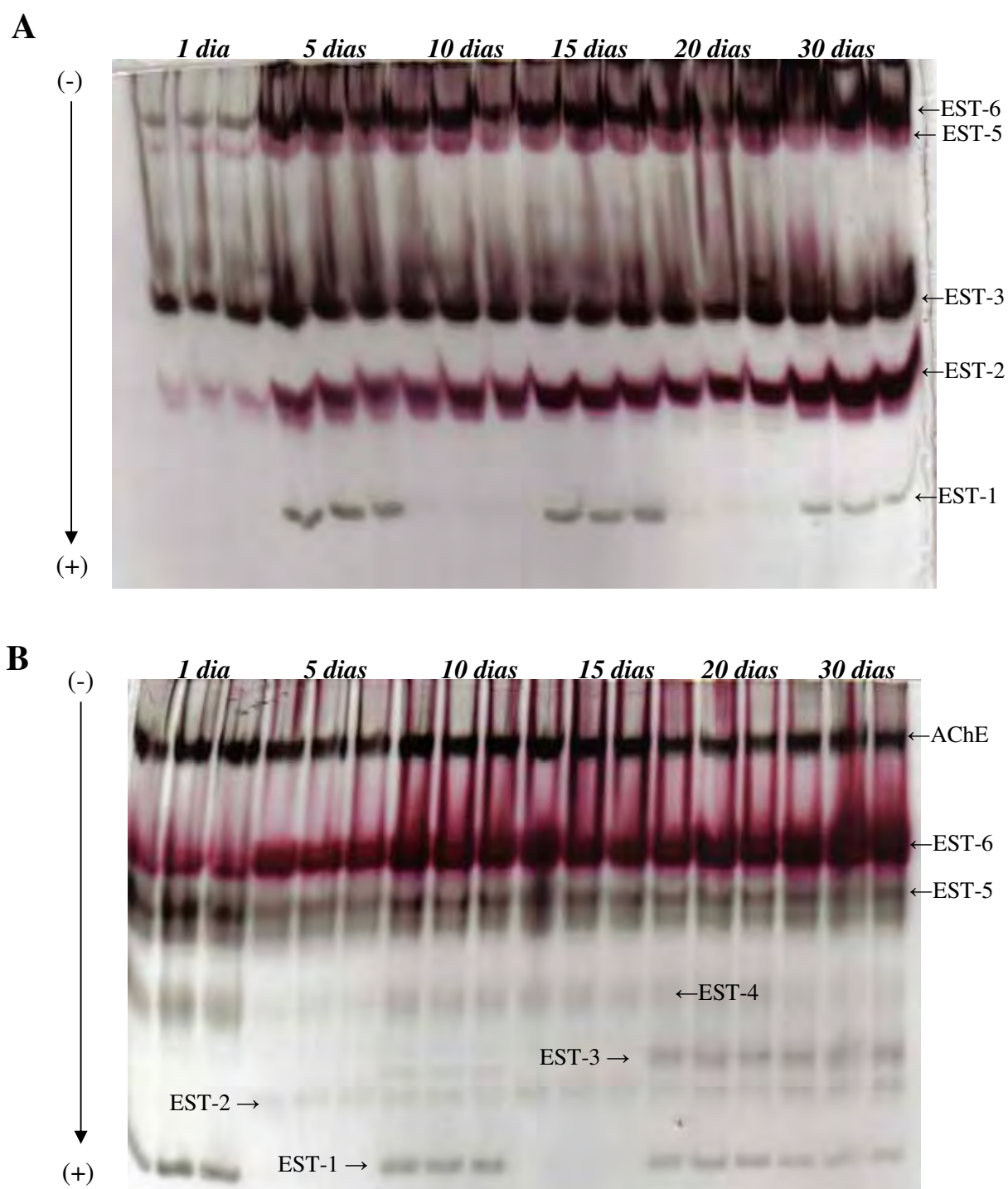


Figura 7. Expressão esterásica idade-específica em machos adultos virgens de *Z. indianus* (A) e *D. melanogaster* (B) em gel de poliácridamida a 10%. Os indivíduos foram envelhecidos até a idade de 1 dia (1, 2, 3), 5 dias (4, 5, 6), 10 dias (7, 8, 9), 15 dias (10, 11, 12), 20 dias (13, 14, 15) e 30 dias (16, 17, 18). Não foi possível identificar em A a EST-4 de *Z. indianus*.

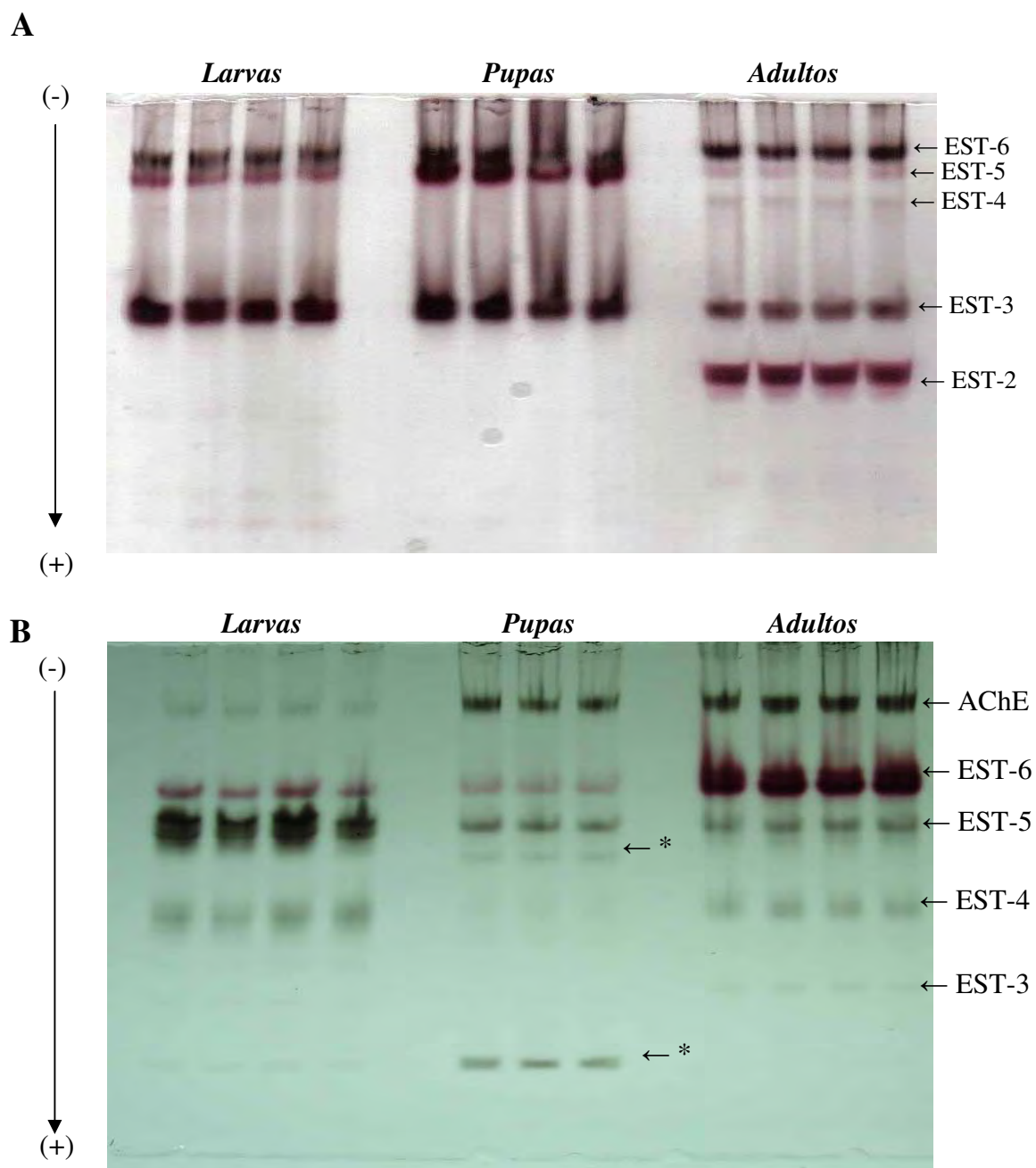


Figura 8. Padrão de esterases em diferentes estágios de vida em *Z. indianus* (A) e *D. melanogaster* (B). Como amostras foram utilizadas larvas de 3º estágio, pupas e machos adultos. Os asteriscos (*) indicam as esterases observadas somente em pupas e que não foram classificadas neste trabalho. Gel de poliacrilamida 10%.

IV. 2 Análises moleculares

Os fragmentos produzidos na reação de PCR foram submetidos ao sequenciamento direto. A sequência obtida em *Z. indianus* foi de 1681 bases, sendo que o conteúdo GC foi de 47,9%, o conteúdo AT igual a 51,9% e 0,12% de bases não identificadas (N). O gene *Est-6* de *D. melanogaster* apresenta composição semelhante ao citado acima: GC de 48,5% e AT igual a 51,5% (Balakirev et al. 2005). As composições nucleotídicas estão ilustradas na **Tabela 2**.

Um alinhamento foi realizado entre a sequência obtida em *Z. indianus* e sequências de esterases provenientes de genes ortólogos à *Est-6* em outras espécies (**Figura 9**). Desse modo, foram usadas as seguintes espécies para o alinhamento: *Z. indianus*, *D. melanogaster*, *D. simulans*, *D. yakuba*, *D. erecta*, *D. mauritiana*, *D. sechellia*, *D. orena*, *D. teissieri* e *D. pseudoobscura* (*Est-5b*). O alinhamento de 1642 bases incluiu exons e introns das sequências, produzindo 848 sítios invariáveis, 794 polimórficos e 59 *gaps*. Quando analisadas apenas as sequências de *Z. indianus* e *D. melanogaster* foram observados 1244 nucleotídeos invariáveis, 404 nucleotídeos polimórficos e 53 *gaps* ou dados perdidos, de um total de 1648 sítios. Isto revela uma identidade entre estas sequências de 73%.

O cálculo da distância (**Tabela 3**) por meio do método Kimura 2-parâmetros (KIMURA, 1980) demonstra uma maior proximidade das sequências das esterases de *Z. indianus* e *D. melanogaster* (índice igual a 0,304), enquanto a sequência mais divergente é a de *D. pseudoobscura* (índice igual 0,523).

A razão entre as substituições nucleotídicas sinônimas e não-sinônimas entre as sequências (d_N/d_S) variou entre 0,08 – 0,34, ficando em média igual a aproximadamente 0,15 em todas as sequências analisadas (**Tabela 4**). Valores próximos a estes foram obtidos quando se comparou o gene *Amyrel*, *Amd* e subunidade I da *Citocromo Oxidase* entre *Z. indianus* e *D. melanogaster* e estão apresentados na **Tabela 5**. Neste caso, foram utilizadas sequências de mRNA nos cálculos.

A sequência nucleotídica obtida em *Z. indianus* foi transformada na sua provável cadeia de aminoácidos. A composição de aminoácidos é muito similar às EST-6 de *Drosophila* e as sequências estão alinhadas na **Figura 10**. A porcentagem de resíduos idênticos foi calculada a cada duas sequências e apresentada na **Tabela 6**. A **Figura 11** mostra a estimativa individual de quais aminoácidos da sequência de *Z. indianus* estariam sob pressão de seleção positiva e seleção purificadora (negativa). Aminoácidos que participam do centro catalítico da enzima estariam submetidos a seleção purificadora enquanto que para os

aminoácidos da superfície da enzima as estimativas foram de seleção negativa mais branda ou mesmo de seleção positiva. De acordo com a estimativa, 19% dos aminoácidos analisados estão sob seleção positiva. Os valores do modelo Bayesiano de seleção que atua em cada aminoácido estão no **Apêndice A**.

Z. indianus	ATGAACTACGTGGGACTGGGACTTATCATTGNTGCNCAGTTTCCCGCGGGNGACGTGCGA [60]
D. melanogaster	T-.TG..C.G..TTT..CTCG-.T...[60]
D. simulans	T-.TG..C.G..TTT..CTCG-.CT...[60]
D. sechellia	T-.TG..C.G..TTT..CTCG-.T...[60]
D. mauritiana	T-.TG..C.G..TTT..CTCG-.CT...[60]
D. teissieri	T-.TG..C.G..T.T..CTC-.....[60]
D. erecta	G-.TG..C.G..TTT..CTC-.....[60]
D. orena	G-.TG..C.G..TTT..CTC-.....[60]
D. yakuba	T-.TG..C.G..TTT..CTC-.C....[60]
D. pseudoobscura	...T...GT.C.AA.T..ATC..CC-....G-----GTTTTT..ATT-.T..T[60]
Z. indianus	GTGCTCGTGCTNCGCTGTGCAAGCCCTGCTGATGAACCTACCCTGAGCAGAATTAAATAC [120]
D. melanogaster	AC..GA...A.A.A--.ATG.CC.T...T..G..C.G..G...CAG.GCA.GC..CG.GG[120]
D. simulans	AC..GA...A.C.--.ATG.CC.T...T..G..C.G..G...CAG.GCA.GC..CG.GG[120]
D. sechellia	AC..GA...A.C.--.ATG.CC.T...T..G..C.G..G...CAG.GCA.GC..CG.GG[120]
D. mauritiana	AC..GA...A.C.--.ATG.CC.T...T..G..C.G..G...CAG.GCA.GC..CG.GG[120]
D. teissieri	TC..AC.AA.C.--.ATG.CC....T..G..C.G..G..GCAG.GCA..C..CG.GG[120]
D. erecta	TC..GA...A.C.--.ATG.CCTGG..T..G..C.G..G...CAG.G.A....GCGCGG[120]
D. orena	TC..GA...A.C.--.ATG.CCTGG..T..G..C.G..G...CAG.G.A....GCG.GG[120]
D. yakuba	TC..GA...A.C.--.ATG.CC....T..G..C.G..G..GCAG.GCA..C..CG.GG[120]
D. pseudoobscura	CC..GTC..A.C.A--.TG.TC.G....AG..G.T..C...AAT.GCA..C..CGCGG[120]
Z. indianus	CCACTTTAA-GGANGTTCTCCCGGATTGCAATCCATGCCCTATGCGAGGCCACCAGTTGC [180]
D. melanogaster	T.G.GA...T...A.C.ACTA.A.C.A.....G..T....C..CGAA..G..CAC..G[180]
D. simulans	T.G.GA...T...A.C.ACTA.A.C.A.....G..T....C..CGAA..G..CAC..G[180]
D. sechellia	T.G.GA...T...A.C.ACTA.A.C.A.....G..T....C..CGAA..G..CAC..G[180]
D. mauritiana	T.G.GA...T...A.C.ACTA.A.C.A.....G..T....C..CGAA..G..CA...G[180]
D. teissieri	..G.GA...T..CAAC.ACTA.A.C.A.....G..T..G..C..CGAA..G..GC...G[180]
D. erecta	T.G.GA...T..TAAC.ACTA.A.C.A.....G..T....C..CGAA..G..CA...G[180]
D. orena	T.G.GA...T..CAAC.ACTT.A.C.A.....G..T....C..CGAA..G..CAC..G[180]
D. yakuba	T.G.GA...T...AAC.ACTA.A.C.A.....G..T..G..C..CGAA..G..CC...G[180]
D. pseudoobscura	A.G.GA...C..CAAC.A.TATA.C.A.....GC.T....C..TGA...C.....C.G[180]
Z. indianus	--ACTCACAGTGCATCTCTCGTGGATTACATAAAATTGGCCTTGGCCAGAAGCTCCTCCG [240]
D. melanogaster	CG.TCT..GA.T.GAGG...-CA..GC.G.....C-AAAAG...T.G..TAT--A.T...[240]
D. simulans	CG.TCT..GA.T.GAGG...-CA..GC.G.....C-AAAAG...A.G..TAT--.T...[240]
D. sechellia	CG.TCT..GA.T.GAGG...-CA..GC.G.....C-AAAAG...T.G..TAT--.T...[240]
D. mauritiana	CG.TCT..GA.T.GAGG...-CA..GC.G.....C-AAAAG...T.G..TAT--.T...[240]
D. teissieri	CG.TCTG.GA.TGGAGG...-C...GC.G.....C-A.A.G...TTG..TAT--.T...[240]
D. erecta	TG.TCTG.GACT.GAGG...-CA..GC.G.....C-A.A.G...TTG..TAT--.T...[240]
D. orena	TG.TCTG.GA.T.GAGG...-CA.CGC.G.....C-A.A.G...TTG..TAT--.T...[240]
D. yakuba	CG.TCTG.GACTGGAGG...-C...GC.C.....C-A.A.G...T.G..TAT--.T...[240]
D. pseudoobscura	AG.TCT.AGA.TTGAAG.C.-C.C.AC.G.....GC-A..AG...A.G..CA--T.T...[240]
Z. indianus	AACCTGTCAGCTCTCTGGTGGGGATAACCAAAGTCAGATCGATTACCCCTGGAGACTGT [300]
D. melanogaster	.TG.CAC..AAA.C.C.....C-.GC.TGC...GG...AG..C..G.....G.C.AAC[300]
D. simulans	.TG.CAC..AAA.G.C.....C-.GC.TGC...GG...AG..C..G.....G.C.AAC[300]
D. sechellia	.TG.CAC..AAA.G.C.....C-.GC.TGC...GG...AG...G.....GCC.AAC[300]
D. mauritiana	.GG.CAC..AAA.G.C.....C-.GC.TGC...GG...AG..C..G.....G.C.AAC[300]
D. teissieri	.TG.CAC..AAG.G.C....CCAC-.GC.TGC...GG...AG..C..GAA.AAG..TGAC[300]
D. erecta	.TG.CAC..AAG.G.C....CA-.GCTTGC...GG...AG..C..GAA.AAG...GAC[300]
D. orena	.TG.CAC..AAG.G.CA....CA-.GC.TGC...GG...AG..C..GA...G...GAC[300]
D. yakuba	.TG.CAC..AAG.G.C...TCAC-.GC.TGC...GG...AG..C..GAG...G...GAC[300]
D. pseudoobscura	.TG.CAC.CAAC.A.CA..TCT-.GCATGC...GG..C.AG..C.T..AG.....GA.[300]

continua→

Figura 9. Alinhamento entre as seqüências *Est-6* de espécies do gênero *Drosophila* e o fragmento amplificado de *Z. indianus*. (.) correspondem às regiões conservadas; (N) a nucleotídeos não definidos; (-) a inserções/deleções. Os nucleotídeos em letra minúscula correspondem ao intron da seqüência.

