

Alba Regina de Abreu Lima-Catelani

PADRÃO DE ESTERASES DE *Aedes aegypti* E
Aedes albopictus.

t575

L732p

T.726/96

São José do Rio Preto
São Paulo
1996



Alba Regina de Abreu Lima-Catelani

PADRÃO DE ESTERASES DE *Aedes aegypti* E
Aedes albopictus.

1910000726



Tese apresentada para a obtenção do grau de
Doutor em Ciências Biológicas (Genética), no
Curso de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas, Área de Concentração em
Genética, do Instituto de Biociências, Letras e
Ciências Exatas da Universidade Estadual
Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - IBILCE-
UNESP.

Orientadora: Profa. Dra. Hermilene Ely Melo

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos



726/96

São José do Rio Preto
São Paulo
1996



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

Orientadora: Profa. Dra. Hermione Elly Melara de Campos Bicudo

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Roberto Ceron



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

"Se vi mais longe, foi por ter-me colocado nos ombros de gigantes."

Sir Isaac Newton



A minha mãe, Maria Artêti, cujo apoio, estímulo, ajuda e carinho possibilitaram a realização deste trabalho,

À minha F1, Mariana, motivo de muita alegria, de momentos inesquecíveis, cujo sorriso me colocou nos ombros de

gigantes.”

Dedico...

Sir Isaac Newton

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho foi concretizada com o auxílio inestimável de muitas pessoas. A minha gratidão será sempre inexprimível, pois estas pessoas iluminaram o caminho que foi seguido por nós. Porém, de modo especial, gostaria de prestar minha homenagem:

À Profa. Dra. *Hermione Elly Melara de Campos Duarte*, que aliou uma dose certa competência profissional com carinho, amizade e zelo. Obrigada pela forma segura com que sempre me orientou, intensificando em mim o amor pela ciência e pesquisa.

ao Prof. Dr. *Carlos Roberto Ceron*, pela amizade, entusiasmo ao transmitir seus conhecimentos, dedicação e pela confiança que depositou em meu desempenho, colocando o seu laboratório à minha disposição.

aos Profs. Drs. *Cláudia Márcia A. Uataretto*, *Eucleia Primo Bettio Costa*, *Arno Raul Schwandt* e *Ademilson Espenhor Epas Soares*, pela atenção e valiosas sugestões na análise da pronúncia.

à Direção do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto - IBILCE - UNESP, pelas condições materiais que possibilitaram a realização deste trabalho.

aos Departamentos de Biologia e de Química e Geociências do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, IBILCE - UNESP, pela acolhida e criação de dependência para a realização deste trabalho.

à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

à Diretora Regional da Superintendência de Controle e Qualidade (SUCEN) de São José do Rio Preto, SUCEN, pela atenção e disponibilidade com que sempre me auxiliou na realização deste trabalho.

a todos os funcionários da SUCEN de São José do Rio Preto, em especial aos Pesquisadores Científicos *Rubens Pinho Cardoso Júnior* e *Antonio Ismael Paulino*, à Assistente de apoio à pesquisa *Margareth Regina Dóbo Soares*, à Médica

À minha mãe, **Maria Arléti**, cujo apoio, estímulo, ajuda e carinho possibilitaram a realização deste trabalho,

À minha F₁, **Mariana**, motivo de muita alegria, de momentos inesquecíveis, cujo sorriso e carinho constantes foram estímulos para prosseguir,

Dedico...

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho foi concretizada com o auxílio inestimável de muitas pessoas. A minha gratidão será sempre imorredoura, pois estas pessoas iluminaram a estrada que foi seguida por nós. Porém, de modo especial, gostaria de prestar minha homenagem:

à Profa. Dra. **Hermione Elly Melara de Campos Bicudo**, que alia na dose certa competência profissional com carinho, amizade e zelo. Obrigada pela forma segura com que sempre me orientou, intensificando em mim o amor pela ciência e pesquisa,

ao Prof. Dr. **Carlos Roberto Ceron**, pela amizade, entusiasmo ao transmitir seus conhecimentos, dedicação e pela confiança que depositou em meu desempenho, colocando o seu laboratório a minha disposição,

aos Profs. Drs. **Cláudia Márcia A. Carareto**, **Eucléia Primo Betiole Contel**, **Arno Rudi Schwantes** e **Ademilson Espencer Egea Soares**, pela atenção e valiosas sugestões na análise da pró forma,

à Direção do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto - IBILCE - UNESP, pelas condições materiais que possibilitaram a realização deste trabalho,

aos Departamentos de Biologia e de Química e Geociências do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, IBILCE - UNESP, pela acolhida e cessão de dependências e equipamentos necessários durante a realização deste trabalho,

à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro,

à Diretora Regional da Superintendência de Campanhas Endêmicas (SUCEN) de São José do Rio Preto, **Sirle Abdo Salloum Scandar**, pela amizade, atenção e disponibilidade com que sempre me atendeu, possibilitando a realização deste trabalho,

à todos os funcionários da SUCEN de São José do Rio Preto, em especial aos Pesquisadores científicos **Rubens Pinto Cardoso Júnior** e **Antonio Ismael Paulino**, à Assistente de apoio à pesquisa **Margareth Regina Débo Soares**, à Médica

Maria Rita de Cássia Oliveira Cury e ao Encarregado de setor **Reinaldo Defende** pela grande ajuda no fornecimento de exemplares de *Aedes aegypti*, bem como de bibliografia referente à biologia do organismo, pela paciência e amizade,