Z. indianus	TTCTGGGTGGTTGANGTC-ATTGCTGGTGTGTTGGTGAACATACCCAAATTCGCAGAACAAATA [360]
D. melanogaster	AAA.T...A.GA..G.AGG.....C--.AACC..C.G.G.CTA...GC..A....T.G-- [360]

D. simulans AAA.T....GA..G.AGG....C--..ACC..C.G...CTA...GC..A....T.G-- [360]
 D. sechellia AAA.T....GA..G.AGG....C--..ACC..C.G...CTA...GC..A....T.G-- [360]
 D. mauritiana AAA.T....GA..G.AGG....C--..ACC..C.G...CTA...GC..A....T.G-- [360]
 D. teissieri AAA.T...A.GA.CG.AGG....C--..ACC..C.G.G.GTA...GC..A.....G-- [360]
 D. erecta AAA.T..C..GA.CC.AGG....C--..ACC..C.G.G.CTA...GC..A....T.G-- [360]
 D. orena AAA.T...A.GA.CT.AGG....C--..ACT..C.G.G.CTA...AC..A....T.G-- [360]
 D. yakuba AAAC.T....GA.CG.AGG....C--..ACC..C.G...CTA...GC..A....T.G-- [360]
 D. pseudoobscura AAGCTC.CT.GAA.T.AGG.C...C--..AC...C.G.G..TAT.GGC..A....T.G-- [360]

Z. indianus AACAGAAGGAGTACCTTTCCGGTGGTGGCCACATTCATGGAGGCGCCCTTTATGTTCCG [420]
 D. melanogaster --..AG....A..G.....C.....T..... [420]
 D. simulans --..AG.....G.....T..... [420]
 D. sechellia --..AG.....G..... [420]
 D. mauritiana --..AG.....G..... [420]
 D. teissieri --..C...AC.G.....A..... [420]
 D. erecta --..C...AC.G..A.....T.....A..... [420]
 D. orena --..C...AC.G..A.....T.....A..... [420]
 D. yakuba --..C....C.G..A.....T.....C.....A..... [420]
 D. pseudoobscura --..TC.C.AC.G.....C..T.....A..A.....T.....C..... [420]

Z. indianus TGCAGCACCGCAAAATGGACACGANAACGTGATGCGTGAGGGTAAATTCATTCTGNGAA [480]
 D. melanogasterTG.....G.....C.....T... [480]
 D. simulansTG.....G.....T... [480]
 D. sechellia ...G...G.....G.....A...T... [480]
 D. mauritianaTG.....G.....T... [480]
 D. teissieriG..TTG.....G.....C.....A...T... [480]
 D. erectaG.A.TG.....G.....C.....C.....A...T... [480]
 D. orenaG.A.T.....G.....C.....A...T... [480]
 D. yakubaG...TG.....G.....C.....A...T... [480]
 D. pseudoobscura C.G...CAGT....C..C..T..G...T.T....C.....A..TC.T....C.T... [480]

Z. indianus GATAAGCTATCGCTGGGCCCATTTGGGTTTCGCGAGCACCGGCGATAGGGATCTTCCCGG [540]
 D. melanogasterG.....T..... [540]
 D. simulansG.....T..A.....T.G.... [540]
 D. sechellia ...T.....G.....G..... [540]
 D. mauritianaG.....T.....G..... [540]
 D. teissieriG.....T.....C.....G..... [540]
 D. erectaG.....A.....C.....G..... [540]
 D. orenaG..G....C....A....A....CC....G.... [540]
 D. yakubaG.....C.....A.....C.....G.... [540]
 D. pseudoobscuraC.....T..T..C....A....T.....T..T..CGC....T.GT... [540]

Z. indianus AAAC.TATGGACTGAAAGATCAACGGCTGGCTCTCAAATGGATTAAGCAGAATATAGCCAG [600]
 D. melanogaster [600]
 D. simulansA..... [600]
 D. sechellia [600]
 D. mauritiana [600]
 D. teissieriG..... [600]
 D. erecta G.....TG.....GA..... [600]
 D. orenaTG.....GAA.....T..... [600]
 D. yakubaC.....TG.....G..... [600]
 D. pseudoobscuraT.....G....G..C.....GCTC....C.....C..T.... [600]

Z. indianus TTTTGGTGGAGAACCGCAGAACGTACTGTTGGTTGGTCACTCCGCTGGAGGAGCTTCGGT [660]
 D. melanogaster [660]
 D. simulansC.....A.....A..... [660]
 D. sechelliaA.....A....GC..... [660]
 D. mauritianaG....A...A..A..... [660]
 D. teissieri C....C.....G...T..G....A.....C..... [660]
 D. erecta C....A.....AG.....CG.....G..... [660]
 D. orena C....A.....G.....CG.....G..... [660]
 D. yakuba C....A....G..G....A.CG....A..... [660]
 D. pseudoobscura C..C.....G..G..AG....A.T..AG.TA.A.....G..C..T.GA..C.. [660]

Z. indianus CCATCTGCAGATGCTTCGTGAAGATTTTCGCCAGCTGGCCAGGGCGGCATTCTCGTTTAG [720]
 D. melanogaster [720]

continua→

D. simulansG.....A..... [720]
D. sechelliaG.....T.....G.A..... [720]
D. mauritianaG.....A..... [720]
D. teissieriG.....A.....GA..... [720]
D. erectaG.....T.....A.....CA..... [720]
D. orenaG.....G.....T.....A.....A..... [720]
D. yakubaG.....A.....GA..... [720]
D. pseudoobscura T.....G.....A.....G..C..A..A..T...A.A...A...A...A..C.. [720]

Z. indianus TGGAAAC-CTCTAGATCCATGGGTTATACAGAAGGGAGCAAGAGGACGAGCCTTTGAACT [780]
D. melanogasterTG..... [780]
D. simulans C.....TG....G.....G.C.....C.....G..... [780]
D. sechellia C.....TG....G.....G.C.....T..C..... [780]
D. mauritiana C.....TG....G.....G.C.....C..... [780]
D. teissieri C..C..TG....G.....G.C..G...C..C..... [780]
D. erecta C.....TG....G.....C.....G.C..G...C.G.C..... [780]
D. orena C.....TG.A..G.....G.C..G...C.G.C.....G.. [780]
D. yakuba C..C..TG....G.....G.C..G...C.G.CT..... [780]
D. pseudoobscura ...C..TG..T.G..C..C.....GG.C..C.A...G.C.TCT...G.....G.. [780]

Z. indianus GGGACGCAACGTGGGATGTGAATTGGCTGAAAAATCCACCAAGCCTGAAAAAAGGGCC [840]
D. melanogasterC.....G.C..G...-.....G...T---... [840]
D. simulansC.....C.....G.C..TG...-.....G...T---... [840]
D. sechelliaC.....C.....G.C..GG..T---... [840]
D. mauritianaC.T.....G.C..GG...-.....G...T---... [840]
D. teissieri ...T...TT.....C.G.....GG.C..GG...-.....G...T---... [840]
D. erecta ...T...T.....G.....CA.GG.C..GG...-.....G...T---... [840]
D. orena ...T...T.....G.....CA.GG.T..GG...-.....A..G...T---... [840]
D. yakuba ...T...TT.....G.....G.C..G...-.....C..G...T---... [840]
D. pseudoobscura ...C...TT.....C.....G.CA...AAGCG.C...GTG.-C...C..G...T---.TT [840]

Z. indianus TAAAAGTACAAAGCCAGCCAGGGGAAATTAGTCACCCCGGCCAAAACCTCCCTAAATTT [900]
D. melanogasterG--T.....T.--.....G...T..GT..AT...T..T... [900]
D. simulansG--T.C.....T.--.....G...T..GT..AT...TC.T... [900]
D. sechelliaG--T.C.....T.--.....G...T..GT..AT...TC.T... [900]
D. mauritiana .T..G--T.C.....T.--.....G...T..GT..AT...TC.T... [900]
D. teissieriG--..C.....G...T.--.....G...T..GT..T..TG.T... [900]
D. erectaG--..C.....T.--.....G...TT.GT...T..TG.T... [900]
D. orenaG--..T...T.....T.--.....G...T..GT...T..TG.T... [900]
D. yakubaG--..C.....T.--.T.....G.G.T.T..GT...T..TG.T... [900]
D. pseudoobscura .G..G--T.C.....G..T.--..A.....T.GG.G.T..GG...T..TCGTG..C [900]

Z. indianus TCCCAAGGGGGCCCTTTGCCCAATTAAACNCCCGTATTGGGGACCCGGGC-C-CCAA [960]
D. melanogaster ...T.T.T.---.....T...T...G--T..T.....A.C.AT...ATG.T...G [960]
D. simulans ...T.C.T.---.....T...T...G--T..T..GC...A.C.AT...ATG.T...G [960]
D. sechellia ...T.C.T.---.....T...T...G--T..T..GC...A.C.AT...ATG.T...G [960]
D. mauritiana ...T.C.T.---.....T...T...G--T..T..GC...A.C.AT...ATG.T...G [960]
D. teissieri ...T.T.T.---.....T...T...G--T..T..GG...A.C.AT...ATG.T...G [960]
D. erecta ...T.T.T.---.....T...T..GG--T...T..GG...A.C.AT...ATGTT... [960]
D. orena ...T.T.T.---.....T...T..GG--T..T..GG...A.C.AT...ATG.T...G [960]
D. yakuba ...T.T.T.---.....T...T..GG--T..T..GG...A.C.AT...ATG.T...G [960]
D. pseudoobscura G.AT.T.T.---..G...A.G..TT.CGG--T..T..TG.A.AAT.G..A.ATG.A...G [960]

Z. indianus ACCCCATTATCACCCAGGATCCCCGGGGAGGGCATTAAAGCGAAAGGTTTCGACAAGGTT [1020]
D. melanogaster ..G.....-A...T.T.....G....G..A....GAC..... [1020]
D. simulans ..G.....C.....-A.....T.....G....G..A....GAC..... [1020]
D. sechellia ..G...T..C.....-A.....T.....G....G..GA....GAC..... [1020]
D. mauritiana ..G...T..C.....-A.....T.....G....G..A....GAC..... [1020]
D. teissieri .AG..T..C.....A.A..A-A.T..T.T...C..G....G..A....GAC.T... [1020]
D. erecta .AG..T..C.....AA.....-ACC..T.TT....G....G..A....GAC.A... [1020]
D. orena .AG..T..C.....AA.....-ACT..T.TT....G....G..A....GTC.A... [1020]
D. yakuba .AG.GT..G.G.....A...-A.T..T.T...C.....G..A....GAC.A... [1020]
D. pseudoobscura .AG..T.C..T.G..AC....T-.T..TATT.....G....G..A...T.C.C....C [1020]

continua→

Z. indianus CCCTGG-CCGTTTCCTAAATCCCCGAGGGAGGGGGTTCCATGCCCCC--TTGCTTTTA [1080]
D. melanogaster ..G...G.T.....TG..A.A...AT..T..C.A.A....G.--...G [1080]

D. simulansG.T.....CG..A.A....AT..T..C.A.A.....G.---.....C...[1080]
 D. sechelliaG.T.....CG..A.A....AT..T..C.A.A.....G.---.....[1080]
 D. mauritianaG.T.....CG..A.A....AT..T..C.A.A.....G.---C.....[1080]
 D. teissieriG.T...A....TG..A.A....AT..T..C.A.A.....G.---.A...A.G[1080]
 D. erectaG.T...A....CG..A.T....AT..T..C.A.A.....G.---.A.....[1080]
 D. orenaG.T...A....CG..A.T....AT..T..C.A.A.....G.---.A.....G[1080]
 D. yakubaG.T...A....TG..A.A....AT..T..C.A.A.....G.---.A.....G[1080]
 D. pseudoobscura ..T...G.T..GA.G..T.C.A.G....AT..T....A.A.C...G.T.TG.....GGA.[1080]

Z. indianus AGGGGAGGGAATCCTGA--AACAGTT-ACCCATGATCTAGACGATCGTTGGCTTGAGTTG[1140]
 D. melanogaster .A..A.C....AT...G--.T....-T.G.....A.....G.....[1140]
 D. simulans .A..A.C....AT...G--.T....-T.G.....GA.....[1140]
 D. sechellia .A..A.C....AT...G--.T....-T.G.....GA.....[1140]
 D. mauritiana .A..A.C....AT...G--.T..C.-T.G.....GA.....[1140]
 D. teissieri G..AATT...AT...G--GTT.A.C-.T.A.G.....GA.....C...T.A..C.G.[1140]
 D. erecta .AT.A.T...AT...G--G....C-.T.G.G.....GA.....T...T.G.[1140]
 D. orena .T.A.T...AT...G--G....C-.T.G.G.....GA.....T...T.G.[1140]
 D. yakuba GC..A.T...AT...G--C....C-.T.G.G.....GA.....C...T....C.G.[1140]
 D. pseudoobscura .AACAG.C.TC.T...GTCGGG....G.TGTG....CA.T..C..G...T...C.G.[1140]

Z. indianus GCACCATATTTGCTATTNTAACGGGAC---ANNAAAACCAATAAAGAGATGGATGAGTAT[1200]
 D. melanogasterA.....C..C.....---CG..G....A..G..T....C..C..C[1200]
 D. simulansC.....C..C.....---CG..G....G..G..T....C..C..C[1200]
 D. sechelliaT.....C..C.....---CG..G....G..G..T....C..C..C[1200]
 D. mauritianaC.....C..C.....---CG..G....G..G..T....C..C..C[1200]
 D. teissieriC.A..G..C..C.....---TCG..G....TC..G..C....C..T..C[1200]
 D. erecta ..C..C...C....G..C..C.....---TCG..G....TCG.G..T..A..C..T..C[1200]
 D. orena ..C.....C....G..C..C.....---TCG..G....TCG.G..T....C..T..C[1200]
 D. yakubaC.A..G..C..C.....---TCG..G....TC..G..C....C..T..C[1200]
 D. pseudoobscura ..T..G.....T.G..C..C.....TCC.TG.CG....TC.....T....C..T..C[1200]

Z. indianus ACACGGAAGGTAAGATAGCAATATATAGGCAATCGATCATTGTCATAGAAAGCTATTTA[1260]
 D. melanogaster T.G....AA.T.AGC..G.G.....AGAG....A...C.....C.[1260]
 D. simulans T.G....A.T.AGC..G.C....T.G.....AGAA....A...C.....C.[1260]
 D. sechellia T.G....A.T.AGC..G.C....T.....AGAA....A...C.....C.[1260]
 D. mauritiana T.G....A.T.AGC..G.C....T.....AGAA....A...C.....C.[1260]
 D. teissieri T....CC.AC.T..GC.....G.G.....GAG....AA.C.C.....GG[1260]
 D. erecta T.G...C.AA.T..GC.....T.G.....GAG.....C.....GG[1260]
 D. orena T.G...C.AA.C..GC.....G.....CAG.....C.....GG[1260]
 D. yakuba T....CGAC.T..GC.....C.G.....GAG.....C.....GG[1260]
 D. pseudoobscura T.C..T..AC.G..GC..G.G....C.G..AG....GCGC..CA.TG.G.....GG[1260]

Z. indianus TATATGCAGCAANTGTTACGGAGGTATTGTTTAAAGATAGCAGGAAGGACAACGAGGAT[1320]
 D. melanogaster G.AT.....GGC.A.....TA.TC.C..C.....C....GTCATT....[1320]
 D. simulans G.AC.....GGC.....TA.TC.C..C.....C....GTCATT....[1320]
 D. sechellia G.AT.....GGC.....TA.TC.C..C.....C....GTCATT....[1320]
 D. mauritiana G.AT.....GGC.....TA.TC.C..C.....C....ATCATT....[1320]
 D. teissieri G..T.....GA.....TA.TC.C..C.....C.....C....TCATT....[1320]
 D. erecta G..T.A....GC.....TA.TC.C..C.....C.....C....TCATT....[1320]
 D. orena G..T.A....GC.....TA.TC.C..C.....C.....C....TCATT....[1320]
 D. yakuba G..T.....GC.....CA.TC.C..C.....C.....C....TCATT....[1320]
 D. pseudoobscura G.CC.....GCC.T..T....C..TC.....A.....G..ATTTCTTT....[1320]

Z. indianus CTAAATCGTAAAAATGGCAAGAGACCTGCTCATGGTAGGGTGTATGACAATCCAGCGAAG[1380]
 D. melanogaster ..TC...C...T...A....T....CT.C.C.TAT..C.....CG.A[1380]
 D. simulans ..TC...C...T...A..A..T....CT.C.CGTAT..C.....G..CG.A[1380]
 D. sechellia ..TC...C...T...A..A..T....CT.C.CGTAT..C.....G..CG.A[1380]
 D. mauritiana ..TC...C...T...A..A..T....CT.C.CGTAT..C.....G..CG.A[1380]
 D. teissieri ...C...C...T.....A..T....CT.C.C.TTT..C.....CG.C[1380]
 D. erecta ..TC...C...T...A..A..T....CT.C.C.TTT..C.....CG.T[1380]
 D. orena ..TC...C...T...A..A..T....CT.C.CATT..C.....CG.T[1380]
 D. yakuba ..GC...C...T.....A..T....CT.C.C.TTT..C.....CG.C[1380]
 D. pseudoobscura ..CC...C...C..C..A....T..G.T.T.C.CATT..C..C.....C..C..C[1380]

continua→

Z. indianus AAAGGCATAGATCAAGACCTGGCGAAAATGCATGGTAGGGATTTTGGTAagaaaatcata[1440]
 D. melanogasterA..C.CA..G.T.....C..TCGAACC.A.TAT.....g.....g..[1440]

D. simulansA..C.CA..G.T.....C..CCGAACC.A.TAT.....g.....g..[1440]
 D. sechelliaA..C.CA..G.T.....C..CCGAACC.A.TAT.....g.....g..[1440]
 D. mauritianaG..C.CA..G.T.....C..CCGAACC.A.TAT.....g.....g..[1440]
 D. teissieri TT...A..C.CA....C....T.CG.CCC.ATA.T..TA.....[1440]
 D. erecta .C...A..C.CA..T.C....T.C..CCGA.G.A..TA.....g.....g..[1440]
 D. orena .C...A..C.CA..T.C....T.C..CCGA.G.A..TA.....g.....g..[1440]
 D. yakuba ..G..A..C.CA....C....A.C..CCGA.G.A..TAA.....gc.[1440]
 D. pseudoobscura .C...A..C.GC....GGT....A..GCGCAC..AC.TTA.....g..cct.tg.g[1440]

Z. indianus cgtataNataga--cttaattaaatgacaa--aaggaagaggaACTGTGCAAGGGGATGA[1500]
 D. melanogaster .t.t..a..g.--.....g.....c.tt--ctttt.t.....A..C..T..C..[1500]
 D. simulans .t...ta..ga.--.....c.tt--ctttt.t.....T..T..C..[1500]
 D. sechellia .t...ta.....--.....cc.tt--ctttt.t.....A..T..T..C..[1500]
 D. mauritiana .t...tat..a.--.....c.tt--ctttt.t.....T..T..C..[1500]
 D. teissieri .t....a..ga.--.....c....ca....--ctttt.a.....T..T..C..[1500]
 D. erecta .t....a..ga.--.....c.....a.t.--c.ttt.c.....T..T..C..[1500]
 D. orena .a....a..ga.--.....c.....t.--c.ttt.c.....T..T..C..[1500]
 D. yakuba .t....gt.ga.--.....c.....ca.t.--ctttt.t.....T..C..C..[1500]
 D. pseudoobscura g.g.g.g.agagag.a.tt.....cacgg.ttcctttt.c.....G....T..T....[1500]

Z. indianus ATATCTGATGATGTTAGAAAATCGGGTAAAAGAGGCGAAAATGCGAAAGGATGAGGAAAT[1560]
 D. melanogaster C..CT.TT....A..C.....TTC...CG...T.T.G.....TCC.....C.G..[1560]
 D. simulans C..CT.TT....A..C.....TTC...T.G...A.T.G.....TCC.....G..[1560]
 D. sechellia C..CT.TT....A..C.....TT...T.G...A.T.G.....TCC.....G..[1560]
 D. mauritiana C..CT.TT....A..C.....TTC...T.G...A.T.G.....TCC.....G..[1560]
 D. teissieri C..CT.CT....A..T.....TCC...G.....G..T...TCC.....A.G..[1560]
 D. erecta C..CT.TT....A..T.....TTC...G...TTT.G..C....CC...C...C.GT.[1560]
 D. orena C..CT.TT....A..T.....TTA...G...TTT...T....CC...C...C.GT.[1560]
 D. yakuba C..CT.AT....A..T.....CGCC...G.A.TTT.G..T...TCC.....C.GT.[1560]
 D. pseudoobscura C...T.CT.....C.....ATC..TCG...C.TC..T....TCA.....[1560]

Z. indianus AATTTGGAGGAAATTTATAAAAAATGCTGGGGGATTTTGCTAATAGAGAACAGGGCATGCT[1620]
 D. melanogasterC...A..T....C..T.....CA.....TCG...T..TA.T...TCT..[1620]
 D. simulansC...A..T....C..T.....CA.....TCG...T..TA.T...GAT..[1620]
 D. sechelliaC...A..T....C..T.....CA.....TC...T..TA.T...G.T..[1620]
 D. mauritianaC...A..T....C..T.....CA.....TCG...T..TA.T...G.T..[1620]
 D. teissieriC...A..T..C..C..T.....CC.....CTTG..T..T..TG.T..[1620]
 D. erecta .G...C...A..C....C..T.....CA.....TTG..T..TG.T.....T..[1620]
 D. orenaC...A..T....C..T.....CA.....TTG..T..TA.T....T..[1620]
 D. yakuba G...C...A..T..C..C..T.....CA.....TTG..T..T..T...G.T..[1620]
 D. pseudoobscuraCAC.A..T..CC.G..G.....AAT..C....TACTG..C...A.T..T.CT..[1620]

Z. indianus AGAATAAGGGGGATGCGGATTTAAAAATAAGGTGGGCAGTAGGAAAGTAAAGGTGAGTGA[1680]
 D. melanogaster .A...T..T.A....AT..C...G...T..A..T...GA...T.CC.AT.ATTA.C[1680]
 D. simulans GA...T..T.A....CC..C.....C..A..T...GA...T.CC.AT.ATTA.C[1680]
 D. sechellia CA...T..C.A....CT..C...G...T..A..T...GA...T.CC.AT.ATTA.C[1680]
 D. mauritiana .A...T..T.A....CT..C.....C..A..T...GA...T.CC.AT.ATTA.C[1680]
 D. teissieri .A...T..C.A....TT..C...G...T..A....GA...T.CG..C.ACTATC[1680]
 D. erecta .A...T..T.A....TT..C...G...T..A....GA...T.CG..T..TTATC[1680]
 D. orena .A...T..T.A....TT..C...G...T..A....GA...T.CG..T..TTATC[1680]
 D. yakuba .A...C..C.A....TT..C...G...T..A....GA...T.CG..T.ACTATC[1680]
 D. pseudoobscura T.C..TT..AACT...TT..CC.GG...T..A....C..C...C.CC.AC..CT.TC[1680]

Z. indianus NATTNATCGGAGNAAATGCGA[1701]
 D. melanogaster T...T..ATTGATGGC...C.[1701]
 D. simulans T...T..ATTGATGG...C.[1701]
 D. sechellia T...T..ATTGATGG...C.[1701]
 D. mauritiana T...T..ATTGATGG...C.[1701]
 D. teissieri T...C..AA.GCTGGG....[1701]
 D. erecta T...AG.AA..ATGGT....[1701]
 D. orena T...AG.AA..ATGGT....[1701]
 D. yakuba C...C..AA.GATGG....[1701]
 D. pseudoobscura C..AACC..A.ACGGG....[1701]

Tabela 2. Composição nucleotídica obtida das seqüências *Est-6* de espécies do gênero *Drosophila* e *Zaprionus indianus*. Todas as frequências são dadas em porcentagem.

Espécies	Exon I GC	Intron GC	Exon II GC	Total GC	Total GC:AT
<i>Z. indianus</i>	50,0	25,0	40,1	47,9	0,923
<i>D. melanogaster</i>	50,4	24,0	37,8	48,5	0,942
<i>D. simulans</i>	51,9	20,0	37,8	49,8	0,992
<i>D. sechelia</i>	51,9	24,0	37,0	49,7	0,988
<i>D. mauritiana</i>	51,9	20,0	37,0	49,7	0,988
<i>D. teissieri</i>	52,6	22,0	40,2	50,7	1,028
<i>D. erecta</i>	52,4	24,0	37,0	50,0	1,000
<i>D. orena</i>	52,0	26,0	34,1	49,3	0,972
<i>D. yakuta</i>	53,3	25,5	39,3	50,8	1,032
<i>D. pseudooscura</i>	52,5	23,5	42,9	53,1	1,132
Média	51,9	23,4	38,3	49,9	0,997

Tabela 3. Distâncias filogenéticas calculadas por meio do método Kimura 2-parâmetros (KIMURA, 1980) entre seqüências *Est-6* de espécies do gênero *Drosophila* e *Z. indianus*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1 <i>D. mel</i>	–									
2 <i>D. sim</i>	0,050	–								
3 <i>D. sec</i>	0,050	0,026	–							
4 <i>D. mau</i>	0,050	0,019	0,026	–						
5 <i>D. tei</i>	0,145	0,142	0,142	0,140	–					
6 <i>D. ere</i>	0,137	0,131	0,131	0,130	0,100	–				
7 <i>D. ore</i>	0,136	0,135	0,135	0,135	0,105	0,037	–			
8 <i>D. yak</i>	0,142	0,137	0,136	0,133	0,073	0,086	0,092	–		
9 <i>D. pse</i>	0,420	0,402	0,414	0,403	0,370	0,382	0,386	0,369	–	
10 <i>Z. ind</i>	0,304	0,316	0,313	0,312	0,355	0,359	0,359	0,360	0,523	–

Tabela 4. Razão entre substituições nucleotídicas não-sinônimas e sinônimas ($\omega = d_N/d_S$) de genes ortólogos à *Est-6* das espécies usadas no alinhamento.

Seq 1	Seq 2	d_S	d_N	ω	Seq 1	Seq 2	d_S	d_N	ω
Z. ind	D. mel	1,7149	0,2877	0,17	D. sec	D. mau	0,0610	0,0122	0,20
Z. ind	D. sim	1,6734	0,2870	0,17	D. sec	D. tei	0,2793	0,0956	0,34
Z. ind	D. sec	1,5740	0,2927	0,19	D. sec	D. ere	0,2361	0,0970	0,41
Z. ind	D. mau	1,7075	0,2898	0,17	D. sec	D. ore	0,2717	0,0947	0,35
Z. ind	D. tei	1,5360	0,3180	0,20	D. sec	D. yak	0,2712	0,0937	0,34
Z. ind	D. ere	1,5350	0,3202	0,21	D. sec	D. pse	1,7127	0,1855	0,10
Z. ind	D. ore	1,5663	0,3162	0,20	D. mau	D. tei	0,2710	0,0932	0,34
Z. ind	D. yak	1,4824	0,3158	0,21	D. mau	D. ere	0,2464	0,0937	0,37
Z. ind	D. pse	1,6082	0,3646	0,23	D. mau	D. ore	0,2711	0,0950	0,35
D. mel	D. sim	0,1518	0,0209	0,14	D. mau	D. yak	0,2719	0,0892	0,33
D. mel	D. sec	0,1336	0,0238	0,18	D. mau	D. pse	1,6791	0,1814	0,10
D. mel	D. mau	0,1310	0,0229	0,17	D. tei	D. ere	0,2517	0,0521	0,20
D. mel	D. tei	0,2939	0,0951	0,32	D. tei	D. ore	0,2713	0,0519	0,19
D. mel	D. ere	0,2878	0,0919	0,32	D. tei	D. yak	0,1505	0,0436	0,29
D. mel	D. ore	0,2979	0,0896	0,30	D. tei	D. pse	1,7495	0,1634	0,10
D. mel	D. yak	0,2850	0,0952	0,33	D. ere	D. ore	0,1049	0,0164	0,16
D. mel	D. pse	1,5581	0,1815	0,12	D. ere	D. yak	0,2514	0,0391	0,15
D. sim	D. sec	0,0755	0,0098	0,13	D. ere	D. pse	2,0061	0,1633	0,08
D. sim	D. mau	0,0554	0,0073	0,13	D. ore	D. yak	0,2735	0,0418	0,15
D. sim	D. tei	0,2921	0,0946	0,32	D. ore	D. pse	1,9834	0,1641	0,08
D. sim	D. ere	0,2611	0,0955	0,37	D. yak	D. pse	1,9172	0,1622	0,08
D. sim	D. ore	0,2882	0,0946	0,32					
D. sim	D. yak	0,2864	0,0930	0,32					
D. sim	D. pse	1,7439	0,1818	0,10	Média			0,15	

Tabela 5. Razão entre substituições nucleotídicas não-sinônimas e sinônimas ($\omega = d_N/d_S$) de genes de *D. melanogaster* e *Z. indianus*.

	Citocromo Oxidase	AMD	Amyrel	Est-6
d_N	0,04	0,09	0,12	0,29
d_S	0,57	3,72	1,40	1,72
ω	0,07	0,02	0,08	0,17

	Peptídeo sinal
Z. indianus	MNYVGIIVLSCPWASASARASDDALLVNLQPQGLRGRDNGRYYSYESMPYAEPPVGDLC [60]
D. melanogaster	L.LGSN.SDT..P...Q.....S.....I.....T...F [60]
D. simulans	L.LGSN.SDP..P...Q.....S.....I.....T...F [60]
D. sechellia	L.LGSN.SDP..P...Q.....S.....I.....T...F [60]
D. mauritiana	L.LGSN.SDP..P...Q.....S.....I.....I...F [60]
D. teissieri	L.L..I.TNP..P...Q.....N.....I.....L...L [60]
D. erecta	G...L.L..I.SDP..LV..Q.....N.....I.....I...L [60]
D. orena	G...L.L..I.SDP..LV..Q.....N.F...I.....T...F [60]
D. yakuba	L.LT.I.SDP..P...Q.....N.....I.....L...L [60]
D. pseudoobscura	.YCAK.LL.G.F.I.S..SDPV.P...D..N.....L.....F [60]
Z. indianus	EAPDPYKQAWADTFEATSSPVGCPQWDQFTPGDCKWVGEEDCLTVSIYKPKNSKRSSFV [120]
D. melanogaster	...E...K.S.I.D..KT..A.L.....AN.L.....V.....N... [120]
D. simulans	...E...K.T.I.D..KT..A.L.....AN.L..... [120]
D. sechellia	...E...K.S.I.D..KT..A.L.....PN.L..... [120]
D. mauritiana	...E...K.S.I...KT..A.L.....AN.L..... [120]
D. teissieri	...E...T.L.I.D..KA..H.L.....NK.D.L.A.....V.....S.N... [120]
D. erecta	...E...T.L.I.D..RA..A.L.....TE.D.LA.A.....V.....S.N.Y.. [120]
D. orena	...A...T.L.I.D..KA..A.L.....T..D.L.A.....V.....S.N.Y.. [120]
D. yakuba	...E...T.S.I.D..KA..H.L.....S..D.L.A.....S...Y.. [120]
D. pseudoobscura	...Q...Q.T...D..QP..L.M.....IQ..D.LA.N.....V.R...S.N... [120]
Z. indianus	VAHIHGGAFFMFGAAPQNGHENVMREGKFIILVKISYRLGPLGFASTGDRDLPGNYGLKDQR [180]
D. melanogaster	W.....V..... [180]
D. simulans	W..... [180]
D. sechellia	R..... [180]
D. mauritiana	W..... [180]
D. teissieri	AL.....T..... [180]
D. erecta	AL.....S.T..... [180]
D. orena	AL.....T..... [180]
D. yakuba	AL.....S.T..... [180]
D. pseudoobscura	..Q.....G.S.....F...NL.....V...A..S..F..... [180]
Z. indianus	LALKWIKQNIASFGEPPQNVLLVGHSSAGGASVHLQMLREDFGQLARAAFSFSGNALDPWV [240]
D. melanogaster	 [240]
D. simulans	I.....K..... [240]
D. sechellia	I.A.....K..... [240]
D. mauritiana	E.I.I.....K..... [240]
D. teissieri	R.....E...I.....K..I..... [240]
D. erecta	...E..R.....E..V.....K..I..... [240]
D. orena	...E..RK...C...E..V.....K..I..... [240]
D. yakuba	...E..R.....E.IV.I.....K..I..... [240]
D. pseudoobscura	...L.....E.I.VI.....G.....V.....SK..K..I..... [240]
Z. indianus	IQKGARGRAFELGRNVGCELAKDSPSLKKCLKTKPASELVTAVRNFLKFSYVPFAPFSPV [300]
D. melanogaster	S.E...T.....S.....K..I..... [300]
D. simulans	V.....T...S.E..A.....S.....K..I..... [300]
D. sechellia	V.N.....T...S.E..A.....S.....K..I..... [300]
D. mauritiana	V.....SSE..A.....S.....K..I..... [300]
D. teissieri	V.E.....I..G..E..A.....I..... [300]
D. erecta	V.E.G.....I..G..A.....I.....G... [300]
D. orena	V.E.G.....I..G..A.....S.....I.....G... [300]
D. yakuba	V.E.GL.....I..G..E..A.....D..S.....I.....G... [300]
D. pseudoobscura	V.Q.G.L.....I..GQ.S..VT.....S.....I.S.....V.A...T..G... [300]
Z. indianus	LETSDAPNPIITQDPGEGIKSERFDKVPWAVSYIHEEDGGFHAPELLLRGGNPETVTHDLND [360]
D. melanogaster	..P...DA.....RDV...GK.GQ.....VT.....YN.A...KERKSGI.ID...E [360]
D. simulans	..P...DA.L...R.V...GK.GQ.....VT.....YN.A...KERKSGI.ID... [360]
D. sechellia	..P...DAFL...R.V...GE.GQ.....VT.....YN.A...KERKSGI.ID... [360]
D. mauritiana	..P...DAFL...R.V...GK.GQ.....VT.....YN.A...KERKSGIAID... [360]
D. teissieri	V.P...EAFV...K.SDV...GK.GH...T.VT.....YN.A...MGNWKSGLI... [360]
D. erecta	V.P...V.KAFL...N.TDV...GK.GQ...T.VT.....YN.A...NEWKSG..IE... [360]
D. orena	V.P...EAFV...N.TDV...GK.GQ...T.VT.....YN.A...SEWKSG..IE... [360]
D. yakuba	V.P...EAFV...E.SDV...GK.GQ...T.VT.....YN.A...AEWKSG..IE... [360]
D. pseudoobscura	V.SP...EAF.S.H.VDI...GK.AQ...T.TT.....YN.A...EKQSGRELIV... [360]

continua→

Z. indianus	RWLELAPYLLFYRDKKTNKEMDEYTRKVRQQYIGNRSFGIESYLYMQQVFTDVLFKNSTK [420]
D. melanogaster	K.D..D.S..IK.E....QR.D....SEL.RL...I.....Q[420]
D. simulans	F.....K.D..D.S..IKED.L..QK.D....SEL.RL...I.....Q[420]
D. sechellia	F.....K.D..D.S..IK.D.L..QK.D....SEL.RL...I.....Q[420]
D. mauritiana	F.....K.D..D.S..IKED.L..QK.D....SEL.RL...I.....Q[420]
D. teissieri	...DW.....I.D..D.S..QL....V...R.NL...WDL..M...I.....Q[420]
D. erecta	..FDW.....IEDI.D.S.QI....L...R.....WDL..L...I.....Q[420]
D. orena	..FDW.....IED..D.S.QI....M...R.....WDL..L...I.....Q[420]
D. yakuba	..FDW.....I.D..D.S..RL....L...R.....WDL..L...I.....Q[420]
D. pseudoobscura	..FDW.....MT.I.D..D.S..L..E.L.D.R.SV...WDL.RL.....E[420]
Z. indianus	DSLEDLHRKNGKRPAHARVYDNPAEKGIDQDLAKMHGRD <u>FGTVH</u> GEYFLIFENRVKEAKM [480]
D. melanogaster	E.L....Y..S..Y.Y.....A.V..NRTDY.....H...D.....F.RDVE. [480]
D. simulans	E.L....Y..S..Y.Y.....A.V..NRTDY.....H...D.....F.R.VE. [480]
D. sechellia	E.L....Y..S..Y.Y.....A.V..NRTDY.....H...D.....L.R.VE. [480]
D. mauritiana	E.L....Y..S..Y.Y.....A.V..NRTDY.....H...D.....F.R.VE. [480]
D. teissieri	..L....Y..S..Y.F.....DL..A.A.S??IVI.....H...D.....S.R..EL [480]
D. erecta	..L....Y..S..Y.F.....DT..AHA.SNRKDI.....H...D.....F.RDLEL [480]
D. orena	..L....Y..S..Y.F.....DT..AHA.SNRKDI.....H...D.....L.RDL.L [480]
D. yakuba	..L....Y..S..Y.F.....D...A.A.TNRKDI.....H...D.L....A.RNLEL [480]
D. pseudoobscura	I.L....H..S.VY.F.....NT..G.G...RTDIN.....H...D...M...I.R.PQL [480]
Z. indianus	RKDEEIIWRNFIKMLADFANREQGMLEYGGCGFKNKVGSRKVKVSEIDRRGC?NRQHVEF [540]
D. melanogaster	.P..Q..S....N.....SSDN.S.K..E.D..DN...E.FQLLA.YID..Q..... [540]
D. simulans	.P....S....N.....SSDN.D.K..E.A...N...E.FQLLA.YID..Q..... [540]
D. sechellia	.P....S....N.....SSDN.V.K..E.A..DN...E.FQLLA.YID..Q..... [540]
D. mauritiana	.P....S....N.....SSDN.V.K..E.A...N...E.FQLLA.YID..Q..... [540]
D. teissieri	.P..K..S....N.....LSDH.V.K..E.V..DN...E.FELLS.HKA..E.K.Y... [540]
D. erecta	.P..QLVS....N.....LSDD.I.K..E.V..DN...E.FELLS.SKN..E.K.Y... [540]
D. orena	.P..QL.S....N.....LSDN.I.K..E.V..DN...E.FELLS.SKN..E.K.Y... [540]
D. yakuba	.P..QL.S....N.....LSDH.V.K..E.V..DN...E.FELLS.HKD..E.K.Y... [540]
D. pseudoobscura	.S....S....L...N..VLS.N.T.AF.T.V.QDN...S.LQLLS.T.N..E.LELES. [540]
Z. indianus	P[541]
D. melanogaster	. [541]
D. simulans	. [541]
D. sechellia	. [541]
D. mauritiana	. [541]
D. teissieri	. [541]
D. erecta	. [541]
D. orena	. [541]
D. yakuba	. [541]
D. pseudoobscura	. [541]

Figura 10. Alinhamento múltiplo das seqüências de aminoácidos entre genes relacionados à *Est-6* de *D. melanogaster*. Posições que compartilham aminoácidos idênticos são marcadas com pontos (.); (X) e (?) representam códons desconhecidos. As caixas correspondem a regiões conservadas que circundam o sítio catalítico histidina, ácido aspártico e serina (em negrito e sublinhado). As pontes dissulfeto (C-C) estão indicadas acima da seqüência.

Tabela 6. Porcentagem de resíduos de aminoácidos idênticos entre as seqüências comparadas do gene *Est-6* em diferentes espécies do gênero *Drosophila* e para a seqüência obtida neste trabalho em *Z. indianus*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1. <i>Z. indianus</i>	-	77	77	76	76	73	72	72	72	66
2. <i>D. melanogaster</i>		-	95	95	94	82	81	82	82	71
3. <i>D. simulans</i>			-	97	98	82	81	82	82	71
4. <i>D. sechellia</i>				-	97	83	81	82	83	71
5. <i>D. mauritiana</i>					-	82	81	81	83	74
6. <i>D. teissieri</i>						-	90	90	91	74
7. <i>D. erecta</i>							-	96	92	73
8. <i>D. orena</i>								-	92	74
9. <i>D. yakuba</i>									-	74
10. <i>D. pseudoobscura</i>										-

1	11	21	31	41
Peptídeo sinal	RA	SDDAL L VNLP	QGKLRGRDNG	RYYSY E SMPLY
51	61	71	81	91
A E P P V G D L R C	E A P D P Y K Q A W	A D T F E A T S S P	V G C P Q W D Q E T	P G D C K W V G E E
101	111	121	131	141
D C L T V S I Y K P	K N S K R S S F P V	V A H I H G A E M	F G A A P Q N G H E	N V M R E G K F I L
151	161	171	181	191
V K I S Y R L G P L	G F A S T G D R D L	P G N Y G L K D Q R	L A L K W I K Q N I	A S F G G E P Q N V
201	211	221	231	241
L L V G H S A G G A	S V H L Q M L R E D	F G Q L A R A A F S	F S G N A L D P W V	I Q K G A R G R A F
251	261	271	281	291
E L G R N V G C E L	A K D S P S L K K C	L K T K P A S E L V	T A V R N F L K F S	Y V P F A P F S P V
301	311	321	331	341
L E T S D A P N P I	I T O D P G E G I K	S E R F D K V P W A	V S Y I P H D E G F	H A P L L L R G G N
351	361	371	381	391
P E T V T H D L D D	R W L E L A P Y L L	F Y R D K K T N K E	M D E Y T R K V R Q	Q Y I G N R S F G I
401	411	421	431	441
E S Y L Y M Q Q V F	T D V L E K N S T K	D S E D L H R K N G	K R P A H A R V Y D	N P A E K G I D Q D
451	461	471	481	491
L A K M H G R D E G	T H E D E Y F L I	F E N R V K E A K M	R K D E E I I W R N	F I K M L A D F A N
501	511	521	531	541
R E Q G M L E Y G G	C G F K N K V G S R	K V K V S E I D R R	G C X N R Q H V E F	P

1
2
3
4
5
6
7

Seleção positiva Seleção negativa (purificadora)

Figura 11. Resíduos de aminoácidos de *Z. indianus* sob diferentes pressões de seleção. Os círculos envolvem os aminoácidos do sítio catalítico da enzima.