à Diretora Regional da SUCEN de Marília **Maria Tereza M. Andreghetti** e a todos os funcionários do Insetário dessa Instituição, em especial à Pesquisadora científica **Elvira M. M. Nascimento** pela simpatia com que sempre me receberam e pela colaboração no fornecimento de exemplares de *Aedes aegypti*,

à Diretora Regional da SUCEN de Taubaté **Gisela Rita A. M. Marques** e a todos os funcionários do Insetário dessa Instituição, em especial ao Pesquisador científico **Cristiano C. de Azevedo Marquês**, pela atenção, disponibilidade e pela colaboração no fornecimento de exemplares de *Aedes albopictus*,

aos Professores do Departamento de Biologia do IBILCE, pela amizade, incentivo, conhecimento e experiência profissional que proporcionaram meu amadurecimento científico,

ao Prof. Dr. **James Robert Coleman**, pela gentileza em revisar o Summary,

ao Prof. Dr. **Antônio José Cordeiro**, do Departamento de Ciência da Computação e Estatística deste Instituto, pela assessoria estatística,

aos Profs. que, durante o decorrer deste trabalho, ocuparam o cargo de Coordenador do Curso de Pós-graduação Profa. Dra. **Marileila Varela Garcia**, Prof. Dr. **Wladimir João Tadei** e Profa. Dra. **Hermione Elly Melara de C. Bicudo**, pela atenção e orientação na parte burocrática,

aos Professores e companheiros do Grupo Acadêmico "Citogenética e Ação Gênica de Insetos", em especial às Profas. Dras. **Maria Tercília V. de A. Oliveira** e **Marlene K. H. Kobayashi**, pela troca constante de conhecimentos, incentivos e estímulos,

ao Prof. **Sebastião Roberto Taboga**, pela amizade, estímulos e sugestões sempre pertinentes,

aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, **Nanci O. de A. Pereira**, **Onilda N. de Oliveira Akasaki** e **Oscar J. Marques** pela eficiência e disposição com que sempre me atenderam,

aos funcionários do Departamento de Biologia **Laura N. A. Pinheiro**, **Simone C. Fernandes**, **Olga B. Pelicer**, **Sebastião Dias Barbosa**, **Paulo A. Maziero**, **Josué Rodrigues dos Santos** e **Rosana S. de Souza**, pela amizade, apoio e colaboração nestes anos de convívio,

Muito aos funcionários do Departamento de Química e Geociências, em especial ao **João Rodrigues dos Santos** e **Jorge Freytag Buchid**, pelo auxílio técnico-laboratorial, e as secretárias **Rita Beatriz de Seixas Mazzocato** e **Araguaia Solange de Souza Roque** pela eficiência e simpatia,

à **Olinda Vacari T. Luchezi**, Diretora Técnica do Serviço de Biblioteca e Documentação deste Instituto, às bibliotecárias **Maria Helena Lima**, **Maria do Carmo Junqueira**, **Wilse Terezinha B. A. Soares**, **Gislaine de Lourdes Gameiro** e aos funcionários **Rosana Pires Borelli**, **Rogério Pereira Vaz** e **Elza Mítico Sato**, pela competência e dedicação no atendimento dos serviços de comutação bibliográfica. Um agradecimento especial deve ser feito a **Maria do Carmo Junqueira** pela orientação e revisão das referências bibliográficas deste trabalho,

à funcionária **Soraia F. R. Soares**, pelos desenhos e trabalho xerográfico e a **Maria Aparecida A. de Marchi (Tita)**, pelo serviço de encadernação da pró-forma,

aos amigos Fernandopolenses, cujos nomes seriam demasiados e muito os predcados, em especial a **Aldo Moscardini Júnior**, **Dirce Aparecida Baldini**, **Humberto Cáfaró Filho**, **João Barbudo Filho**, **Júlio César André**, **Angelo Simonato**, **Rosemeire Batista de Oliveira**, **Roseli Bradaci Eredia**, **Selma Camilo Nogueira**, **Fabiana Cristina Fenti Yamamoto**, **Marinês A. Alessi** e **Denigrace Barbosa Lisboa**, pelo ótimo convívio, colaboração, apoio, estímulo e amizade,

à minha amiga muito querida e companheira de trabalho, Prof. **Fádua Rosana Coelho Rits**, pela sua presença constante nos momentos de dificuldade e de realizações, colaborando significativamente para que eu pudesse realizar este trabalho,

à querida amiga e companheira de Pós-graduação Prof. **Ana Silvia Lapenta** pelo convívio solidário e carinhoso, que desde o mestrado tem me incentivado, apoiado e colaborado em todos os momentos,

à Prof. **Ana Maria Alves de Oliveira**, minha companheira de "salinha", amiga dedicada e grande incentivadora. Obrigada pela agradável convivência diária, pela paciência em me ouvir e pelos conselhos, nos momentos delicados pelos quais passei,

à Prof. **Lilian Castiglione Ruiz**, pela atenção, companheirismo e ajuda nos momentos críticos,

à todos os amigos do Curso de Pós-graduação, pelo companheirismo e solidariedade nas horas alegres e nos momentos de dificuldade. Em especial ao

Marcelo, Sheila, Mara, Mônica, Érica, Andréa Salles, Rosa, Patrícia, Andréa Rossit, Nilce, Maristela e Iara,

aos meus pais **Albano** e **Arléti** que me formaram com seu amor e trabalho,
aos meus irmãos **Débora** e **Júnior**, ao meu cunhado **Renato** e a minha tia **Ana Maria**, pelo apoio, incentivos e carinhos constantes,
ao **Wilton**, meu companheiro, que mesmo distante muito me ajudou na confecção dos gráficos e das pranchas. Obrigada por todos esses anos de convívio e amor,
a **Mariana**, que faz com que tudo valha a pena,

“e, acima de tudo, Louvores ao Sábio que, criando a luz, a atribuiu às estrelas e ainda permite que nós, simples iluminados, nos julguemos astros.”