IV. 3 Modelagem molecular

O alinhamento da esterase de *Z. indianus* com a lipase humana (**Apêndice B**) apresentou uma identidade superior a 30%, o que indica que essa estrutura é um bom molde para modelagem molecular. Deste modo, a estrutura tridimensional da lipase humana serviu de molde para a construção do modelo em *Z. indianus*. A qualidade geral do modelo, calculada pelo programa PROSA, resultou em Z-Score que está de acordo com os Z-Scores de todas as cadeias de proteínas atualmente depositadas no Protein Data Bank. A análise da qualidade geral do modelo molecular indica uma boa qualidade estereoquímica, adequada para análises e comparações, sem erros ou problemas na estrutura. Este resultado indica que o modelo obtido é compatível com sua sequência primária. A **figura 12** mostra os elementos da estrutura secundária da esterase de *Z. indianus*, o que a inclui na famílias das carboxil/colinesterases (superfamília das α/β hidrolases), uma das maiores e mais conhecidas famílias, que incluem várias esterases e lipases (**Apêndice C**). O sítio catalítico possui uma tríade catalítica (Ser194–His435–Asp320), que reside no fundo de uma profunda depressão superficial. A **figura 13** ilustra o potencial eletrostático de superfície, gerada pelo programa PYMOL (DELANO, 2004), essencial para a especificidade e afinidade da enzima ao substrato. A esterase modelada conserva as características estruturais presentes no sítio ativo da lipase humana, mas com diferenças dos laços na região interfacial do sítio ativo (**Figura 14 e 15**). O diagrama ϕ - ψ de Ramachandran (**Figura 16**) foi gerado pelo programa VADAR (WILLARD et al., 2003); a estrutura modelada da esterase indicou que 90,5% dos resíduos estão na região favorável e 7,5% na região adicionalmente favorável, o que indica uma estrutura de boa qualidade. Os resíduos que estão na região não permitida estão localizados em uma região de superfície, ou seja, estão em contato com o meio (solvente) ou em uma região intermediária entre o solvente e o sítio da proteína, por isso não comprometem a qualidade do modelo. Resíduos de superfície (expostos ao solvente), geralmente possuem maior flexibilidade de rotação do que resíduos enterrados na proteína, e não estão próximos o suficiente da região de sítio ativo para causarem choques estereoquímicos.



Figura 12: Representação esquemática em modelo *cartoon* da estrutura da esterase de *Z. indianus* indicando os elementos de estrutura secundária. Folhas β são mostradas como setas curvadas; α -hélices como fitas.

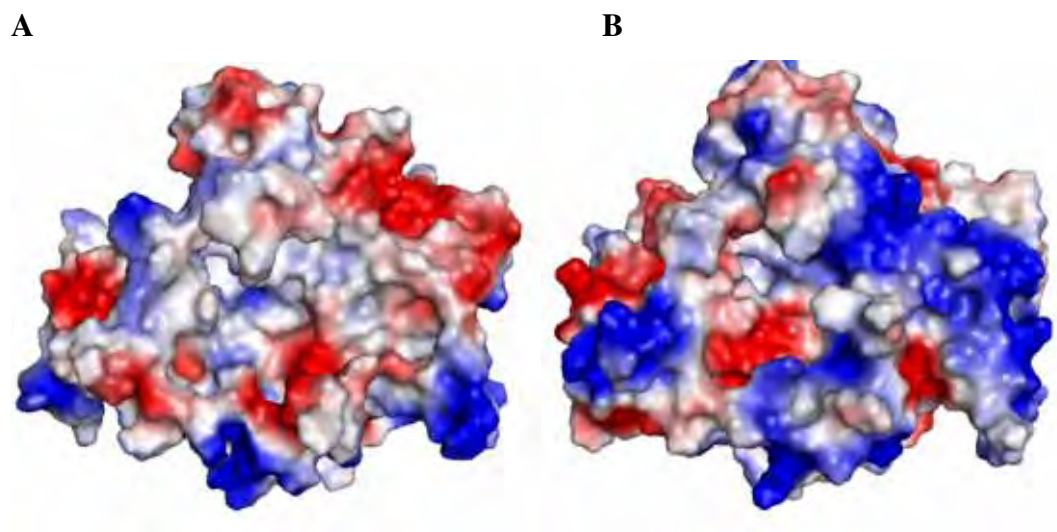


Figura 13: Representação da distribuição de carga superficial da enzima de *Z. indianus* (A) e lipase humana (B). A região em vermelho representa resíduos carregados com carga negativa, em azul com carga positiva e em branco os resíduos neutros.

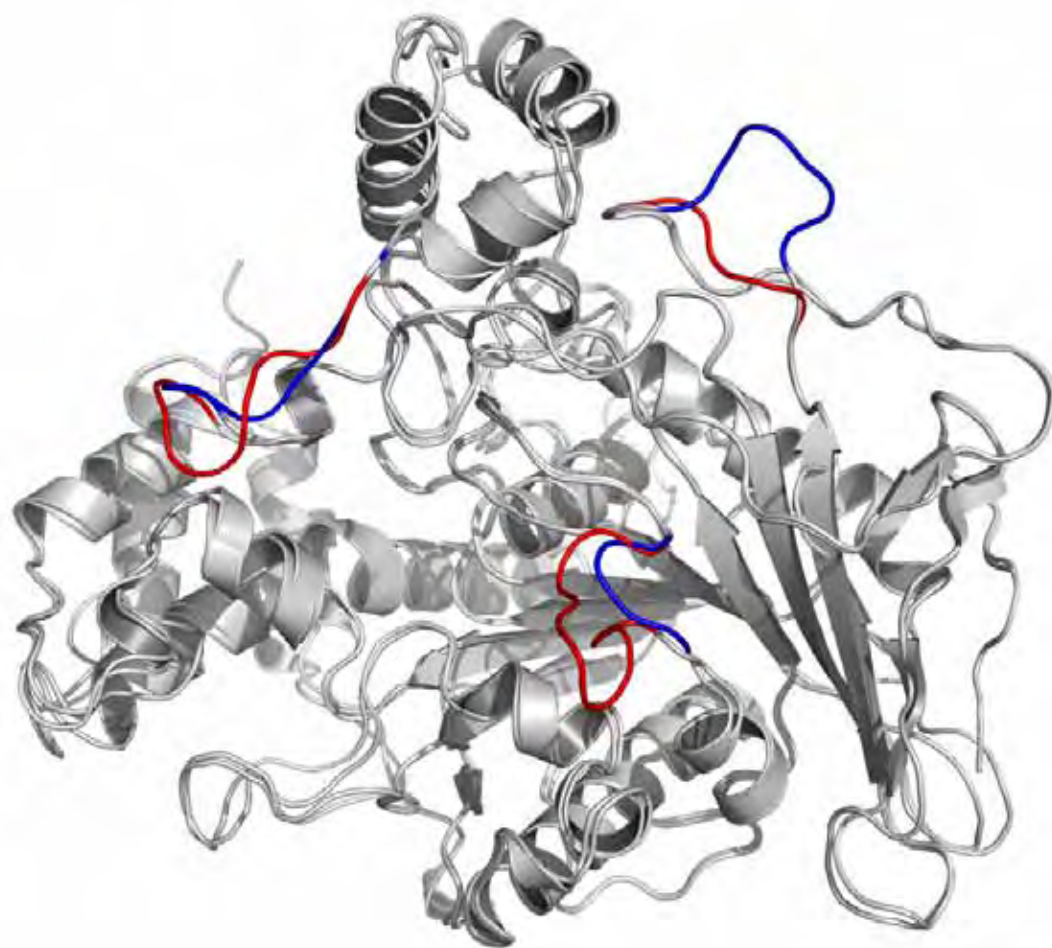


Figura 14: Sobreposição das estruturas de *Z. indianus* e lipase humana. As diferenças estruturais nos laços na região interfacial do sítio ativo estão representadas em azul e vermelho para *Z. indianus* e lipase humana, respectivamente.

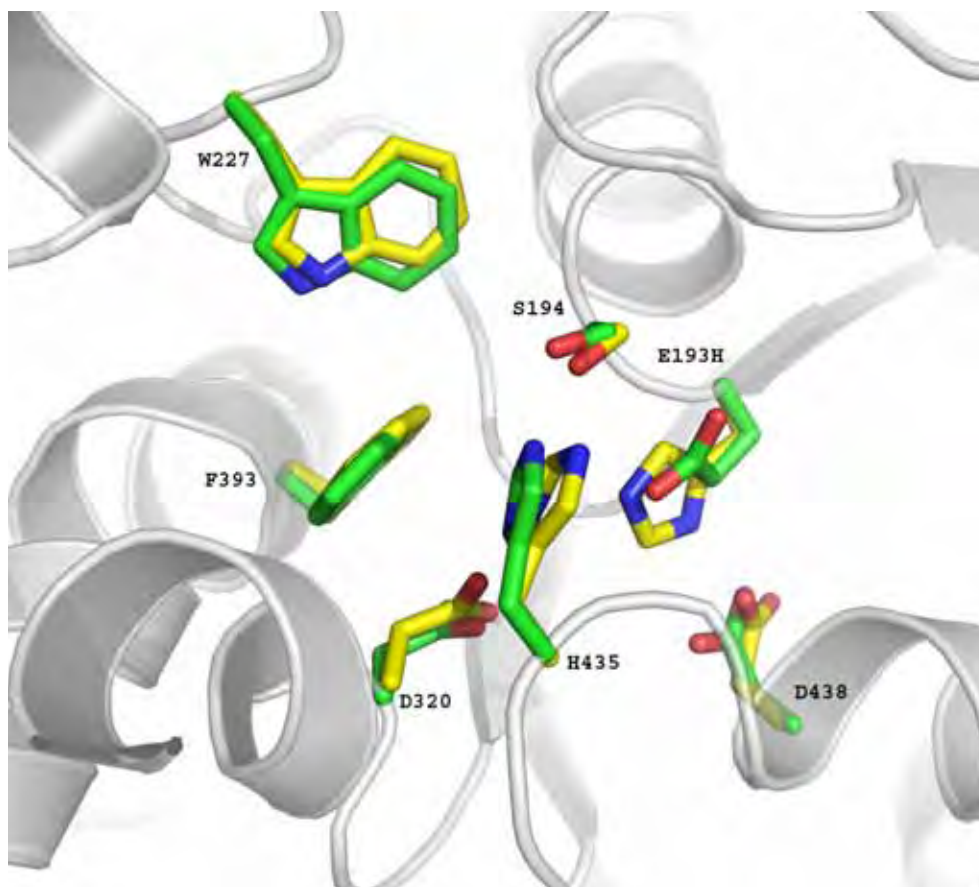


Figura 15: Sobreposição dos sítios ativos da estrutura modelada da esterase de *Z. indianus* e lipase ativada da bile humana. As ligações químicas estão representadas em formato *stick*. Os carbonos dos aminoácidos pertencentes a *Z. indianus* e lipase humana estão em amarelo e verde, respectivamente.

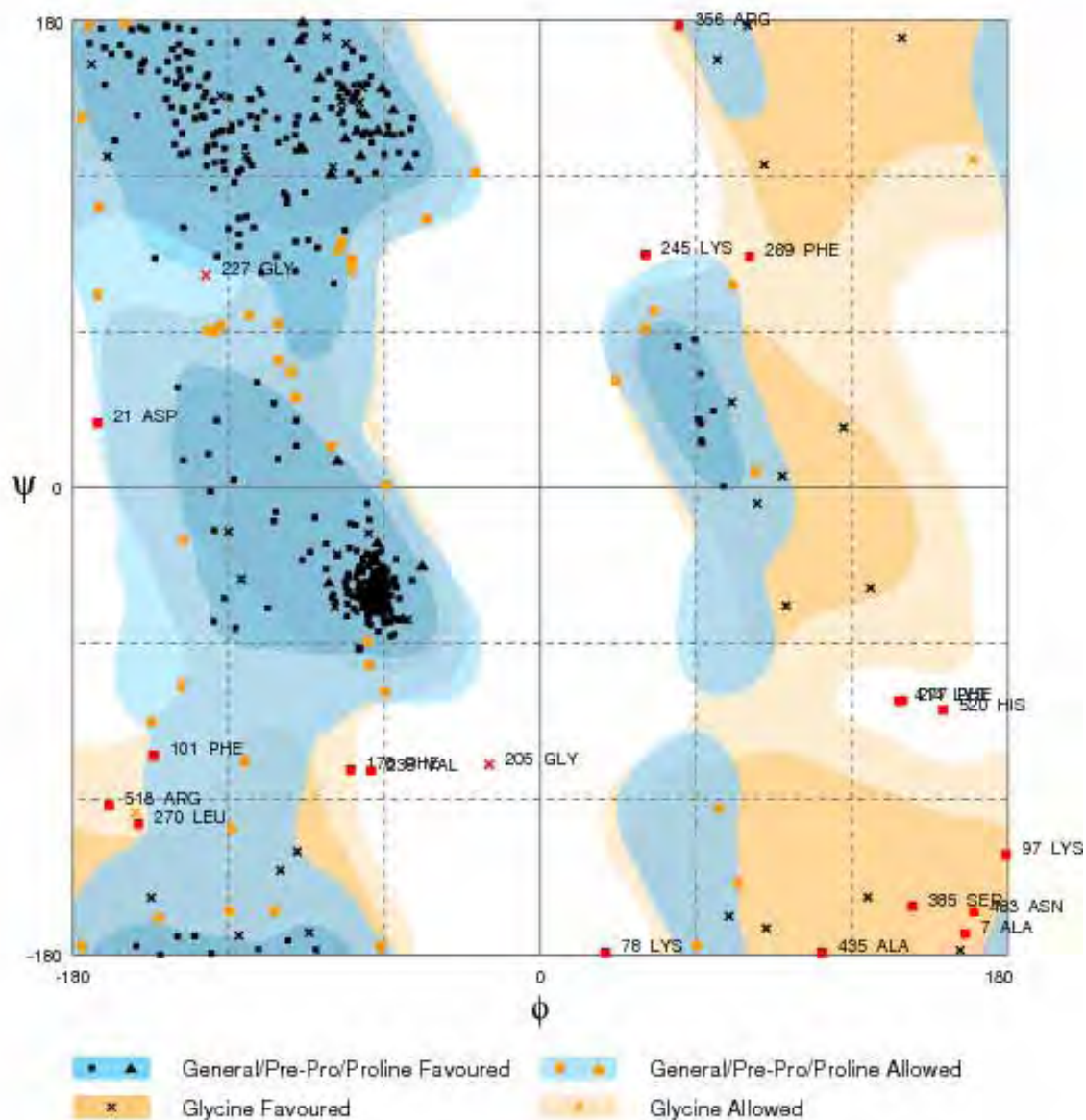


Figura 16: Diagrama de Ramachandran da estrutura modelada de *Z. indianus*.

Número de resíduos na região favorável: 90,5%; região permitida: 7,5%; não permitidas 2,0%.

V.1 Caracterização Bioquímica

As bandas esterásicas das espécies *Z. indianus* e *D. melanogaster* detectadas neste estudo foram classificadas com base nos dados de velocidade de migração no gel, preferência em relação ao substrato (α e β -naftil acetatos), expressão nos sexos, localização tecido-específica, idade-específica e quanto às fases do desenvolvimento. A distribuição das esterases em gel de poliacrilamida ocorre do pólo positivo para o pólo negativo, de forma decrescente, de forma que enzimas com carga negativa localizam-se perto do ânodo, enquanto enzimas com carga positiva ficam próximas do cátodo.

Já foi registrado um número variável de esterases em insetos por meio de eletroforese em géis de poliacrilamida e focalização isoelétrica. Em *D. duni*, CARRASCO et al. (1984) detectaram 6 bandas esterásicas atribuídas a 5 locos gênicos. Nas espécies *D. mulleri* e *D. arizonae* foram detectadas 20 bandas que foram atribuídas à presença de 12 locos (CERON, 1988). Em *Megaselia scalaris*, RITS (1997) detectou 45 bandas esterásicas determinadas por 20 locos gênicos. Em 10 espécies do grupo *saltans*, 51 bandas esterásicas foram detectadas (BERNARDO, 2007).

A linhagem de *Z. indianus* estudada apresentou seis locos diferentes, responsáveis pela produção de seis isoenzimas: EST-1, EST-2, EST-3, EST-4, EST-5 e EST-6. Os resultados apresentados neste trabalho estão de acordo com os obtidos por GALEGO et al. (2006). Entretanto, o estudo de PARKASH & YADAV (1993) referentes aos polimorfismos esterásicos com 20 populações indianas de *Z. indianus* revelou a existência de pelo menos sete locos esterásicos, denominados por eles de *Est-1*, *Est-2*, *Est-3*, *Est-4*, *Est-5*, *Est-6* e *Est-7*. As enzimas EST-1 e EST-2 foram classificadas como β -esterases enquanto EST-3, EST-4, EST-5, EST-6 e EST-7 foram classificadas como α -esterases. Esta distribuição e caracterização das esterases não são concordantes com os resultados obtidos por GALEGO et al. (2006) e pelo presente estudo nos seguintes aspectos: PARKASH & YADAV (1993) encontraram sete locos esterásicos para populações indianas; dois locos apresentando enzimas com padrão dimérico de esterases (EST-1 e EST-2); as duas β -esterases por eles descritas estão próximas uma da outra, sugerindo um peso molecular semelhante; três enzimas foram classificadas como colinesterases (EST-5, EST-6 e EST-7). No estudo de GALEGO et al. (2006) foram identificados seis locos esterásicos; nenhuma enzima foi encontrada como dímero; as β -esterases (EST-2 e EST-5) diferem entre si em pelo menos 100KDa; apenas uma enzima foi classificada como colinesterase (EST-4).

Os diferentes resultados obtidos foram explicados por GALEGO et al. (2006)

como decorrentes da origem das populações utilizadas nos trabalhos, das condições experimentais (PARKASH & YADAV, 1993 utilizaram géis de amido em seus estudos enquanto no presente trabalho foram utilizados géis de poliacrilamida, que permitem melhor caracterização do padrão de bandas esterásicas) ou ainda de que as espécies estudadas não sejam as mesmas, mas sim espécies crípticas, ocorrência comum entre espécies do gênero *Zaprionus* (TSACAS, 1988).

A EST-4 de *Z. indianus* foi classificada como uma colinesterase com base no padrão de inibição pelo sulfato de eserina (GALEGO et al. 2006). PAULINO & CERON (2005) observaram a inibição da EST-4 em presença de malathion, o que confirma a classificação desta enzima como acetilcolinesterase, que possui um padrão de migração similar a AChE de *D. melanogaster*. Como a sequência nucleotídica desta esterase em *D. melanogaster* já é conhecida, isso abre a possibilidade de comparação de homologia entre as enzimas de ambas as espécies.

Na linhagem de *D. melanogaster* utilizada neste trabalho foram observados ao todo sete locos esterásicos, responsáveis pelas isoenzimas que foram denominadas neste trabalho como EST-1, EST-2, EST-3, EST-4, EST-5, EST-6 e AChE. No estudo de HEALY et al. (1991), 22 esterases solúveis foram detectadas em géis de poliacrilamida provenientes de diferentes tecidos e estágios de vida. Pelo menos mais 7 esterases foram observadas por meio de focalização isoeletrica (CAMPBELL et al. 1992). Algumas esterases não foram identificadas, pois não hidrolisavam o substrato utilizado *in vitro* (naftil acetato) ou porque estavam intimamente relacionadas a membranas, necessitando assim de um tratamento com detergente para serem solubilizadas (HEALY et al. 1991). Deste modo, é provável que *D. melanogaster* possua mais de 40 esterases.

A classificação das esterases com base na hidrólise *in vitro* dos substratos α e β -naftil acetatos permite agrupá-las, de acordo com semelhanças na estrutura terciária e na sequência de aminoácidos destas enzimas (OAKESHOTT et al. 1993), em dois *clusters* principais: α -esterases e β -esterases. Em *Z. indianus*, EST-2 e EST-5 foram classificadas como β -esterases, enquanto EST-1, EST-3, EST-4 e EST-6 como α -esterases. Em *D. melanogaster*, apenas a EST-6 apresentou maior afinidade pelo β -naftil acetado, sendo classificada como uma β -esterase. As demais esterases (EST-1, EST-2, EST-3, EST-4, EST-5 e AChE) produziram bandas negras nos géis de poliacrilamida e foram classificadas como α -esterases.

As enzimas EST-2 e EST-5 de *Z. indianus* e EST-6 de *D. melanogaster* foram

classificadas como carboxilesterases pertencentes ao *cluster*- β . Além de apresentarem a mesma afinidade por substrato, estas três enzimas também possuem o mesmo padrão de inibição, divergindo apenas em relação ao peso molecular: 126KDa, 42KDa e 65KDa respectivamente de EST-5, EST-2 e EST-6 (GALEGO et al. 2006). A EST-2 é restrita aos machos, enquanto a EST-5 e a EST-6 possuem maior expressão nestes. Estas enzimas macho-específicas parecem estar relacionadas à biologia reprodutiva desses indivíduos, assim como já foi relatado em vários estudos sobre o papel da EST-6 (MANE et al. 1983; SHEEHAN et al. 1979; RICHMOND et al. 1991; GAME & OAKESHOTT, 1990). No presente estudo, amostras contendo aparelhos reprodutores masculinos de *Z. indianus* apresentaram forte marcação para β -esterases, quando submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida, sugerindo que a EST-2 e EST-5 sejam expressas em tecidos do aparelho reprodutor do mesmo modo como acontece com a EST-6 de *D. melanogaster* (MANE et al. 1983; SCOTT, 1986). A atividade dessas enzimas aumenta à medida que o macho adquire maturidade sexual, aproximadamente a partir do 6º dia de emergência, reforçando a teoria de participação dessas esterases macho-específicas em processos reprodutivos nestes animais.

O estudo da expressão enzimática em diferentes estágios do desenvolvimento tem sido utilizado para se conhecer os diversos mecanismos pelos quais os genes são temporariamente regulados. Neste estudo, foram comparadas esterases quanto à presença em larvas, pupas e adultos. Em *Z. indianus*, a EST-2 foi encontrada exclusivamente em adultos, reforçando a hipótese desta enzima estar envolvida na atividade reprodutiva da espécie. As demais enzimas foram encontradas em todos os estágios, algumas com expressão mais forte em determinada fase do desenvolvimento. Por exemplo, a EST-3 e a EST-5 apresentaram atividade maior em larvas e pupas enquanto a EST-6 apresentou atividade acentuada em pupas e adultos.

Em *D. melanogaster* foram detectadas duas esterases com expressão aumentada em pupas, classificadas aqui como EST-1 e EST-4. Como esperado, a EST-6, que participa em papéis reprodutivos na espécie, apresentou atividade acentuada em adultos, sendo detectada em larvas. A AChE, uma esterase presente no sistema nervoso de insetos, foi detectada em todos os estágios, mas com maior atividade em adultos. Neste trabalho não foi detectada nenhuma esterase exclusiva do estágio larval, como descrito por HEALY et al. (1991).

A presença ou ausência de determinada enzima em certa fase do desenvolvimento indica a atuação de mecanismos reguladores que permitem que o gene

correspondente se expresse ou não, desempenhando papel específico de acordo com a fase do desenvolvimento. No caso dos insetos holometábolos, onde a transição de um estágio para o outro está sob controle hormonal, pode-se sugerir uma relação entre esterases estágio-específicas e metamorfose. Esterases associadas aos níveis de hormônio juvenil foram propostas por diversos autores (BERGER & CANTER, 1973; KOROCHKIN & MTVEERA, 1974; RAUSCHENBACH et al. 1977; ZOUROS et al. 1982; CERON, 1988; MATEUS et al. 1996).

As análises bioquímicas apresentadas neste trabalho apontam a similaridade entre as esterases macho-específicas de *Z. indianus* e *D. melanogaster*; entretanto, não é concluir se a proteína seqüenciada corresponde à EST-2 ou a EST-5. Testes subseqüentes devem ser conduzidos para identificar a qual esterase corresponde o fragmento amplificado e seqüenciado de *Z. indianus*. Reações de RTPCR com o RNA total de larvas ou pupas de *Z. indianus* ou a síntese de anticorpos policlonais específicos produzidos contra a EST-6 purificada de *D. melanogaster* utilizados em ensaios de *Western blotting* com as esterases de *Z. indianus* são possibilidades para elucidar esta questão.

V.2 Caracterização Molecular

A diversidade das funções bioquímicas requerida pelos organismos multicelulares complexos foi alcançada através da evolução das famílias multigênicas. Um componente desse processo evolutivo é o aumento do número de cópias do gene através de eventos de duplicação. Algumas cópias de genes duplicados podem adquirir novas funções sem comprometer a função ancestral dos outros membros da família duplicada.

Mais de 50 genes responsáveis por esterases foram clonados, principalmente em vertebrados, insetos, fungos e bactérias. Exceto por algumas esterases bacterianas, a maioria das esterases de eucariotos aparenta ter evoluído de apenas um gene ancestral (OLLIS et al. 1992; CYGLER et al. 1992; CYGLER et al. 1993). No gênero *Drosophila* há uma grande semelhança entre os genes das β -esterases (OAKESHOTT et al. 1993), sendo que estes genes, na maioria das vezes, estão estreitamente ligados e orientados na mesma direção, reforçando a hipótese de que tenham surgido por duplicação gênica. Após uma duplicação gênica, um gene parálogo poderá adquirir nova função, ou mais comumente, poderá perder sua função e ser fixado como um alelo nulo (OHNO, 1970; NEI & ROYCHOUDHURY, 1973; BAILEY et al. 1978; OHTA, 1988; WALSH, 1995). O processo de não-funcionalização (ou pseudogenização) é relativamente rápido e normalmente ocorre nos primeiros milhões de anos após a duplicação

se o gene duplicado não estiver sob nenhum tipo de pressão seletiva (LYNCH & CONERY, 2000). O evento de duplicação que envolveu o gene ancestral da *Est-6* de *D. melanogaster* é um exemplo desse processo: enquanto *Est-6* manteve sua função esterásica, $\psi Est-6$ perdeu sua função codificante (BALAKIREV et al. 2005). Entretanto, existe uma interação no complexo *Est-6*/ $\psi Est-6$ (o que BALAKIREV et al. 2005, denominam de ‘intergene’): enquanto o gene é responsável por codificar a enzima (papel estrutural), o pseudogene estaria relacionado ao aumento da variação genética e regulação da expressão do gene ancestral e do gene *Est-6* (HEALY et al. 1996).

No presente estudo, o fragmento seqüenciado do DNA genômico de *Z. indianus*, amplificado pela técnica de PCR utilizando oligonucleotídeos iniciadores do gene *Est-6* de *D. melanogaster* pode pertencer ao gene(s) responsável(is) pela síntese de uma das β -esterases descritas (EST-2 e/ou EST-5). Com base nas semelhanças bioquímicas apresentadas pelas β -esterases, GALEGO et al. (2006) sugeriram que um evento de duplicação por recombinação desigual envolvendo a seqüência ancestral do gene *Est-5* pode ter originado o gene *Est-2*, de menor tamanho e de expressão restrita aos machos. Neste caso, o gene duplicado teria sido mantido na evolução da espécie. O modelo de subfuncionalização (ou duplicação-degeneração-complementação) assume que após o evento de duplicação ocorre um período de seleção relaxada, onde ambos os genes parálogos acumularam diferentes mutações (FORCE et al. 1999; STOLZFUS, 1999; LYNCH & FORCE, 2000). Desse modo, a nova cópia pode manter algumas das funções do gene ancestral e adquirir novas funções. O gene *Est-2* em *Z. indianus* poderia então ter sido modificado por mutações, mantendo alguma das funções originais e também adquirindo novas funções. A perda de função deste gene em fêmeas poderia ser atribuída a eventos de regulação gênica transcricionais ou pós-transcricionais. Assim, uma complexa relação, envolvendo seleção positiva, negativa e processos estocásticos, comum na divergência funcional de genes duplicados, pode ter levado a EST-2 a desempenhar funções diferentes em machos enquanto em fêmeas houve a perda de função.

BALAKIREV et al. (2003) estudaram o padrão de evolução molecular dos genes responsáveis pelo *cluster* β , incluindo a *Est-6*, em espécies do subgrupo *melanogaster*. Por meio de estimativas das taxas de substituições sinônimas e não-sinônimas, foi sugerido que a maioria dos sítios de *Est-6* está sob forte (48%) ou moderada (50%) seleção negativa e a minoria dos sítios (1,5%) está sob seleção positiva. Segundo os autores, os prováveis sítios sob seleção positiva estariam associados ao aumento de variabilidade intra-específica, como é

o caso do sítio responsável pelo polimorfismo da EST-6 nas aloenzimas F/S. Os autores ainda propõem que este mesmo sítio é responsável pela divergência funcional entre espécies do subgrupo *melanogaster*. A razão entre as substituições nucleotídicas sinônimas e não-sinônimas entre as seqüências de esterases de *D. melanogaster* e *Z. indianus* e entre as demais espécies, onde a razão d_N/d_S é menor que 1, sugerem uma proteína bem adaptada ao ambiente, na qual as substituições sinônimas (neutras) são as mais freqüentes e as não-sinônimas, menos freqüentes, indicam ocorrência de seleção normalizadora nas espécies.

A composição nucleotídica é muito similar em todas as espécies analisadas neste trabalho. A semelhança no conteúdo GC reforça que foi seqüenciado neste trabalho o gene ortólogo à *Est-6*. O exon I possui um conteúdo GC significativamente maior que o exon II, e ambos possuem um conteúdo maior que o intron. Entre todas as espécies, a maior diferença de conteúdo GC está na base que ocupa a terceira posição no códon. Genes ricos em G-C costumam ter uma maior significância transcricional e mitogênica do que genes ricos em A-T (BALAKIREV et al 2005). Normalmente nos genes ricos em GC, a seleção negativa elimina o excesso de mutações $GC \rightarrow AT$; entretanto, em pseudogenes ou seqüências não funcionais, esta eliminação não é eficiente, levando a um aumento no conteúdo AT. BALAKIREV et al (2005) sugeriram que a seleção ao nível traducional, mutações e recombinação são os principais fatores determinantes da composição de bases em *Drosophila* e evolução do conteúdo GC.

O alinhamento entre a provável seqüência de aminoácidos de *Z. indianus* e a EST-6 de *D. melanogaster* revelou uma identidade de 77% entre os 541 resíduos alinhados. O alinhamento realizado entre diversas seqüências homólogas à EST-6 revelou uma identidade que variou entre 66% e 98%. O sítio catalítico destas esterases é composto por um tripeptídeo não contíguo na seqüência primária, His-Asp-Ser (Cooke & OAKESHOTT, 1988; PEN et al. 1990; OAKESHOTT, 1993). Esta tríade é responsável pela reação hidrolítica, doando um próton para a ligação éster do substrato. Todas as enzimas apresentaram regiões conservadas circundando os aminoácidos que formam o sítio catalítico. A EST-6 de *D. melanogaster* possui três pontes dissulfeto; identificadas também pelo presente trabalho. A similaridade encontrada entre essas esterases também reforça ortologia entre seus genes codificadores.

Quando foi sugerido que tipo de modelo evolucionário atua individualmente nos aminoácidos da proteína de *Z. indianus*, um resultado diferente foi obtido daquele com a razão d_N/d_S . O teste aplicado sugere que 19% dos resíduos estariam sob seleção positiva enquanto os demais estariam sob seleção negativa ou neutra. O exon I está mais conservado,

18% de seus aminoácidos estariam sob seleção positiva, enquanto o exon II teria 27% dos seus aminoácidos sob seleção positiva. Este resultado é concordante com a composição GC destes exons e reforça teoria de que seqüências ricas em GC são funcionais e estariam sob seleção negativa. OAKESHOTT et al. (2001) detectaram uma acelerada mudança da seqüência da EST-6 dentro do subgrupo *D. melanogaster*. Estes autores atribuíram a aceleração à seleção positiva ou a um relaxamento na pressão seletiva, ou a uma mistura de ambos os eventos e estimaram que 11% dos sítios estariam sob seleção positiva.

Uma proteína contém regiões funcionalmente mais importantes (tal como o sítio ativo) e regiões menos importantes. De acordo com a teoria neutra (KIMURA, 1980), uma troca de aminoácido no sítio ativo poderá alterar a atividade enzimática; como a enzima está relativamente bem-adaptada, é provável que esta troca seja para pior, podendo até inativar a função enzimática. Em outras partes da molécula, o aminoácido que está ocupando uma posição poderá ter uma menor restrição funcional e uma troca poderá ser neutra ou quase neutra (OHTA, 1992). Portanto, a proporção de mutações que são neutras tende a ser menor em regiões funcionalmente importantes. Por outro lado, o modelo de evolução adaptativa de FISCHER (1930) prediz que trocas pequenas, com sintonia fina, têm maior probabilidade de melhorar a qualidade da adaptação do que trocas grandes. Moléculas biológicas estão satisfatoriamente bem-adaptadas, mas trocas de aminoácidos de tempos em tempos as mantêm atualizadas com as trocas ambientais. Mutações no sítio ativo de uma proteína tenderão a ter efeitos grandes, quase sempre prejudicando a atividade da proteína, enquanto que uma troca semelhante em regiões funcionalmente menos importantes (como regiões externas da enzima) poderá ter uma chance maior de levar a uma pequena melhoria de sintonia fina, sendo mantida por seleção. Desse modo, a seleção favorece, com maior freqüência, trocas nas regiões menos restritas das moléculas porque existe maior escopo para a sintonia fina nessas partes (RIDLEY, 2006). Logo, a combinação de uma seqüência de aminoácidos fixa (como a que ocorre flanqueando os sítios catalíticos da EST-6) e vários sítios silenciosos fornecem evidência de que a seleção natural está atuando e mantendo a estrutura da proteína, eliminando as mutações em sítios não-sinônimos, enquanto as trocas sinônimas evoluíram por deriva genética (LEWONTIN, 1989).

O estudo filogenético de BALAKIREV et al. (2005) com o subgrupo *melanogaster* dividiu as espécies em dois grupos: um grupo formado pelas espécies *D. melanogaster*, *D. simulans*, *D. mauritiana*, *D. sechellia* e outro formado por *D. yakuba*, *D. teissieri*, *D. erecta*, *D. orena*. Esta divisão coincide com a diferença na estrutura quaternária

da EST-6, que é um monômero no primeiro grupo e um homodímero no segundo grupo (OAKESHOTT et al. 1990; RICHMOND et al. 1990). A mudança na estrutura quaternária da enzima está associada a mudanças no padrão de expressão de *Est-6*. No primeiro grupo, o gene se expressa principalmente no ducto ejaculatório masculino e seu produto (EST-6) é transferido dos machos para as fêmeas no fluido seminal durante a cópula (RICHMOND et al. 1980), afetando o comportamento conseqüente da fêmea e sua receptividade aos outros machos (GROMKO et al. 1984). Entretanto, nas espécies do segundo grupo, o gene *Est-6* é principalmente expresso na hemolinfa e seu produto não está relacionado a funções reprodutivas (KOROCHKIN 1995). OAKESHOTT et al. 2001 sugeriram que mudanças em três sítios de aminoácidos são as responsáveis pela transição monômero-dímero na estrutura quaternária da enzima (Ile237 → Asn, Gly241 → Glu e Leu242 → Ser). Já o teste de Gu (1999) prediz que uma simples troca de aminoácido é a responsável pela divergência funcional da EST-6 (Asn237 → Asp).

O resultado da distância filogenética obtida pelo presente trabalho é concordante com as diferenças na estrutura quaternária das proteínas. As esterases macho-específicas de *Z. indianus* são monoméricas, portanto as menores distâncias, em relação à *Z. indianus*, estão entre as espécies *D. melanogaster*, *D. simulans*, *D. mauritiana*, *D. sechellia*

Com base nessa discussão, sugerimos que o gene seqüenciado de *Z. indianus* seja ortólogo a *Est-6*, compartilhando as características comuns aos demais membros da família multigênica das β -esterases, o que aproxima a seqüência do gene alvo desse estudo em *Z. indianus* ao da *Est-6* das espécies do grupo *melanogaster*. Análises subseqüentes são necessárias para o entendimento da possível duplicação que envolveu estes genes.

V. 3 Modelagem molecular

A superfamília das α/β hidrolases, ou linhagem α/β (OAKESHOTT et al. 1993), é caracterizada por agrupar enzimas que compartilham, na seqüência primária, os mesmos resíduos no centro catalítico (uma tríade não contígua, normalmente Ser-Asp-His) e um pentapeptídeo nucleofílico, responsável pelo acesso da tríade catalítica ao substrato. Muitas das esterase da superfamília das α/β hidrolases não apresentam similaridades em suas seqüências, exceto pela tríade catalítica e pelo pentapeptídeo nucleofílico. As enzimas deste grupo normalmente possuem subunidades entre 25 – 60KDa, e uma estrutura interna, chamada de *grande folha β* , que inclui pelo menos oito cadeias β , orientadas, com poucas exceções, na mesma direção, responsáveis por parte da ligação do substrato ao sítio ativo.

Alças entre as cadeias da grande folha β incluem um número variável de α -hélices, que, entre outras funções, contribuem para a proteção e estabilidade da grande folha β .

A superfamília das hidrolases é subdividida em seis grandes famílias; a família das carboxil/colinesterases, ou família multigênica das carboxil/colinesterases, é a maior e mais bem caracterizada destas famílias. Nesta família estão incluídas as lipases, colinesterases e carboxilesterases de fungos e eucariotos, além de todas as esterases de insetos (CYGLER et al. 1993).

Apesar da distância e divergência funcional entre a esterase de *Z. indianus* e a lipase humana, a modelagem realizada para estas enzimas revelou similaridades no seu sítio ativo, esperadas para enzimas da família das carboxil/colinesterase. As diferenças funcionais entre membros de uma mesma família protéica são, em geral, conseqüências de diferenças estruturais na superfície das proteínas. Essas diferenças provem de substituições, inserções, e eliminações de resíduos nas cadeias de proteínas homólogas, principalmente nas alças, regiões mais externas das proteínas. Por serem regiões onde ocorrem variações estruturais, as alças geralmente determinam a especificidade das proteínas, contribuindo para a formação conformacional dos sítios de ligação (no caso das enzimas, sítios ativos) (FISCHER et al. 2000). Devido a estas complicações, a modelagem das alças é a etapa mais difícil da predição de modelos de proteínas. Conseqüentemente, são nestas regiões que existem maiores probabilidades de ocorrência de erros na modelagem. A probabilidade de ocorrência de erros em um modelo de proteína construído pelo método da homologia é inversamente proporcional ao grau de identidade entre as seqüências utilizadas. Em geral, os erros não se distribuem igualmente por toda a proteína. (D'ALFONSO et al. 2001). Cada modelagem possui problemas particulares e deve ser fundamentada em princípios de evolução molecular para cada grupo específico de proteínas homólogas.

As regiões conservadas na estrutura geral das esterases da família das α/β hidrolases, mesmo entre enzimas com mínima similaridade de seqüências primárias, devem refletir, ainda que antiga, ancestralidade comum (OLLIS et al. 1992). Os dados obtidos com a modelagem reforçam os nossos resultados e sugerem uma relação próxima entre *Z. indianus* e as espécies do subgrupo *melanogaster*, o que reforça a proposição atual de que as espécies do gênero *Zaprionus* devam ser incluídas no gênero *Drosophila* (TATARENKOV, 1999; TARRÍO et al. 2001).