III. RESULTADOS	32
1. <i>Aedes aegypti</i>	33
1.1. Análise das bandas e sua distribuição	33
1.2. Padrões individuais de esterases	50
1.3. Ação de inibidores sobre as bandas esterásicas	54
2. <i>Aedes albopictus</i>	60
2.1. Análise das bandas e sua distribuição	60
2.2. Padrões individuais de esterases	71
2.3. Ação de inibidores sobre as bandas esterásicas	75
3. Análise de Dependência (ANADep)	80
IV. DISCUSSÃO	82
V. RESUMO E CONCLUSÕES	102
VI. SUMMARY AND CONCLUSIONS	107
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	111

ÍNDICE

I.	INTRODUÇÃO.....	1
II.	MATERIAL E MÉTODOS.....	23
	1. Origem das Amostras.....	24
	2. Preparo dos Géis.....	26
	3. Preparo das Amostras e Condições de Eletroforese.....	27
	4. Tratamento dos Géis para a Identificação das Esterases.....	27
	5. Secagem dos Géis.....	28
	6. Teste com Inibidores.....	30
	7. Análise Estatística.....	30
III.	RESULTADOS.....	32
	1. <i>Aedes aegypti</i>	33
	1.1. Análise das bandas e sua distribuição.....	33
	1.2. Padrões individuais de esterases.....	50
	1.3. Ação de inibidores sobre as bandas esterásicas.....	54
	2. <i>Aedes albopictus</i>	60
	2.1. Análise das bandas e sua distribuição.....	60
	2.2. Padrões individuais de esterases.....	71
	2.3. Ação de inibidores sobre as bandas esterásicas.....	75
	3. Análise de Dependência (ANADEP).....	80
IV.	DISCUSSÃO.....	82
V.	RESUMO E CONCLUSÕES.....	102
VI.	SUMMARY AND CONCLUSIONS.....	107
VII.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	111

I. INTRODUÇÃO



Febre amarela e dengue estão entre as mais importantes doenças viróticas transmitidas por mosquitos que afetam o homem. Essas duas viroses possuem ciclo silvestre de transmissão, através de picadas de mosquitos de hábitos silvestres do gênero *Haemagogus* e *Sabethes* e macacos como hospedeiros, assim como ciclo urbano, envolvendo vetor doméstico, como mosquitos do gênero *Aedes*, e hospedeiro humano (Dégallier et al., 1992; Monath, 1994).

A. aegypti é considerado o clássico transmissor do vírus da febre amarela (arbovírus da família *Togaviridae*, do gênero *Flavivirus*), o vírus da dengue (também um arbovírus da família *Togaviridae*, do gênero *Flavivirus*), constituído por quatro sorotipos (Den1, Den2, Den3 e Den4) e o vírus da encefalite Venezuelana. Os vírus se alojam na glândula salivar, sendo a transmissão via oral (Vanderley et al., 1987).

Segundo Franco (1968), a primeira epidemia de febre amarela no Brasil ocorreu em 1685, na Cidade da Recife, Estado de Pernambuco. A forma urbana da doença foi erradicada no Brasil em 1942, persistindo, no entanto, a ocorrência da forma silvestre (Lima, 1985).

O Brasil possui a maior área endêmica de febre amarela do mundo. Abrange toda a Bacia Amazônica, incluindo as macroregiões Norte e Centro-Oeste. Os riscos de urbanização da febre amarela decorrem da possibilidade de infecção, do *A. aegypti*, por pacientes portadores de doença, contrainda naquelas regiões (Tauli, 1986). Segundo esse autor, em 1955, após muitos anos de luta contra o *A. aegypti*, o Brasil e outros dezesseis países da América conseguiram erradicá-lo. Porém, a partir dos países americanos que não erradicaram o mosquito, praticamente todos os países foram reintroduzidos, gerando a situação atual, extremamente preocupante, em quase todos os países das Américas, e em diversas áreas do hemisfério sul.

Epidemias de dengue são registradas anualmente no continente. No Brasil, a primeira epidemia de dengue diagnosticada com bases clínicas e laboratoriais, ocorreu em Boa Vista, Roraima, 1982, registrando-se muitos casos em poucos meses, exigindo gastos extremamente elevados para o seu controle (Osanaí et al., 1983). Neste episódio foram encontrados os sorotipos Den1 e Den4. A partir de 1986, registrou-se outra epidemia de dengue no Estado do Rio de Janeiro, em municípios da Baixada Fluminense (Tauli, 1987). Ceará e Alagoas,

I. INTRODUÇÃO

causados pelo Den1 (Macroncelos, 1993). Em fevereiro de 1989 foi isolada a 1ª amostra de dengue 2 (Den2) no Brasil. Um ano depois, o Den2 causou uma nova epidemia no

Febre amarela e dengue estão entre as mais importantes doenças viróticas transmitidas por mosquitos, que afetam o homem. Essas duas viroses possuem ciclo silvestre de transmissão, através de picadas de mosquitos de hábitos silvestres do gênero *Haemagogus* e *Sabethes* e macacos como hospedeiros, assim como ciclo urbano, envolvendo vetor doméstico, como mosquitos do gênero *Aedes*, e hospedeiro humano (Dégallier *et al.*, 1992, Monath, 1994).