VI. Conclusão

O presente trabalho permitiu estabelecer as seguintes conclusões:

1. As enzimas EST-2 e EST-5 de *Z. indianus* são carboxilesterases pertencentes ao *cluster* β , a primeira com expressão restrita aos machos e a segunda com expressão aumentada nestes, com um possível papel na biologia reprodutiva da espécie. A expressão destas esterases macho-específicas aumenta com a idade e restringe-se ao corpo (aparelhos reprodutores masculinos), não sendo encontrada atividade enzimática na cabeça dos indivíduos;
2. O gene seqüenciado de *Z. indianus* provavelmente é ortólogo à *Est-6* de *D. melanogaster*;
3. A razão entre substituições nucleotídicas não-sinônimas e sinônimas (d_N/d_S) sugere uma proteína bem adaptada ao seu ambiente e sob ação de seleção normalizadora atuando na maioria de seus aminoácidos;
4. O alinhamento entre a provável seqüência de aminoácidos da esterase de *Z. indianus* e a EST-6 de espécies do grupo *melanogaster* mostrou resíduos invariáveis circundando o sítio catalítico das enzimas;
5. A modelagem molecular indicou que a estrutura catalítica do centro ativo da esterase de *Z. indianus* está conservada quando comparada a lipase humana.

VII. Referências Bibliográficas

- ARARIPE, L.O.; KLACZKO, L.B.; MORETEAU, B.; DAVID, J.R. Male sterility thresholds in a tropical cosmopolitan drosophilid, *Zaprionus indianus*. *J. Therm. Biol.* v.29, p.73-80, 2004.
- ARGENTINE, J.A.; JAMES, A.A. Characterization of a salivary gland-specific esterase in the vector mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Molec. Biol.* v.25, p.621-630, 1995.
- ASZODI, A.; TAYLOR, W.R. Homology modeling by distance geometry. *Fold. Des.*, v.1(5), p.325-334, 1996.
- BAILEY, G.S.; POULTER, R.T.M.; STOCKWELL, P.A. Gene duplication in tetraploid fish: model for gene silencing at unlinked duplicated loci. *Proc Natl Acad Sci*, v.75, p.5575–5579, 1978.
- BALAKIREV, E.S.; AYALA, F.J. Is esterase-P encoded by a cryptic pseudogene in *Drosophila melanogaster*? *Genetics* v.144, p.1511–1518, 1996.
- 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; AYALA F.J. Nucleotide variation of the *Est-6* gene region in natural populations of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, v.165, p.1901–1914, 2003.
- BALAKIREV, E.S.; CHECHETKIN, V.R.; LOBZIN, V.V.; AYALA, F.J. Entropy and GC Content in the {beta}-esterase Gene Cluster of the *Drosophila melanogaster* Subgroup. *Mol. Biol. Evol.*, v.22 (10), p.2063-2072, 2005.
- BENCHARIT, R.W.; MORTON, C.L.; HYATT, J.L.; JUN, P.; DANKS, M.K.; POTTER, P.M.; REDINBO, M.R. Crystal structure of human carboxylesterase 1 complexed with the Alzheimer's drug tacrine: from binding promiscuity to selective inhibition. *Chem. Biol.*, v.10, p.381-386, 2003.

BERGER, E.M.; CANTER, R. The esterase of *Drosophila*. I. The anodal esterases and their possible role in eclosion. *Develop. Biol.* v.33, p.48-55, 1973.

BERNARDO, A.A. Caracterização do padrão de esterases de espécies de *Drosophila* do grupo *saltans* (Subgênero *Sophophora*) e sua aplicação ao estudo da filogenia e à identificação de espécies. Tese de Doutorado, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas-Universidade Estadual Paulista, campus de São José do Rio Preto-SP, 2007.

BLUNDELL, T.L. Knowledge based prediction of protein structures and the design of novel molecules. *Nature*, v.326(611), p.347-352, 1987.

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(6), 1990.

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.

CAMPBELL, P.M.; HEALY, M.J.; OAKESHOTT, J.G. Characterisation of juvenile hormone in *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, v.22, p.655-677, 1992.

CARRASCO, C.E.; PEREZ-CHIESA, Y.; BRUCK, D. "The esterases of *Drosophila dunni*" *Comp. Biochem. Physiol.* v.79, p.375-378 , 1984.

CARVALHO, V.M.; MARQUES, R.M.; LAPENTA, A.S. Functional classification of esterases from leaves of *Aspidosperma polyneuron* M. Arg. (Apocynaceae). *Genet. and Mol. Biol.* v.26, p.195-198, 2003.

CERON, C.R. Padrão de esterases no desenvolvimento de *Drosophila mulleri*, *D. arizonensis* e seus híbridos. Ph.D. Thesis (Biological Sciences – Genetics), p.28-33, 1988.

CERON, C.R.; dos 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(1), p.201-203, 1992.

- CHAKRABORTI, S., MICHAEL, J.R., GURTNER, G.H, GHOSH, S.S., DUTTA, G. A role of a membrane-associated serine esterase in the oxidant activation of phospholipase A2 by t-butyl hydroperoxide. *Biochem. J.*, v.292, p.585-589, 1993.
- CHASSAGNARD, M.T., TSACAS, L. Le sous-genre *Zaprionus* S. Str. Définition de groupes d'espèces et révision du sous-groupe vittiger (Diptera: Drosophilidae). *Annales de la Société Entomologique de France* v.29: p.173-194, 1993.
- CHO, Y.G., EUN, M.Y., KIM, Y.K., CHUNG, T.Y. The semidwarf gene, sd-1, of rice (*Oryza sativa* L.). Linkage with the esterase locus, Est-2. *Theor. Appl. Genetic*, v.89, p.49-53, 1994.
- COLLET, C., NIELSEN, K.M., RUSSELL, R.J., KARL, M., OAKESHOTT, J.G., RICHMOND, R.C. Molecular analysis of duplicated esterase genes in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Biol. Evol.* v.7, p.9-28, 1990.
- COOK, P. H.; OAKESHOTT, J. G. Amino-acid polymorphisms for esterase-6 in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Nat. Acad. Sci*, v.86(4), p.1426-1430, 1988.
- CYGLER, M.; SCHCRAG, J.D.; ERGAN, F. Advances in structural of understanding of lipases . *Biotech. Genet. Eng. Rev.* v.10, p.143-184, 1992.
- CYGLER, M.; SCHCRAG, J.D.; SUSSMAN, J.C.; HAREL, M.; SILMAN, I.; GENTRY, K.M.; DOCTOR, B.P. Relationship between sequence conservation and three dimensional structure in a large family of esterases , lipases and related proteins. *Prot. Sci.*, v. 17, p.1-22, 1993.
- D'ALFONSO, G.; TRAMONTANO, A.; LAHM, A. Structural conservation in single-domain proteins implications for homology modeling. *J. Struct. Biol.*, v.134(2-3), p.246-256, 2001.
- DANIELS, S.B.; STRAUSBAUGH, L.D. The distribution of P element sequences in *Drosophila*: the *willistoni* and *saltans* species groups. *J. Mol. Evol.*, v.23(2), p.138-148, 1986.

DELANO, W.L. The case for open source software in drug discovery. *Drug Discov. Today*, v.10(3), p.213-217, 2005.

EISENBERG, D.; LUTHY, R.; BOWIE, J. U. VEFY3D: assessment of protein models with threedimensional profiles. *Methods Enzymol.* v.277 p.396–404, 1997.

FISCHER, D. Hybrid fold recognition: combining sequence derived properties with evolutionary information. *Pac. Symp. Biocomput.*, p.119-30, 2000.

FISCHER, R.A. The genetical theory of natural selection. *Oxford University Press*, 1930.

FISER, A.; SALI, A. Modeller: generation and refinement of homology-based protein struture models. *Methods Enzymol.* v.374, p.461–491, 2003.

FORCE, A.; LYNCH, M.; PICKETT, F.B.; AMORES, A.; YAN, Y.L.; POSTLETHWAIT, J. Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations. *Genetics* v.151, p.1531–1545, 1999.

GALEGO L.G; CERON C.R; CARARETO, C.M. Characterization of esterases in a Brazilian population of *Zaprionus indianus* (Diptera: Drosophilidae). *Genetica*, v.126(1-2), p.89-99, 2006.

GAME, A.Y.; OAKESHOTT, J.G. Associations between restriction site polymorphism and enzyme activity variation for esterase 6 in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, v.126, p.1021–1031, 1990.

GIBAS, C.; JAMBECK, P. Desenvolvendo Bioinformática: Ferramentas de software para aplicações em Biologia. Rio de Janeiro, Ed. Campus, 2001.

GLYNN, P. Neuropathy target esterase and phospholipid deacylation. *Biochem. Et Biophys. Acta*, v.1736, p.87-93, 2005.

- GÓMEZ, G.A.; HASSON, E. Transpecific polymorphisms in an inversion linked esterase locus in *Drosophila buzzatti*. *Mol. Biol. and Evol.*, v.20(3), p.410-423, 2003.
- GROMKO, M.H.; GILBERT, D.F.; RICHMOND, R.C. Sperm transfer and use in the multiple mating system of *Drosophila*. In: SMITH, R.L. (ed) Sperm competition and the evolution of animal mating systems. *Academic Press*, p.371–426, 1984.
- GU, X., ZERA, A.J. Developmental profiles and characteristics of hemolymph juvenile hormone esterase, general esterase and juvenile hormone binding in the cricket, *Gryllus assimilis*. *Comp Biochem. Physiol. B Comp. Biochem. Mol. Biol.*, v.107(4), p.553-560, 1994.
- GU, X. Statistical methods for testing functional divergence after gene duplication. *Mol Biol Evol* v.16, p.1664–1674, 1999.
- 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.
- HALL, T.A. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98NT. *Nucl. Acid. Symp. Ser.*, v.41, p.95-98, 1999.
- HEALY, M.J.; DUMANCIC, M.M.; OAKESHOT, J.G. Biochemical and physiological studies of soluble esterases from *Drosophila melanogaster*. *Biochem. Genet.* v.29, p. 365-388, 1991.
- HEALY, M.J.; DUMANCIC, M.M.; CAO, A.; OAKESHOTT, J.G. Localization of sequences regulating ancestral and acquired sites of esterase 6 activity in *Drosophila melanogaster*. *Mol Biol Evol*, v.13, p.784–797, 1996.
- HEINEMANN, U. Structural genomics in Europe: slow start, strong finish? *Nat. Struct. Bio.*, v.7, p.940-942, 2000.

HOSKINS, R.A.; CARLSON, J.W.; KENNEDY, C.; ACEVEDO, D.; EVANS-HOLM, M.; FRISE, E.; WAN, K.H.; PARK, S.; MENDEZ-LAGO, M.; ROSSI, F.; VILLASANTE, A.; DIMITRI, P.; KARPEN, G.H.; CELNIKER, S.E. Sequence Finishing and Mapping of *Drosophila melanogaster* Heterochromatin. *Science*, v.316 (5831), p.1625-1628, 2007.

JOHNSON, M.S. Knowledge based protein modeling. *Crit. Rev. Biochem.*, v.29, p.1-68, 1994.

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

KARAN, D.; MORIN, J.P.; GRAVOT, E.; MORETEAU, B.; DAVID, J.R. Body size reaction norms in *Drosophila melanogaster*: temporal stability and genetic architecture in a natural population. *Genet. Sel. Evol.* v.31, p.491-508, 1999.

KERLIN, R.L.; HUGHES, S. Enzymes in saliva from four parasitic arthropods. *Med. Ved. Entom.*, v.6, p.121-126, 1992.

KETHIDI, D.R.; XI, Z., PALLIS, S.R. Developmental and hormonal regulation of juvenile hormone esterase gene in *D. melanogaster*. *J. Insect Physiol.* v.51, p.393-400, 2005.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. M. Evol.*, v.16(2), p.111-120, 1980.

KOROCHKIN, L.I.; MATVEEVA, N.M. Genetics of esterases in *Drosophila* of the virilis group. II. Sequential expression of paternal and maternal esterases in ontogenesis. *Biochem Genet.*, v.12(1), p.1-7, 1974.

KOROCHKIN, L.; LUDWIG, M.; YENIKOLOPOV, G.N.; TAMARINA, N.A.; KHECHUMYAN, R.K.; USPENSKY, M.; KOPANTZEVA, M. Molecular genetic mechanisms of tissue-specific esterase isozymes and protein expression. *Isozymes* v.22, p.114-154, 1990.

- KOROCHKIN, L.I. Cloning, expression, and regulation of tissue-specific genes in *Drosophila*. *Genetika*, v.31, p.1029–1042, 1995.
- KORT, C.A.D., GRANGER, N.A. Regulation of juvenile hormone titer. *Annu. Rev. Entomol.*, v.26, p. 1-28, 1981.
- 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(95), p.107, 1998.
- LEWONTIN, R.C. Inferring the number of evolutionary events from DNA coding sequence differences. *Mol Biol Evol.*, v.6(1), p.15-32, 1989.
- 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(3-4), p.69-84, 2004.
- LODGE, D.M. Biological invasions: lessons for ecology. *Trends in ecology and evolution*, v.8(3), p.133-137, 1993.
- LYNCH, M.; CONERY, J.S. The evolutionary fate and consequences of duplicate genes. *Science*, v.290, p.1151–1155, 2000.
- LYNCH, M.; FORCE, A. The probability of duplicate gene preservation by subfunctionalization. *Genetics*, v.154, p.459–473, 2000.
- MAGGIO, E.T.; RAMNARAYAN, K. Recent developments in computational proteomics. *Trends Biotechnol*, v.19(7), p.266-272, 2001
- MANE, S.D.; TEPPER C.S.; RICHMOND R.C. Studies of esterase 6 in *Drosophila melanogaster*. *Biochem. Genet.*, v.21(9-10), p.1019-1040, 1983.

MARTI-RENOM, M.A.; STUART, A.; FISER, A.; SÁNCHEZ, R.; MELO, F.; SALI, A. Comparative protein structure modeling of genes and genomes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, v.29, p.291-325, 2000.

MATEUS, R.P.; BICUDO, H.E.M.C.; CERON, C. R. Caracterização da esterase larval em diversas espécies de *Drosophila* do complexo *mulleri* (grupo *repleta*). *Bras. J. Genet.* v.19(Suppl.), p.263, 1996.

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.

NEI, M.; GOJOBORI, T. Simple methods for estimating the number of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitution. *Mol. biol. evol.*, v.3, p.418-426, 1986.

NEI, M.; ROYCHOUDHURY, A.K. Probability of fixation of nonfunctional genes at duplicate loci. *Am Nat*, v.107, p.362-372, 1973.

NISHIKAWA, J., LIZUKA, H. Numerical taxonomy of *Monascus* species based on the electrophoretic analysis of intracellular enzymes. *J. Basic Microbiol.*, v.33, n.5, p.331-342, 1993.

NORVELL, J.C.; MACHALEK, A.Z. Structural genomics programs at the US National Institute of General Sciences. *Nat. Struct. Biol.*, v.7, p. 931, 2000.

OAKESHOTT, J.G.; van PAPENRECHT, E.A.; CLAUDIANOS, C.; MORRISH, B.C. An episode of accelerated amino acid change in *Drosophila* esterase 6 associated with a change in physiological function. Não publicado.

OAKESHOTT, J.G.; HEALY, M.J.; GAME, A.Y. Regulatory evolution of the β carboxyl esterases in *Drosophila*. In: BARKER J.S.F.; STARMER, W.T.; Macintyre, R.J. (eds) Ecological and evolutionary genetics of *Drosophila*. *Plenum Press*, p.359–387,1990.

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.

OAKESHOTT, J.G.; van PAPENRECHT, E.A.; CLAUDIANOS, C.; MORRISH, B.C.; COPPIN, C.; ODGERS, W.A. An episode of accelerated amino acid change in *Drosophila* esterase-6 associated with a change in physiological function. *Genetica*, v.110, p.231–244, 2001.

OHNO, S. Evolution by gene duplication. *Springer-Verlag*, 1970.

OHTA, T. Further simulation studies on evolution by gene duplication. *Evolution*, v.42, p.375–386, 1988.

OHTA, T. The nearly neutral theory of molecular evolution. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, v.23, p.263-268, 1992.

OLLIS, D.L.E.; CHEAH, M.; CYGLER, B.; DIJKSTRA, F.; FROLOW, S.M.; FRANKEN, M.; HAREL, S.J.; REMINGTON, I.; SILMAN, J.; SCARAG, J.L.; SUSSMAN K.H.G.; VERSCHUEREN & A. GOLDMAN. The hydrolase fold. Protein; *Eng.*, v.5, p.197-211, 1992.

PARKASH, R; YADAV, J. P. Geographical clinal variation at seven esterase encoding loci in Indian populations of *Zaprionus indianus*. *Hereditas*, v.119, p.161-173, 1993.

PAULINO, R. M.; CERON, C. R. Análise das esterases macho-específicas de *Drosophila melanogaster* e *Zaprionus indianus*. CD- rom do 51º Congresso Brasileiro de Genética, Águas de Lindóia, 2005.

PEN, J.; BOLKS, G.J.; HOEKSEMA-DU PUI, M.L.; BEINTEMA, J.J. Serine esterases: structural conservation during animal evolution and variability in enzymatic properties in the genus *Drosophila*. *Genetica*, v.81(2), p.125-31, 1990.

RAMACHANDRAN, G.N.; RAMAKRISHNAN, C.; SASISEKHARAN, V. Stereochemistry of polypeptide chain configurations. *J. Mol. Biol.*, v 7, p.95-99, 1963.

RAMAKRISHNAN, C.; RAMACHANDRAN, G.N. Stereochemical Criteria for Polypeptide and Protein Chain Conformations. *Biophysical J.*, v.5, p.909-933, 1965.

RAUSCHENBACH, I.Y.; GOLOSHEIKINA, L.B.; KOROCHKINA, L.S.; KOROCHKIN, L.I. Genetics of esterases in *Drosophila* V. Characteristics of the "pupal" esterase in *D. virilis*. *Biochem Genet.*, v.15(5-6), p.531-48, 1977.

RICHMOND, R.C.; GILBERT, D.G.; SHEEHAN, K.B.; GROMKO, M.H.; BUTTERWORTH, F.M. Esterase 6 and reproduction in *Drosophila melanogaster*. *Science*, v.207, p.1483–1485, 1980.

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

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.

RIDLEY, M. *Evolução*, 3ª edição, p.186-221, 2006.

RITZ, F.R.C. Padrão de esterases em *Megaselia scalaris*, Tese de Doutorado, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas-Universidade Estadual Paulista, câmpus de São José do Rio Preto, SP, p.128, 1997.

ROBE, L.J.; VALENTE, V.L.; BUDNIK, M.; LORETO, E.L. Molecular phylogeny of the subgenus *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) with an emphasis on Neotropical species and groups: A nuclear versus mitochondrial gene approach. *Mol. Phylogenet. Evol.* v.36 (3), p.623-640, 2005.

ROBERT, S. Structural genomics, round 2 “As NIH plans to extend its high-speed structural biology program for another 5 years, researches remain divided on how to best allocate its shrinking budget”. *Science*, v.307, p.1554-1557, 2005.

ROBIN, G.C.; RUSSELL, R.J.; CUTLER, D.J.; OAKESHOTT, J.G. The evolution of an alpha-esterase pseudogene inactivated in the *Drosophila melanogaster* lineage. *Mol Biol Evol.*, v.7(4), p.563-75, 2000.

ROZAS, J.; SÁNCHEZ-DELBARRIO, J.C.; MESSEGUER, X; ROZAS, R. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, v.19, p.2496-2497, 2003.

ROZEN, S.; SKALETSKY, H.J. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: KRAWETZ, S.; MISENER, S. (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, p.365-386, 2000.

RUIZ, G.M.; RAWLINGS, T.K.; DOBBS, F.C.; DRAKE, L.K.A.; MULLADDY, T.; HUG, A.; COLWELL, R.R. Global spread of microorganisms by ships. *Nature*, v.408 (6808), p 49-50, 2000.

SALI, A.; BLUNDELL, T.L. Comparative protein modeling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.*, v.234, p.779-815, 1993.

SANTOS FILHO, O.A.; DE ALENCASTRO, R.B.; FIGUEROA-VILLAR, J.D. Homology modeling of wild type and pyrimethamine/cycloguanil –cross resistant mutant type *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase. *Biophys. Chem.*, v.91, p. 305-317, 2001.

SCOTT, D. Sexual mimicry regulates the attractiveness of mated *Drosophila melanogaster* females. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, v.83(21), p.8429-8433, 1986.

SERGEEV, P.V.; PANIN, V.M; PAVLOVA, G.V.; KOPANTSEVA, M.R.; SHOSTAK, N. G.; BASHKIROV, V.N.; GEORGIEV, G.P.; KOROCHKIN, L.I. The expression of esterase S gene of *Drosophila virilis* in *Drosophila melanogaster*. *FEBS Letters*, v.360, p.194-196, 1995.