A. aegypti é considerado o clássico transmissor do vírus da febre amarela (arbovírus da família *Togaviridae*, do gênero *Flavivirus*), o vírus da dengue (também um arbovírus da família *Togaviridae*, do gênero *Flavivirus*), constituído por quatro sorotipos (Den1, Den2, Den3 e Den4) e o vírus da encefalite Venezuelana. Os vírus se alojam na glândula salivar, sendo a transmissão via oral (Vanderley *et al.*, 1987).

Segundo Franco (1969), a primeira epidemia de febre amarela no Brasil ocorreu em 1685, na Cidade de Recife, Estado de Pernambuco. A forma urbana da doença foi erradicada do Brasil em 1942, persistindo, no entanto, a ocorrência da forma silvestre (Lima, 1985).

O Brasil possui a maior área endêmica de febre amarela do mundo. Abrange toda a Bacia Amazônica, incluindo as macrorregiões Norte e Centro-Oeste. Os riscos de urbanização da febre amarela decorrem da possibilidade de infecção, do *A. aegypti*, por pacientes portadores da doença, contraída naquelas regiões (Tauil, 1986). Segundo esse autor, em 1955, após muitos anos de luta contra o *A. aegypti*, o Brasil e outros dezoito países da América conseguiram erradicá-lo. Porém, a partir dos países americanos que não erradicaram o mosquito, praticamente todos os países foram reinfestados, gerando a situação atual, extremamente preocupante, em quase todos os países das Américas, e em extensas áreas do território nacional.

Epidemias de dengue são registradas anualmente no continente. No Brasil, a primeira epidemia de dengue diagnosticada com bases clínicas e laboratoriais, ocorreu em Boa Vista, Roraima, 1982, registrando-se cerca de 12000 casos em poucos meses, exigindo gastos extremamente elevados para o seu controle (Osanai *et al.*, 1983). Neste episódio foram encontrados os sorotipos Den1 e Den4. A partir de 1986, registrou-se outra epidemia de dengue no Estado do Rio de Janeiro, em municípios da Baixada Fluminense (Tauil, 1987), Ceará e Alagoas,



causados pelo Den1 (Vasconcelos, 1993). Em fevereiro de 1989 foi isolada a 1ª amostra de dengue 2 (Den2) no Brasil. Um ano depois, o Den2 causou uma nova epidemia no Rio de Janeiro com 270 casos de dengue hemorrágica (Vasconcelos, 1993).

Cada um dos quatro sorotipos do vírus da dengue pode causar uma enfermidade de amplo espectro, variando de uma leve síndrome viral não-específica até a doença hemorrágica severa e fatal (Gubler & Trent, 1994). A fase febril dura, normalmente, de 2 a 10 dias após os quais a recuperação é completa. Em casos graves, entretanto, a convalescença pode ser prolongada, e a recuperação do paciente demorar várias semanas. [A dengue é de caráter geralmente benigno, porém, sua forma hemorrágica pode ser letal.]

O período de viremia da febre amarela é relativamente curto, cerca de 3 dias após o início dos sintomas, o da dengue, entretanto, chega a até 7 dias. A possibilidade de um paciente portador do vírus da dengue, contraído em outro país, chegar a uma cidade brasileira infestada por *A. aegypti* e disseminá-la é, assim, maior (Tauil, 1986).

Soekiman *et al.* (1986) consideram o *A. aegypti* também como importante vetor do vírus Chikungunya, pertencente ao grupo dos arbovírus, da família Togaviridae, gênero *Alphavirus* (este gênero inclui várias espécies causadoras de encefalite), que se encontra amplamente distribuído nas áreas tropicais da Ásia e na África. Transmite ainda o vírus do Nilo Oeste que é o responsável por grandes epidemias de doenças febris na África, Ásia e Europa (Baquar *et al.*, 1993).

⇒ *A. aegypti* possui ampla distribuição e tem sido muito estudado, sob vários aspectos. É originário da África e sua introdução no resto do mundo foi, provavelmente, o resultado do extenso comércio escravo, durante os séculos 15 a 19 (Tabachnick & Powell, 1979). Em 1930, *A. aegypti* já era encontrado na maioria das regiões tropicais e subtropicais habitadas do mundo e em algumas regiões temperadas, durante os meses mais quentes (Slosek, 1986).

No geral, a distribuição do mosquito é controlada por suas próprias características biológicas, isto é, é afetada pelos limites de sua capacidade para suportar climas extremos e por seu comportamento intimamente associado com populações humanas (Slosek, 1986). A abundância de chuva e sua distribuição sazonal também têm efeito no tamanho das populações do mosquito (Moore *et al.*, 1978).



Em 1980, a *A. aegypti* ocorre mais freqüentemente entre as latitudes 25°N e 25°S. Foi encontrado em todos os países do hemisfério ocidental, com exceção do Canadá (Slosek, 1986). A altitude e outras condições topográficas também exercem influência na distribuição (Forattini, 1965).