SEUNG, S-H.; WOO,S.-O.; CHUN, T.; SUH, D.-S. Submetido em 12-JUN-2003.

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

SHIMADA, Y.; NAGAO, T.; SUGIHARA A.; IIZUMI, T.; YUI, T.; NAKAMURA, K.; FUKASE, T.; TOMINAGA, Y. Cloning and sequence analysis of an esterase gene from *Pseudomonas* sp. KWI-56. *Biochem. Biophys. Acta*, v.1174, p.79-82, 1993.

SOUZA FILHO, M.F.; DE PRESTES, D.A.O.; SATO, M.E.; RAGA, A. Host plants of *Zaprionus indianus* in the State of São Paulo, Brazil. International Congress of Entomology, 21. Embrapa Soja, v.I, p.294, 2000.

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

SREERAMA, L.; VEERABHADRAPPA, P.S. Purification and properties of carboxylesterases from the mid-gut of the termite *Odontotermis worini*. *Insect. Biochem.*, v.21(8), p.833-844, 1991.

SRINIVASAN, S.; MARCH, C.J; SUDARSANAM, S. An automated method for modeling of proteins on known templates using distance geometry. *Protein sci.*, v.2 , p.227-289, 1993.

- STEIN, C.P. Mosca do figo *Zaprionus indianus*. IAC- Boletim eletrônico (<http://www.iac.br/~cenfit/artigos/zaprionus/index/htm>), 2000.
- STERN, A.; DORON-FAIGENBOIM, A.; EREZ, E.; MARTZ, E.; BACHARACH, E.; PUPKO, T. Selecton 2007: advanced models for detecting positive and purifying selection using a Bayesian inference approach. *Nucleic Acids Research*. v.35, p.506-511, 2007.
- STOCK, J.E.; GOLOSHCHAPOV, A.; SONG, C.; WHEELLOCK, C.E.; DERBEL, M.B.; MORISSEAU, C.; HAMMOCK, B.D. Related investigation of the role of a second conserved serine em carboxylesterases via site directed mutagenesis. *Arch. Biochem. Biophys.*, v.430, p.247-255, 2004.
- STOLTZFUS, A. On the possibility of constructive neutral evolution. *J. Mol. Evol.*, v.49, p.169–181, 1999.
- SWOFFORD, D. Paup: Phylogenetic analysis using parcimony. Version 4.0b10. *Smithsonian Institution*, 1997.
- TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, v.24, p.1596-1599, 2007.
- TARRÍO, R.; RODRÍGUEZ-TRELLES, F.; AYALA, F. Shared nucleotide composition biases among species and their impact on phylogenetic reconstructions of the Drosophilidae *Mol. Biol. Evol.*, v.18, p.1464-1473, 2001.
- TATARENKOV, A.; KWIATOWSKI, J.; SKARECKY, D.; BARRIO, E.; AYALA, F.J. On the evolution of *Dopa decarboxylase* (Ddc) and *Drosophila* systematics. *J. Mol. Evol.*, v.48, p.445-462, 1999.
- TEIXEIRA, A.S.; CHAVES, L.S.; YUYAMA, K. Esterases no exame da estrutura populacional de Camu-camu (*Myrciaria dubia* (Kunth) Mc Vaugh-Myrtaceae). *Acta Amazônica*, v.34, p.89-96, 2004.

- TERZIAN, S.; WANG, C.S.; DOWNS, D.; HUNTER, B.; ZHANG, X.C. Crystal structure of the catalytic domain of human bile salt activated lipase. *Protein Science*, v. 9, p.1783–1790, 2000.
- TERWILLIGER, T.C. Structural genomics in North America. *Nat. Struct. Bio.*, v.7, p.935-939, 2000.
- TIDON, R.; LEITE, D.F.; LEÃO, B.F.D. Impact of the colonisation of *Zaprionus* (diptera, drosophilidae) in different ecosystems of the Neotropical Region: 2 years after the invasion. *Bioc.*, v.112 (3), p.299-305, 2003.
- TORP PETERSEN, F.; MEIER, R.; NARAYANAN KUTTY, S.; WIEGMANN, B.M. The phylogeny and evolution of host choice in the Hippoboscoidea (Diptera) as reconstructed using four molecular markers. *Mol. Phylogenet. Evol.* v.45 (1), p.111-122, 2007.
- TSACAS, L.; LACHAISE, D.; DAVID, J.R. Composition and biogeography of the Afrotropical drosophilid fauna. Ashburner, M., Carson, H.L., Thompson Jr., J.N. (Eds.), *The Genetics and Biology of Drosophila*, Academic Press, v.3A, p.197-200, 1981.
- TSACAS, L. Une nouvelle classification du sous-genre *Zaprionus* s. str. Et mise en evidence de deux morphoclines. *Rapp. D'Activ.*, LGBE, Gif 1985–1987: 56-57, 1988.
- VEUILLE, M.; KING, L.M. Molecular basis of polymorphism at the esterase-5B locus in *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics*, v.141 (1), p.255-262, 1995.
- VILELLA, C.R. Is *Zaprionus indianus* Gupta, 1970 (Diptera: Drosophilidae) currently colonizing the Neotropical region? *Drosophila Inf. Serv.*, v.82, 1999.
- VILELA, C.R.; TEIXEIRA, E.P.; STEIN, C.P. Mosca africana do figo, *Zaprionus indianus* (Diptera: Drosophilidae). In: VILELA, E.; ZUCCHI, R.^a; CANTOR, F. *Histórico e impacto das pragas introduzidas no Brasil*. Ed. Holos, São Paulo, p.48-52, 2000.

WALSH, J. How often do duplicated genes evolve new functions? *Genetics*, v.139, p.421–428, 1995.

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.

WIEDERSTEIN, M.; SIPPL, M.J. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Research*, v.35, p.407-410, 2007.

WILLARD, L.; RANJAN, A.; ZHANG, H.; MONZAVI, H.; BOYKO, R.F.; SYKES, B.D.; WISHART, D.S. VADAR: a web server for quantitative evaluation of protein structure quality. *Nucleic Acids Research*, v. 31(13), p. 3316-3319, 2003.

YANG, Z.; NIELSEN, R.; GOLDMAN, N.; PEDERSEN, A.M. Codon-substitution models for heterogeneous selection pressure at amino acid sites. *Genetics*, v.155, p.431-449, 2000.

YASSIN, A.; ARARIPE, L.O.; CAPY, P.; DA LAGE, J.-L.; KLACZKO, L.-B.; MAISONHAUTE, C.; OGGEREAU, D.; DAVID, J.R. Phylogeny of the genus *Zaprionus* (Diptera: Drosophilidae). Não publicado.

YASSIN, A.; CAPY, P.; MADI-RAVAZZI, L.; OGGEREAU, D.; DAVID, J.R. Mitochondrial DNA discovers two cryptic species and two independent geographic radiations in the invasive drosophilid *Zaprionus indianus*. Não publicado.

YOKOYAMA, S. Structural genomics projects in Japan. *Nat. Struct. Bio.*, v.7, p.943-945, 2000.

ZERA, A.J., HOLTMEIER, C.L. In vivo and in vitro degradation of juvenile hormone-III in a presumptive long-winged and shrt-winged *Gryllus rubens*. *J. Insect Physiol.*, v.38(1), p.61-74, 1992.

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.

PAULINO, R.M. Sequenciamento de uma esterase macho - específica em *Zaprionus indianus*. São José do Rio Preto, 2008. 80p. Dissertação (Mestrado em Genética) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Zaprionus indianus (Diptera:Drosophilidae) é uma espécie provavelmente de origem africana e que rapidamente se dispersou por parte do continente sul-americano. Hoje, indivíduos dessa espécie são encontrados numa amplitude latitudinal de 35°, do Uruguai a Belém (Brasil). Em *Z. indianus* e nos demais insetos, as esterases constituem um grupo multifuncional e heterogêneo de enzimas que participam da hidrólise de ésteres, além de estarem relacionadas a diversos processos metabólicos. Neste estudo, foram realizadas análises de esterases de *Z. indianus* e *Drosophila melanogaster*, em géis de poliacrilamida (PAGE) a 10% de concentração, em indivíduos dos dois sexos e em diferentes fases do desenvolvimento. Os resultados indicaram que algumas carboxilesterases (respectivamente EST-2 e EST-5 de *Z. indianus* e EST-6 *D. melanogaster*) apresentam atividade acentuada em machos. Estas enzimas mostraram similaridades nas duas espécies, tais como o mesmo padrão de inibição, expressão principalmente no estágio adulto e aumento da atividade enzimática com o aumento da idade dos indivíduos. As similaridades bioquímicas entre as enzimas dos dois drosofilídeos sugerem ortologia entre seus genes codificadores. Foram então realizadas reações de PCR, utilizando oligonucleotídeos iniciadores desenhados com base na sequência do gene *Est-6* de *D. melanogaster* e o DNA genômico de *Z. indianus*. O fragmento amplificado foi sequenciado, com composição GC de 48,5% e similaridade de 73% com a sequência do gene de *Est-6* de *D. melanogaster*. A análise da razão das substituições sinônimas e não sinônimas sugere uma proteína sob ação de seleção normalizadora, onde as trocas sinônimas são em sua maioria neutras e as não sinônimas, na maioria das vezes deletérias, foram eliminadas pela seleção natural. A modelagem molecular indicou que a estrutura catalítica fundamental está conservada na esterase de *Z. indianus* e na lipase humana, que foi utilizada como molde na modelagem. As comparações bioquímicas e estruturais sugerem um parentesco evolucionário próximo entre *Z. indianus* e as espécies do grupo *melanogaster*.

Palavras-chave: *Zaprionus indianus*, esterase macho – específica, esterase-6, *Drosophila melanogaster*.

PAULINO, R.M. Sequenciamento de uma esterase macho - específica em *Zaprionus indianus*. São José do Rio Preto, 2008. 80p. Dissertação (Mestrado em Genética) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Zaprionus indianus has expanded its geographical distribution since its recent invasion of the South American continent. The first record data of only eight years, and the origin is probably the South Africa. Nowadays, this species can be found in a latitudinal range of 35°, from Uruguay to Belem (Brazil). Esterases comprise a multi-functional and heterogeneous group of enzymes that participated in ester hydrolysis. In insects, they are related to several metabolic processes, including the reproductive function. Esterase patterns in *Z. indianus* and *Drosophila melanogaster* were characterized in polyacrylamide gels (PAGE). Two β -esterases from *Z. indianus*, EST-2 and EST-5, showed similarity preference for substrate β -naftil acetate and patterns of inhibition as compared to the EST-6 of *D. melanogaster*, suggesting a possible role in reproductive biology for both enzymes. Biochemical characterization of these esterases and its differential expression in males, suggest orthology among their genes. In this work, the genomic DNA from *Z. indianus* was submitted to PCR experiments using 3 sets of *D. melanogaster Est-6* sequence primers. The PCR products were directly sequenced; its GC content was 48.5% and presented a 73% similarity compared to *Est-6 D. melanogaster* sequence. Analysis of sequence data, by estimates of nonsynonymous/synonymous rate ratios, showed that the majority of sites evolves under strong or moderate negative selection (81%) and a minority of sites (19%). is under significant positive selection. Molecular modeling indicates that the fundamental structural features important for catalysis are conserved in the esterase of *Z. indianus* and human bile-salt activated lipase (BAL), which was used as structural model. Structural and sequence comparisons suggest the evolutionary relationship between esterases of *Z. indianus* e the species of *melanogaster* group.

Key words: *Zaprionus indianus*, male esterase, esterase-6, *Drosophila melanogaster*.

Apêndice A. Tabela de razões d_N/d_S para cada aminoácido da sequência de *Z. indianus*.

Posição	Aminoácido	d_N/d_S	Intervalo de confiança				
1 - 18 Peptídeo sinal				85	Q	0.29	[0.041, 0.69]
19	R	0.7	[0.088, 3.1]	86	W	0.42	[0.041, 3.1]
20	A	0.5	[0.088, 3.1]	87	D	0.12	[0.0092, 0.46]
21	S	0.63	[0.088, 3.1]	88	Q	0.33	[0.041, 0.69]
22	D	0.88	[0.15, 3.1]	89	F	0.15	[0.0092, 0.69]
23	D	0.44	[0.088, 0.69]	90	T	0.39	[0.041, 0.69]
24	A	0.8	[0.088, 3.1]	91	P	3	[0.69, 3.1]
25	L	0.36	[0.041, 0.69]	92	G	3	[0.69, 3.1]
26	L	0.15	[0.0092, 0.69]	93	D	1.7	[0.15, 3.1]
27	V	0.3	[0.041, 0.69]	94	C	1.1	[0.23, 3.1]
28	N	1.4	[0.23, 3.1]	95	K	1.3	[0.15, 3.1]
29	L	0.16	[0.0092, 0.69]	96	W	0.47	[0.041, 3.1]
30	P	0.15	[0.0092, 0.69]	97	V	0.73	[0.088, 3.1]
31	Q	1.2	[0.23, 3.1]	98	G	0.38	[0.041, 0.69]
32	G	0.42	[0.041, 0.69]	99	E	2.6	[0.32, 3.1]
33	K	0.36	[0.041, 0.69]	100	E	0.44	[0.041, 3.1]
34	L	0.17	[0.0092, 0.69]	101	D	0.18	[0.0092, 0.69]
35	R	0.62	[0.088, 3.1]	102	C	0.17	[0.0092, 0.69]
36	G	0.73	[0.15, 3.1]	103	L	0.16	[0.0092, 0.69]
37	R	0.37	[0.041, 0.69]	104	T	1.1	[0.15, 3.1]
38	D	0.48	[0.088, 0.69]	105	V	0.13	[0.0092, 0.46]
39	N	0.2	[0.0092, 0.69]	106	S	0.32	[0.041, 0.69]
40	G	0.16	[0.0092, 0.69]	107	I	2.8	[0.46, 3.1]
41	R	0.81	[0.15, 3.1]	108	Y	0.76	[0.15, 3.1]
42	Y	0.36	[0.041, 0.69]	109	K	2.3	[0.32, 3.1]
43	Y	1.7	[0.23, 3.1]	110	P	0.35	[0.041, 0.69]
44	S	0.39	[0.041, 0.69]	111	K	0.37	[0.041, 0.69]
45	Y	0.37	[0.041, 0.69]	112	N	0.13	[0.0092, 0.46]
46	E	0.15	[0.0092, 0.69]	113	S	0.33	[0.041, 0.69]
47	S	0.69	[0.15, 3.1]	114	K	0.94	[0.15, 3.1]
48	M	0.7	[0.088, 3.1]	115	R	0.16	[0.0092, 0.69]
49	P	0.15	[0.0092, 0.69]	116	S	1.4	[0.23, 3.1]
50	Y	0.15	[0.0092, 0.69]	117	S	0.35	[0.041, 0.69]
51	A	0.13	[0.0092, 0.46]	118	F	0.33	[0.041, 0.69]
52	E	0.62	[0.088, 3.1]	119	P	0.15	[0.0092, 0.69]
53	P	0.16	[0.0092, 0.69]	120	V	0.13	[0.0092, 0.46]
54	P	0.16	[0.0092, 0.69]	121	V	0.13	[0.0092, 0.46]
55	V	3.1	[3.1, 3.1] *	122	A	0.14	[0.0092, 0.69]
56	G	0.23	[0.0092, 0.69]	123	H	0.31	[0.041, 0.69]
57	D	0.18	[0.0092, 0.69]	124	I	0.13	[0.0092, 0.46]
58	L	0.61	[0.041, 3.1]	125	H	0.13	[0.0092, 0.46]
59	R	0.42	[0.041, 0.69]	126	G	0.16	[0.0092, 0.69]
60	C	2.2	[0.23, 3.1]	127	G	0.16	[0.0092, 0.69]
61	E	0.88	[0.15, 3.1]	128	A	0.14	[0.0092, 0.69]
62	A	0.35	[0.041, 0.69]	129	F	0.15	[0.0092, 0.69]
63	P	0.35	[0.041, 0.69]	130	M	0.11	[0.0092, 0.46]
64	D	1.5	[0.23, 3.1]	131	F	0.15	[0.0092, 0.69]
65	P	0.39	[0.041, 0.69]	132	G	0.15	[0.0092, 0.69]
66	Y	0.15	[0.0092, 0.69]	133	A	0.37	[0.041, 0.69]
67	K	0.16	[0.0092, 0.69]	134	A	0.15	[0.0092, 0.69]
68	Q	0.34	[0.041, 0.69]	135	P	3.1	[3.1, 3.1] *
69	A	3	[3.1, 3.1] *	136	Q	0.35	[0.041, 0.69]
70	W	0.35	[0.041, 0.69]	137	N	0.13	[0.0092, 0.46]
71	A	3.1	[3.1, 3.1] *	138	G	0.16	[0.0092, 0.69]
72	D	0.62	[0.15, 3.1]	139	H	0.13	[0.0092, 0.46]
73	T	0.7	[0.088, 3.1]	140	E	0.15	[0.0092, 0.69]
74	F	0.37	[0.041, 0.69]	141	N	0.13	[0.0092, 0.46]
75	E	0.44	[0.088, 0.69]	142	V	0.41	[0.041, 3.1]
76	A	0.34	[0.041, 0.69]	143	M	0.11	[0.0092, 0.46]
77	T	0.78	[0.15, 3.1]	144	R	0.15	[0.0092, 0.69]
78	S	3	[3.1, 3.1] *	145	E	0.14	[0.0092, 0.69]
79	S	1.8	[0.23, 3.1]	146	G	0.15	[0.0092, 0.69]
80	P	0.35	[0.041, 0.69]	147	K	0.35	[0.041, 0.69]
81	V	0.13	[0.0092, 0.46]	148	F	0.37	[0.041, 0.69]
82	G	3.1	[3.1, 3.1] *	149	I	0.13	[0.0092, 0.46]
83	C	0.17	[0.0092, 0.69]	150	L	0.15	[0.0092, 0.69]
84	P	0.74	[0.088, 3.1]	151	V	0.32	[0.041, 0.69]