Os programas de vigilância sanitária operam verificando e procurando controlar a densidade e disseminação das espécies de *Aedes*. Um grande número de mosquitos aumenta o contato mosquito-homem, aumentando significativamente a chance de um mosquito infectado transmitir a doença. Índices de densidade larvária têm sido usados em estudos de distribuição e densidade dos vetores da febre amarela e dengue. No Estado de São Paulo o índice utilizado é o de Breteau (Breteau, 1954). Esse índice (n° de amostras positivas / n° de residências visitadas X 100) é referido por Lok (1985) como sendo o melhor na estimativa da densidade larvária, envolve o dimensionamento dos criadouros existentes, pela contagem dos recipientes com larvas, dando indicação da intensidade da infestação, e não perde de vista a avaliação de sua extensão, uma vez que associa recipientes a casas (Alves *et al.*, 1991). Quando este índice é menor que dois, inicia-se o controle "casa a casa" (pulverização das residências com inseticidas), quando este índice fica entre 2,1 e 4,9, além do controle "casa a casa" inicia-se também o "arrastão" (coleta de pneus, garrafas, latas e outros objetos que possam juntar água) e a pulverização de inseticidas nos pontos estratégicos, com máquina portátil. No entanto, se o índice for maior que 5 ou houver epidemia, inicia-se imediatamente a aplicação de inseticidas com o equipamento pesado, que faz a pulverização do produto nas ruas da cidade (informações obtidas junto à Superintendência de Controle de Endemias - SUCEN - de São José do Rio Preto).

O Programa de Controle de Febre Amarela e de Dengue, desenvolvido a partir de 1985 no Estado de São Paulo pela SUCEN, objetiva impedir a ocorrência das doenças, evitando a circulação de fontes de infecção e o aparecimento de condições, em relação aos vetores, que propiciem a transmissão (Alves *et al.*, 1991).

⇒ Entretanto, a capacidade do mosquito *A. aegypti* em resistir à erradicação química tem se tornado um problema. O mosquito começou a mostrar resistência a organofosforados e/ou DDT no Caribe, em 1950 (Slosek, 1986). Malathion, o pesticida normalmente utilizado para controlar populações adultas durante a maioria das epidemias de dengue, mostrou-se ineficiente para controlar adultos e larvas em San Juan, Porto Rico, durante a epidemia de 77-78 (Fox, 1980).



Em 1980, a OMS (Organização Mundial da Saúde) divulgou a notícia da resistência desta espécie aos organofosforados: malathion, fenitotriom, fenitron e temefos (Abate), usados amplamente no Caribe e países vizinhos e o malathion e temefos, nos países asiáticos (Reyes-Villanueva, 1990). Mourya *et al.* (1994) mostraram que durante uma epidemia de dengue na Índia, em 1992, as larvas e adultos do mosquito *A. aegypti* mostraram-se resistente ao DDT e malathion. Esta capacidade do *A. aegypti* de apresentar resistência aos inseticidas pode, eventualmente, anular os esforços humanos para erradicá-lo.

Ocorrem também, nas Américas, outras espécies de *Aedes*, além do *A. aegypti*. A recente introdução e disseminação do *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Skuse), da Ásia para as Américas e África, na década de 1980, é um fator bastante preocupante, segundo os epidemiologistas (Monath, 1994). O *A. albopictus* é um mosquito primitivamente silvestre que se adaptou ao ambiente urbano (Taail, 1987).

Aedes albopictus foi encontrado pela primeira vez nas Américas, em Houston, Texas, em 1985 (Monath, 1986). Em 1986, o mosquito já ocorria em vários estados americanos e em 1987, na maioria deles. Foi encontrado também na Nigéria, em 1991 e, na Espanha, em 1993 (Monath, 1994).

No Brasil, foi detectado no Estado do Rio de Janeiro, em 1986, (Forattini, 1986). Em 1989, em outros quatro Estados: Espírito Santo, Minas Gerais, Rio Grande do Norte e São Paulo (SUCAM, 1989). No Estado de São Paulo, as observações iniciais induzem à suposição de que esta espécie se encontra amplamente disseminada na região do Vale do Paraíba (Gomes *et al.*, 1992).

Hawley *et al.* (1987) admitem que o *A. albopictus* norte-americano teria se originado no norte da Ásia e não na sua região tropical. Os autores coletaram linhagens de várias regiões e verificaram que linhagens da China, Coréia e Japão, assim como do Texas, Louisiana, Flórida, Tennessee e Indiana são sensíveis ao fotoperíodo, enquanto linhagens da Ásia tropical como de Mauritius, Madagascar e Norte de Taiwan não o são. Além disso, as linhagens norte-americanas, assim como as japonesas, possuem uma grande resistência a temperaturas baixas, diferentemente das linhagens da Ásia tropical. Um outro fator que contribui para esta hipótese é o fato de que pneus usados são importados em grande número pelos EUA, do Norte da Ásia, os quais constituem o sítio primário de oviposição do *A. albopictus* na América do Norte (Hawley *et al.*, 1987). Essas linhagens adaptadas a climas mais frios podem, teoricamente, atingir uma distribuição mais ampla do que o *A. aegypti* (Grist, 1993 e Grist & Burgess, 1994).



em condições Na Ásia, o *A. albopictus* é um vetor do dengue, do dengue hemorrágico e da síndrome de choque do dengue. Alguns estudos têm mostrado que ele pode ser, também, um vetor eficiente e um reservatório do vírus La Crosse que é o mais patogênico arbovírus da família Bunyavírus, responsável pela encefalite Califórnia. Transmite ainda o vírus San Angelo que também está relacionado com a encefalite Califórnia (Monath, 1986) e é, também, um importante vetor do vírus Chikungunya, já mencionado (Turell *et al.*, 1992). Em laboratório, essa espécie já se mostrou susceptível a outros vírus, como o da encefalite St. Louis, da encefalite Japonesa e o vírus do Nilo Oeste e de Kunjin, todos arbovírus, da família Togaviridae, do gênero *Flavivirus*. É também sensível, em laboratório, ao vírus da febre amarela (Taail, 1987).