152	K	0.15	[0.0092,0.69]	227	A	0.13	[0.0092,0.46]
153	I	0.14	[0.0092,0.69]	228	A	0.15	[0.0092,0.69]
154	S	0.14	[0.0092,0.69]	229	F	0.38	[0.041,0.69]
155	Y	0.15	[0.0092,0.69]	230	S	0.99	[0.15,3.1]
156	R	0.16	[0.0092,0.69]	231	F	0.15	[0.0092,0.69]
157	L	0.15	[0.0092,0.69]	232	S	0.14	[0.0092,0.69]
158	G	0.16	[0.0092,0.69]	233	G	0.16	[0.0092,0.69]
159	P	0.16	[0.0092,0.69]	234	N	0.13	[0.0092,0.46]
160	L	0.16	[0.0092,0.69]	235	A	0.2	[0.0092,0.69]
161	G	0.15	[0.0092,0.69]	236	L	0.16	[0.0092,0.69]
162	F	0.15	[0.0092,0.69]	237	D	0.12	[0.0092,0.46]
163	A	0.61	[0.088,3.1]	238	P	0.16	[0.0092,0.69]
164	S	0.14	[0.0092,0.69]	239	W	0.15	[0.0092,0.69]
165	T	0.17	[0.0092,0.69]	240	V	0.14	[0.0092,0.69]
166	G	0.86	[0.088,3.1]	241	I	1.1	[0.15,3.1]
167	D	0.12	[0.0092,0.46]	242	Q	0.12	[0.0092,0.46]
168	R	2.9	[0.46,3.1]	243	K	2.4	[0.32,3.1]
169	D	0.12	[0.0092,0.46]	244	G	0.16	[0.0092,0.69]
170	L	0.15	[0.0092,0.69]	245	A	1	[0.15,3.1]
171	P	1.2	[0.15,3.1]	246	R	0.81	[0.041,3.1]
172	G	0.16	[0.0092,0.69]	247	G	1.1	[0.15,3.1]
173	N	0.13	[0.0092,0.46]	248	R	0.17	[0.0092,0.69]
174	Y	0.34	[0.041,0.69]	249	A	0.14	[0.0092,0.69]
175	G	0.16	[0.0092,0.69]	250	F	0.15	[0.0092,0.69]
176	L	0.15	[0.0092,0.69]	251	E	0.15	[0.0092,0.69]
177	K	0.16	[0.0092,0.69]	252	L	0.15	[0.0092,0.69]
178	D	0.12	[0.0092,0.46]	253	G	0.16	[0.0092,0.69]
179	Q	0.13	[0.0092,0.46]	254	R	0.16	[0.0092,0.69]
180	R	0.16	[0.0092,0.69]	255	N	2.4	[0.32,3.1]
181	L	0.15	[0.0092,0.69]	256	V	0.13	[0.0092,0.46]
182	A	0.14	[0.0092,0.69]	257	G	0.16	[0.0092,0.69]
183	L	0.15	[0.0092,0.69]	258	C	0.17	[0.0092,0.69]
184	K	2	[0.23,3.1]	259	E	0.82	[0.041,3.1]
185	W	0.15	[0.0092,0.69]	260	L	2.9	[0.69,3.1]
186	I	0.13	[0.0092,0.46]	261	A	0.8	[0.088,3.1]
187	K	2.2	[0.15,3.1]	262	K	2.9	[0.69,3.1]
188	Q	0.29	[0.041,0.69]	263	D	0.28	[0.041,0.69]
189	N	0.13	[0.0092,0.46]	264	S	0.89	[0.15,3.1]
190	I	0.14	[0.0092,0.69]	265	P	1.6	[0.23,3.1]
191	A	0.14	[0.0092,0.69]	266	S	0.33	[0.041,0.69]
192	S	0.34	[0.041,0.69]	267	L	0.15	[0.0092,0.69]
193	F	0.15	[0.0092,0.69]	268	K	0.16	[0.0092,0.69]
194	G	0.15	[0.0092,0.69]	269	K	0.16	[0.0092,0.69]
195	G	0.16	[0.0092,0.69]	270	C	0.38	[0.041,0.69]
196	E	0.15	[0.0092,0.69]	271	L	0.16	[0.0092,0.69]
197	P	0.15	[0.0092,0.69]	272	K	0.16	[0.0092,0.69]
198	Q	1.1	[0.088,3.1]	273	T	1.1	[0.15,3.1]
199	N	0.13	[0.0092,0.46]	274	K	0.15	[0.0092,0.69]
200	V	2.9	[0.69,3.1]	275	P	0.92	[0.15,3.1]
201	L	0.37	[0.041,0.69]	276	A	0.14	[0.0092,0.69]
202	L	0.39	[0.041,0.69]	277	S	0.31	[0.041,0.69]
203	V	2.4	[0.32,3.1]	278	E	0.34	[0.041,0.69]
204	G	0.15	[0.0092,0.69]	279	L	0.77	[0.041,3.1]
205	H	1.1	[0.15,3.1]	280	V	0.14	[0.0092,0.69]
206	S	0.69	[0.15,3.1]	281	T	0.79	[0.15,3.1]
207	A	0.14	[0.0092,0.69]	282	A	0.34	[0.041,0.69]
208	G	0.16	[0.0092,0.69]	283	V	0.34	[0.041,0.69]
209	G	0.16	[0.0092,0.69]	284	R	0.48	[0.041,3.1]
210	A	0.36	[0.041,0.69]	285	N	0.34	[0.041,0.69]
211	S	0.99	[0.15,3.1]	286	F	0.36	[0.041,0.69]
212	V	0.14	[0.0092,0.69]	287	L	0.37	[0.041,0.69]
213	H	0.13	[0.0092,0.46]	288	K	1.2	[0.15,3.1]
214	L	0.15	[0.0092,0.69]	289	F	0.15	[0.0092,0.69]
215	Q	0.12	[0.0092,0.46]	290	S	2.9	[0.69,3.1]
216	M	0.27	[0.041,0.69]	291	Y	0.58	[0.088,3.1]
217	L	0.15	[0.0092,0.69]	292	V	0.32	[0.041,0.69]
218	R	0.15	[0.0092,0.69]	293	P	0.15	[0.0092,0.69]
219	E	0.15	[0.0092,0.69]	294	F	0.15	[0.0092,0.69]
220	D	0.12	[0.0092,0.46]	295	A	0.35	[0.041,0.69]
221	F	0.15	[0.0092,0.69]	296	P	0.16	[0.0092,0.69]
222	G	0.37	[0.041,0.69]	297	F	0.34	[0.041,0.69]
223	Q	0.31	[0.041,0.69]	298	S	1.8	[0.15,3.1]
224	L	0.15	[0.0092,0.69]	299	P	0.15	[0.0092,0.69]
225	A	0.14	[0.0092,0.69]	300	V	0.14	[0.0092,0.69]
226	R	2.7	[0.46,3.1]	301	L	0.44	[0.041,3.1]

302	E	0.35	[0.041,0.69]	377	T	0.17	[0.0092,0.69]
303	T	2.5	[0.32,3.1]	378	N	0.78	[0.088,3.1]
304	S	2.9	[0.69,3.1]	379	K	0.36	[0.041,0.69]
305	D	0.3	[0.041,0.69]	380	E	0.27	[0.041,0.69]
306	A	0.53	[0.041,3.1]	381	M	0.26	[0.041,0.69]
307	P	0.16	[0.0092,0.69]	382	D	0.12	[0.0092,0.46]
308	N	1.7	[0.23,3.1]	383	E	0.27	[0.041,0.69]
309	P	0.34	[0.041,0.69]	384	Y	0.15	[0.0092,0.69]
310	I	1.4	[0.23,3.1]	385	T	0.43	[0.041,0.69]
311	I	3	[3.1,3.1]*	386	R	0.16	[0.0092,0.69]
312	T	0.38	[0.041,0.69]	387	K	1.6	[0.15,3.1]
313	Q	0.12	[0.0092,0.46]	388	V	2.8	[0.46,3.1]
314	D	3	[0.69,3.1]	389	R	2	[0.088,3.1]
315	P	0.15	[0.0092,0.69]	390	Q	0.29	[0.041,0.69]
316	G	3	[3.1,3.1]*	391	Q	1.9	[0.23,3.1]
317	E	0.46	[0.088,3.1]	392	Y	0.15	[0.0092,0.69]
318	G	0.91	[0.15,3.1]	393	I	3	[0.69,3.1]
319	I	0.13	[0.0092,0.46]	394	G	0.16	[0.0092,0.69]
320	K	0.16	[0.0092,0.69]	395	N	0.33	[0.041,0.69]
321	S	0.14	[0.0092,0.69]	396	R	0.58	[0.041,3.1]
322	E	0.45	[0.041,3.1]	397	S	3	[3.1,3.1]*
323	R	0.83	[0.088,3.1]	398	F	0.15	[0.0092,0.69]
324	F	0.15	[0.0092,0.69]	399	G	2.9	[0.69,3.1]
325	D	0.79	[0.088,3.1]	400	I	1.8	[0.15,3.1]
326	K	0.47	[0.088,0.69]	401	E	0.15	[0.0092,0.69]
327	V	0.14	[0.0092,0.69]	402	S	0.14	[0.0092,0.69]
328	P	0.15	[0.0092,0.69]	403	Y	0.15	[0.0092,0.69]
329	W	0.15	[0.0092,0.69]	404	L	2.5	[0.32,3.1]
330	A	0.2	[0.0092,0.69]	405	Y	0.55	[0.088,3.1]
331	V	0.14	[0.0092,0.69]	406	M	0.33	[0.041,0.69]
332	S	1	[0.15,3.1]	407	Q	0.12	[0.0092,0.46]
333	Y	0.15	[0.0092,0.69]	408	Q	1.6	[0.15,3.1]
334	I	2	[0.23,3.1]	409	V	0.67	[0.088,3.1]
335	P	0.41	[0.041,0.69]	410	F	0.15	[0.0092,0.69]
336	E	0.14	[0.0092,0.69]	411	T	0.16	[0.0092,0.69]
337	D	0.34	[0.041,0.69]	412	D	0.27	[0.041,0.69]
338	G	0.15	[0.0092,0.69]	413	V	0.93	[0.15,3.1]
339	G	0.15	[0.0092,0.69]	414	L	0.16	[0.0092,0.69]
340	F	0.37	[0.041,0.69]	415	F	0.15	[0.0092,0.69]
341	H	0.32	[0.041,0.69]	416	K	0.15	[0.0092,0.69]
342	A	0.14	[0.0092,0.69]	417	N	0.13	[0.0092,0.46]
343	P	0.34	[0.041,0.69]	418	S	0.14	[0.0092,0.69]
344	L	0.15	[0.0092,0.69]	419	T	0.16	[0.0092,0.69]
345	L	0.15	[0.0092,0.69]	420	K	0.53	[0.088,3.1]
346	L	0.48	[0.041,3.1]	421	D	1.8	[0.23,3.1]
347	R	3.1	[3.1,3.1]*	422	S	0.32	[0.041,0.69]
348	G	2.6	[0.46,3.1]	423	E	0.56	[0.088,3.1]
349	G	2	[0.23,3.1]	424	D	0.12	[0.0092,0.46]
350	N	1.3	[0.23,3.1]	425	L	0.16	[0.0092,0.69]
351	P	1.7	[0.23,3.1]	426	H	0.3	[0.041,0.69]
352	E	1.1	[0.15,3.1]	427	R	0.15	[0.0092,0.69]
353	T	3.1	[3.1,3.1]*	428	K	0.16	[0.0092,0.69]
354	V	2.5	[0.32,3.1]	429	N	0.62	[0.088,3.1]
355	T	0.34	[0.041,0.69]	430	G	0.16	[0.0092,0.69]
356	H	2.7	[0.46,3.1]	431	K	0.15	[0.0092,0.69]
357	D	0.12	[0.0092,0.46]	432	R	0.33	[0.041,0.69]
358	L	0.16	[0.0092,0.69]	433	P	0.15	[0.0092,0.69]
359	N	0.3	[0.041,0.69]	434	A	0.34	[0.041,0.69]
360	D	0.28	[0.041,0.69]	435	H	0.34	[0.041,0.69]
361	R	0.15	[0.0092,0.69]	436	A	0.34	[0.041,0.69]
362	W	0.15	[0.0092,0.69]	437	R	2.1	[0.32,3.1]
363	L	1	[0.15,3.1]	438	V	0.13	[0.0092,0.46]
364	E	0.36	[0.041,0.69]	439	Y	0.15	[0.0092,0.69]
365	L	0.56	[0.041,3.1]	440	D	0.12	[0.0092,0.46]
366	A	0.15	[0.0092,0.69]	441	N	0.13	[0.0092,0.46]
367	P	0.16	[0.0092,0.69]	442	P	0.16	[0.0092,0.69]
368	Y	0.15	[0.0092,0.69]	443	A	0.13	[0.0092,0.46]
369	L	0.4	[0.041,0.69]	444	E	1.8	[0.23,3.1]
370	L	0.16	[0.0092,0.69]	445	K	3.1	[3.1,3.1]*
371	F	0.35	[0.041,0.69]	446	G	0.16	[0.0092,0.69]
372	Y	0.15	[0.0092,0.69]	447	I	0.14	[0.0092,0.69]
373	R	0.16	[0.0092,0.69]	448	D	0.91	[0.15,3.1]
374	D	0.12	[0.0092,0.46]	449	Q	0.31	[0.041,0.69]
375	K	0.39	[0.041,0.69]	450	D	2	[0.23,3.1]
376	K	0.55	[0.041,3.1]	451	L	0.15	[0.0092,0.69]

452	A	2.5	[0.32, 3.1]	498	F	0.15	[0.0092, 0.69]
453	K	0.52	[0.088, 3.1]	499	A	0.34	[0.041, 0.69]
454	M	0.8	[0.088, 3.1]	500	N	2.8	[0.46, 3.1]
455	H	3	[3.1, 3.1]*	501	R	0.33	[0.041, 0.69]
456	G	0.67	[0.088, 3.1]	502	E	0.45	[0.088, 0.69]
457	R	2.3	[0.32, 3.1]	503	Q	2.8	[0.46, 3.1]
458	D	0.64	[0.088, 3.1]	504	G	0.16	[0.0092, 0.69]
459	F	0.15	[0.0092, 0.69]	505	M	3.1	[3.1, 3.1]*
460	G	0.15	[0.0092, 0.69]	506	L	0.16	[0.0092, 0.69]
461	T	0.16	[0.0092, 0.69]	507	E	1.7	[0.23, 3.1]
462	V	0.13	[0.0092, 0.46]	508	Y	0.34	[0.041, 0.69]
463	H	0.3	[0.041, 0.69]	509	G	0.15	[0.0092, 0.69]
464	G	0.15	[0.0092, 0.69]	510	G	2.5	[0.32, 3.1]
465	D	0.12	[0.0092, 0.46]	511	C	0.17	[0.0092, 0.69]
466	E	0.28	[0.041, 0.69]	512	G	2.4	[0.32, 3.1]
467	Y	0.15	[0.0092, 0.69]	513	F	0.15	[0.0092, 0.69]
468	F	0.77	[0.088, 3.1]	514	K	0.37	[0.041, 0.69]
469	L	0.33	[0.041, 0.69]	515	N	0.46	[0.088, 0.69]
470	I	0.47	[0.088, 0.69]	516	K	0.29	[0.041, 0.69]
471	F	0.35	[0.041, 0.69]	517	V	0.13	[0.0092, 0.46]
472	E	0.15	[0.0092, 0.69]	518	G	0.16	[0.0092, 0.69]
473	N	0.13	[0.0092, 0.46]	519	S	0.14	[0.0092, 0.69]
474	R	3.1	[3.1, 3.1]*	520	R	2.9	[0.69, 3.1]
475	V	0.14	[0.0092, 0.69]	521	K	0.16	[0.0092, 0.69]
476	K	0.96	[0.088, 3.1]	522	V	1	[0.15, 3.1]
477	E	2.4	[0.32, 3.1]	523	K	0.64	[0.088, 3.1]
478	A	3	[0.69, 3.1]	524	V	0.35	[0.041, 0.69]
479	K	1.6	[0.23, 3.1]	525	S	0.81	[0.15, 3.1]
480	M	0.34	[0.041, 0.69]	526	E	2.5	[0.32, 3.1]
481	R	0.17	[0.0092, 0.69]	527	I	0.13	[0.0092, 0.46]
482	K	2.7	[0.46, 3.1]	528	D	3.1	[3.1, 3.1]*
483	D	0.12	[0.0092, 0.46]	529	R	3.1	[3.1, 3.1]*
484	E	0.14	[0.0092, 0.69]	530	R	3.1	[3.1, 3.1]*
485	E	1.9	[0.23, 3.1]	531	G	0.95	[0.15, 3.1]
486	I	0.5	[0.041, 3.1]	532	C	0.17	[0.0092, 0.69]
487	I	0.37	[0.041, 0.69]	533	X	0.67	[0.041, 3.1]
488	W	0.53	[0.088, 3.1]	534	N	0.2	[0.0092, 0.69]
489	R	0.19	[0.0092, 0.69]	535	R	3	[3.1, 3.1]*
490	N	0.3	[0.041, 0.69]	536	Q	0.55	[0.041, 3.1]
491	F	0.15	[0.0092, 0.69]	537	H	2.4	[0.23, 3.1]
492	I	0.46	[0.041, 3.1]	538	V	0.6	[0.041, 3.1]
493	K	0.5	[0.088, 3.1]	539	E	2.6	[0.32, 3.1]
494	M	0.11	[0.0092, 0.46]	540	F	0.22	[0.0092, 0.69]
495	L	0.15	[0.0092, 0.69]	541	P	0.22	[0.0092, 0.69]
496	A	2.1	[0.32, 3.1]				
497	D	0.12	[0.0092, 0.46]				

Alinhamento de sequência de *Z. indianus* e da lipase humana usando o programa ClustalW (LLOYD, 1997). (*) representam resíduos idênticos, (.) resíduos similares, (:) resíduos não idênticos, e (-) os gaps.

```

Z._indianu    ----ARASDDALLVNLPPQKLRGRDNGRYYSYESMPYAEPPVGDRLRCEAPDPYKQAWADT  56
1F6W          AKLGAVYTEGGFVEGVN--KKLGLLGDSVDIFKGIFFAAP---TKALENPQP-HPGWQGT  54
              *  :::::  .:  *  *  ..  :::::*  *  *  *:  *  .  *  .  *

Z._indianu    FEATSSPVGCPQWDQFTPGDCKWVGEEDECLTVSIYKPKNSKRSS--FPVVAHIHGGAFFM  114
1F6W          LKAKNFKKRCLQATITQD---STYGDEDCLYLNIVWPQGRKQVSRDLVPVMIWIYGGAF  111
              :*:  .  *  *  .  *:****  :*:  *:  *:  *:  *:  *:  *:  *:  *:

Z._indianu    GAAPQN-----GHENVMREGKFIIVKISYRLGPLGFASTGDRDLPGNYGLKDQRLAL  166
1F6W          GSGHGANFLNNLYLDGEEIATRGNVIVVTFNYRVGPLGLSTGDANLPGNYGLRDQHMAI  171
              *:  .  .  *:  .  *:  *:  *:  *:  *:  *:  *:  *:  *:  *:  *:  *:

Z._indianu    KWIKQNIASFSGGEPQNVLLVGHSAAGASVHLQMLREDFGQLARAAFSFSGNALDPWVIQK  226
1F6W          AWVKRNIAAFGGDPDNITLFGESAGGASVSLQTLSPYNGKLIRRAISQSGVALSPWVIQK  231
              *:  *:  *:  *:  *:  *:  *:  *:  *:  *:  *:  *:  *:  *:  *:  *:

Z._indianu    GARGRAFELGRNVGCELAKDSPSLKKCLKTKPASELVTAVRN--FLKFSYVPFAPFSPV  283
1F6W          NPLFWAKKVAEKVGCPVG-DAARMAQCLKVTDPRALTLAYKVPLAGLEYPMLHYGVFPV  290
              ..  *  :::::***  .:  *:  .  :  :***  .  .  *  *  :  *  :  .  .  *  **

Z._indianu    LETSDAPNPITQDPGEGIKSERFDKVPWAVSYIPEGGGFHAPLLLRGGNPETVTHDLND  343
1F6W          IDGDFIPDDPINLYAN-----AADIDYIAGTNNMDGHIFASIDMPAINKGKVKTEED  343
              :  .  *:  *  .  .  .  :  :  .  .  .  *  :  *:  :  .  *  .  .  :  *

Z._indianu    RWLELAPYLLFYRDKKTNKEMDEYTRKVRQQYIGNRSFGIESYLYMQQVFTDVLFKNSTK  403
1F6W          FYKLVSEFTITKGLRGAKTTFDVYTESWAQDPSQE-----NKKKTVVDFETDVLFLVPTE  398
              :  :  :  :  :  :  :  :  *  **  .  *:  :  :  :  :  :  :  :  *****  .*:

Z._indianu    DSEDLHRKNGK-RPAHARVYDNPAEKGIDQDLA-KMHGRDFGTVQGDEYFLIFENRVKEA  461
1F6W          IALAQHHRANAKSAKTYAYLFSHPSRMPVYPKWVGADHADDIQYVFGKPFATPTGYRPODR  458
              :  **  *.  *  :  :  :  :  :  .  :  .  .  *.  *:  *  *.  :  *  :  :

Z._indianu    KMRKDEEIWRNFIKMLADFANREQGMLEYGGCGFKN---KVGSRKVKVSEIDRRGCX--  516
1F6W          TVSKAMIAWNTNFAKTGDPNMGDSAVPTHWEPTYTENSNGYLEITKKMGSSSMKRSRLRTNF  518
              .:  *  *  *  *  *  .  .  .  :  :  :  :  :  :  :  :  *  :  :  *

Z._indianu    ----NRQHVEFP---  524
1F6W          LRYWLTLYLALPTVI  533
              .  :  :  :  *

```

Apêndice C

Relação filogenética de dez membros da família multigênica carboxil/colinesterase . Este

cladograma foi construído pelo método *neighbor joining* (SAITOU & NEI, 1987) e a consistência dos ramos foi testada pela análise de *bootstrap* com 100 réplicas. A sequência da troglobulina humana foi usada como grupo externo (In OAKESHOTT et al. 1993)