Além da transmissão oral, os vírus podem ser mantidos em populações de *Aedes* através da transmissão transovarial (vertical ou transgeracional) durante os períodos interepidêmicos. Rosen *et al.* (1983) demonstraram, por experimentos, em laboratório, que ocorre a transmissão transovarial em *A. albopictus* para os 4 sorotipos do vírus do dengue. Taail (1987) verificou, em laboratório, transmissão horizontal e transovarial, nesta espécie, para o vírus da febre amarela e Rosen (1988) para duas linhagens do vírus da encefalite St. Louis. Baquar *et al.* (1993) também encontraram transmissão vertical do vírus do Nilo Oeste em *A. aegypti* e *A. albopictus*.

Devido à presença de *A. aegypti*, nas mesmas áreas, foi difícil determinar a contribuição do *A. albopictus* para a transmissão de doenças. Entretanto, em várias epidemias, nas quais *A. aegypti* estava ausente, ficou estabelecida a função de vetor do *A. albopictus*, como por exemplo, nas Ilhas Seychelles, no Oceano Índico (Metselaar *et al.*, 1980).

Os mosquitos *A. aegypti* e *A. albopictus* são espécies relacionadas que ocupam nichos ecológicos similares podendo, pois, coexistirem na mesma região, utilizando os mesmos tipos de criadouros para os estágios larvais (Klowden, 1993). Segundo Hobbs *et al.* (1991) populações de *A. albopictus* têm substituído populações de *A. aegypti*. Entretanto, a larva de *A. aegypti* tem predominado sobre a de *A. albopictus* em estudos de laboratório e em várias circunstâncias ecológicas onde ambas as espécies têm coexistido (Mogi *et al.*, 1988).

Klowden & Chambers (1992) e Klowden (1993) observaram que, em regime nutricional restritivo, fêmeas de *A. albopictus* desenvolvem ovos, mais facilmente, do que *A. aegypti*. A longevidade das fêmeas de *A. albopictus* mantidas



em condições de carência alimentar foi, também, significativamente maior do que a de *A. aegypti*. As larvas de *A. albopictus* possuem um período larval mais prolongado (Black *et al.*, 1989) estocando maior quantidade de lipídios e glicogênio que resultam em grandes reservas metabólicas. Isto pode produzir adultos com uma capacidade maior de sobrevivência e de desenvolver os ovos com pouco alimento sanguíneo, garantindo uma grande eficiência reprodutiva. Em contraste, *A. aegypti* gasta menos tempo no estágio larval e emerge com baixas reservas de glicogênio e lipídios. A predominância de uma ou outra espécie pode depender do habitat larval e da disponibilidade de sangue (Klowden & Chambers, 1992). Segundo Mogi *et al.* (1988) *A. aegypti* predomina quando habitats larvais são efêmeros e *A. albopictus*, quando esses mesmos habitats não são limitados.

Experimentos quantitativos realizados por Rosen *et al.* (1983) determinaram que o *A. albopictus* é mais susceptível à infecção oral com os quatro sorotipos do dengue do que o *A. aegypti*.

A população de *A. albopictus*, do Brasil, é geneticamente distinta da linhagem norte-americana, segundo Miller & Ballinger (1988). Esses autores trabalharam com mosquitos coletados na cidade de Cariacica, no Estado do Espírito Santo, e notaram que, embora essa população seja facilmente infectada pelos quatro sorotipos do vírus do dengue, e seja capaz de transmiti-los, ela é significativamente menos susceptível à infecção e, transmite a infecção em menor proporção, quando comparada com populações norte-americanas. Entretanto, os autores ressaltam que foi examinada apenas uma linhagem e que outras linhagens, com potencial de vetor diferente, podem existir no Brasil.

Ainda segundo Miller & Ballinger (1988), não é necessário um vetor eficiente para ocorrer uma epidemia. Aconteceu na Nigéria uma epidemia de febre amarela urbana, transmitida por uma linhagem de *A. aegypti* extremamente ineficiente como vetor. Como já foi mencionado, um grande número de mosquitos aumenta o contato mosquito-homem e, significativamente, a chance de um mosquito infectado transmitir a doença.

A cepa de *A. albopictus* encontrada no Vale do Paraíba, Estado de São Paulo, por Gomes *et al.* (1992), parece ser oriunda da Ásia Tropical e, portanto, reveste-se de elevada importância epidemiológica pela possibilidade dessa espécie vir a transmitir, além da dengue, a febre amarela, no Brasil.

As dificuldades para erradicar ou controlar o *A. albopictus*, da mesma forma que *A. aegypti*, são muito grandes, principalmente por seus hábitos urbanos e



rurais. Há ainda o risco desta espécie servir como "ponte" entre as formas silvestre e urbana da febre amarela (Tauil, 1987).

Algumas linhagens de *A. albopictus* também têm mostrado resistência a inseticidas organofosforados, como demonstrou Wesson (1990) através de experimentos com 26 linhagens de regiões diferentes (13 dos EUA, 5 do Brasil, 3 da Ásia e 5 do Japão).

Sabe-se que em muitos insetos a resistência a inseticidas está relacionada ao aumento da atividade de esterases não-específicas e à alteração da acetilcolinesterase (Bonning *et al.*, 1991).

As esterases são um grupo de enzimas hidrolíticas altamente variáveis e multifuncionais (Miller & Novak, 1983).

Cada esterase, independente de sua classificação, pode existir sob múltiplas formas denominadas isoenzimas. A aceitação dessa existência de múltiplas formas, dependeu do desenvolvimento de meios para a separação e caracterização de moléculas de proteínas similares, através dos quais, a existência de tais formas múltiplas tornou-se reconhecida. Além das técnicas de eletroforese, uma grande variedade de métodos para a separação e caracterização de enzimas foi desenvolvida. Esses métodos compreendem várias formas de cromatografia, focalização isoeletrica, estudos das propriedades cinéticas e imunológicas, inativação seletiva de vários agentes e análise estrutural de diferentes graus de complementação.

O primeiro trabalho que descreveu a "existência de diferentes formas moleculares de proteínas com a mesma especificidade enzimática", foi realizado por Markert & Moller (1959), sendo referente a estudos relacionados à ontogenia e estrutura da lactato desidrogenase em tecidos de vertebrados. Esses autores introduziram o conceito de isozimas (ou isoenzimas) para descrever este fenômeno.

O termo isoenzima foi amplamente aceito, mas apresentava ambiguidades em sua definição. Estudos genéticos e estruturais permitiram tornar mais clara a natureza das formas múltiplas de uma enzima, sendo possível definir isoenzimas com base na sua origem genética. De acordo com a Comissão de Nomenclatura Bioquímica da IUPAC - IUB (International Union of Pure and Applied Chemistry and International Union of Biochemistry), de 1977, isoenzimas são definidas como "múltiplas formas de uma enzima, ocorrendo dentro de uma única espécie, como resultado da presença de mais de um gene estrutural". Assim, a origem das isoenzimas pode ser atribuída às seguintes condições genéticas:

1. Presença de locos gênicos múltiplos, gerando enzimas geneticamente independentes. Entre os numerosos exemplos de isoenzimas, determinadas por locos gênicos múltiplos, estão as várias formas de enzimas que se caracterizam por uma localização intracelular específica, tais como a aspartato aminotransferase ou a malato desidrogenase em suas formas citoplasmática e mitocondrial. Também constituem exemplos, os sistemas isoenzimáticos com localização intracelular similar, mas com distribuição tecido-específica, como por exemplo as isoenzimas da lactato desidrogenase, determinadas por 2 locos, na maioria dos tecidos de mamíferos, as aldolases, produto de 3 locos, e as formas isoenzimáticas da creatina quinase determinadas por 2 locos, em tecidos humanos;
2. Presença de alelos múltiplos (neste caso as enzimas são chamadas de aleloenzimas ou alozimas). Numerosos exemplos desse tipo de isoenzimas existem entre os seres vivos como, por exemplo, a glicose-6-fosfato-desidrogenase-humana, e
3. Associação, por ligações não-covalentes, de duas ou mais subunidades polipeptídicas que são, por si só, produtos de genes estruturais distintos. Essas isoenzimas são denominadas heteropolímeros. Como exemplo desta classe de isoenzimas, estão as formas intermediárias da lactato desidrogenase.

No geral, as isoenzimas geneticamente independentes, descritas no item 1, apresentam maiores diferenças nas suas propriedades bioquímicas e físico-químicas do que as variantes enzimáticas derivadas de um mesmo loco (Hopkinson, 1974). Essas isoenzimas formadas por locos gênicos múltiplos, podem ser o resultado de uma duplicação gênica ocorrida no curso da evolução, seguida de mutações independentes nos locos separados, ou de genes originalmente distintos que convergiram, através de mutações sucessivas, resultando em enzimas com funções catalíticas similares. As isoenzimas originadas da primeira forma possuem um grau mais elevado de similaridade funcional e estrutural, do que as isoenzimas originadas pela "reinvenção" (evolução convergente) de um processo catalítico particular (Moss, 1982).

A ocorrência de genes que determinam isoenzimas, localizados extremamente próximos uns dos outros nos cromossomos, é uma evidência de origem por duplicação. No homem, os genes da amilase salivar e amilase pancreática, denominadas Amy-1 e Amy-2, estão localizados no braço curto do cromossomo 1. Outros exemplos se referem ao locos da anidrase carbônica em

vários vertebrados (Moss, 1982). Há ainda casos nos quais, embora a duplicação gênica pareça ser a explicação mais provável, os genes não estão próximos, podendo até estarem em cromossomos diferentes, como por exemplo, os genes que codificam os polipeptídeos da lactato desidrogenase em vertebrados. Esta enzima é codificada por 2 genes distintos, na maioria dos tecidos: o Ldh-A (ou M) que se expressa predominantemente no músculo esquelético e o Ldh-B (ou H), predominantemente expresso no tecido cardíaco. Em todas as espécies de mamíferos estudadas, os dois genes estruturais da lactato desidrogenase, estão localizados em cromossomos diferentes. Na espécie humana, esses dois genes estão localizados nos cromossomos 11 e 12, e nos camundongos, nos cromossomos 7 e 6, respectivamente (Whitt, 1984). Nestes casos pode ter ocorrido duplicação seguida de translocação.

Há ainda outras situações, onde os genes parecem estar organizados em *clusters*, havendo vários destes agrupamentos localizados no mesmo cromossomo, como por exemplo, os grupos de genes que determinam esterases não-específicas, que são ligados, nos ratos e nos camundongos (Shows, 1977). Em cada *cluster*, é provável que existam múltiplos genes originados por duplicação, e, assim, seus genes esterásicos são membros intimamente relacionados de uma família multigênica (Healy *et al.*, 1991). Dois *clusters* de genes esterásicos, designados α e β , foram descritos em *Drosophila melanogaster*. Os genes esterásicos β (Est 6 e Est P) estão intimamente ligados na subdivisão 69A1-5 do cromossomo 3L. O *cluster* esterásico α foi localizado na região 84D3 a E2 do cromossomo 3R; dentro deste *cluster*, 2 genes separados codificam isoenzimas esterásicas (Spackman *et al.*, 1994).

Em *Lucilia cuprina* existe um *cluster* no cromossomo quatro, que possui três genes esterásicos (Rmal, Rop1 e E9), os quais estão envolvidos na resistência a inseticidas organofosforados. Um quarto gene (MCE) também está ligado neste *cluster*, embora sua relação com Rmal, Rop1 e E9 não esteja esclarecida (Smyth *et al.*, 1994).

As aleloenzimas, mencionadas no item 2, originam-se da existência de dois ou mais genes modificados, alelos, portanto localizados em um determinado loco, em cromossomos homólogos. O padrão dessas isoenzimas é herdado de acordo com as leis de Mendel. Os alelos dos genes que codificam essas enzimas são geralmente codominantes, isto é, um alelo não domina ou mascara o produto de um outro alelo com o qual possa estar pareado. Assim, indivíduos homozigotos para



um alelo particular exibem o produto gênico característico daquele alelo; nos indivíduos heterozigotos aparecerão os produtos dos dois alelos. Este polimorfismo enzimático tem sido descrito, desde o final da década de 50, em muitas espécies animais e vegetais (Beckman & Johnson, 1964 e Lewontin & Hubby, 1966).

Harris *et al.* (1977) estimaram que, em 71 locos gênicos humanos, analisados quanto à mobilidade eletroforética, cerca de 28% eram formados por variações alélicas. A prevalência, dentro da população, de indivíduos heterozigotos para um determinado loco, pode ser usada como um instrumento de medida do padrão de mutação. A variação da taxa de heterozigose para variantes enzimáticas dentro de uma espécie é muito ampla, sendo desde zero para algumas enzimas até 0,8 para outras. Enzimas estruturalmente invariáveis, em uma espécie, tendem a ter o mesmo comportamento em outras espécies.

A técnica de eletroforese não pode, no entanto, detectar substituições nucleotídicas que não alterem a seqüência de aminoácidos ou que troquem um aminoácido por outro de mesma carga elétrica. Segundo Ayala (1983) com o uso desta técnica não existe um meio de se determinar que proporção de locos gênicos não variaram, nem o grau de polimorfismo dos genes que variaram.

Parece ser razoável inferir que mudanças estruturais poderiam ocorrer com maior freqüência nas enzimas formadas por cadeias polipeptídicas grandes do que nas formadas por cadeias pequenas, pois, as oportunidades de ocorrência de mutações que modificam as características do produto parecem ser maiores no primeiro caso (Moss, 1982).

Existem outros mecanismos determinantes de variações estruturais, além do tamanho do gene. A maioria das enzimas é formada por 2 ou 4 cadeias polipeptídicas e, mais raramente, por 3. As regiões dos polipeptídios envolvidas nos contatos entre as subunidades são altamente conservadas. Cerca de 14% da área superficial de cada monômero está envolvida na formação do dímero e, correspondentemente, uma área maior, na molécula tetramérica. Mutações nestas áreas de contato impediriam a associação das subunidades e, conseqüentemente a formação da enzima. Portanto, a área de contato representa uma parte considerável da estrutura polipeptídica, onde alterações estruturais devem ser grandemente limitadas (Harris *et al.*, 1977).

Na situação descrita no item 3, moléculas enzimáticas ativas podem ser formadas pela associação de subunidades similares, mas não-idênticas, *in vivo* ou *in vitro*. Quando essas subunidades são produtos de genes estruturalmente



separados, as moléculas híbridas, assim formadas, incluem-se formalmente na definição de isoenzimas (heteropolímeros). As diferentes subunidades participantes podem ser produtos de locos gênicos separados ou genes alelos do mesmo loco. Isoenzimas híbridas artificiais, envolvendo subunidades modificadas, podem ser produzidas.

Múltiplas formas de enzimas, que se originam por modificações pós-traducionais, como a conversão de precursores inativos de enzimas proteolíticas para sua forma ativa, modificações covalentes (por exemplo: fosforilação ou defosforilação) ou modificações conformacionais, não são consideradas isoenzimas (Moss, 1982). Essas formas múltiplas são chamadas de isoenzimas secundárias.

A técnica mais comum para distinguir diferentes formas genéticas de uma enzima é a eletroforese em gel. Os extratos a serem analisados são colocados num gel poroso, através do qual um potencial elétrico é aplicado. Se a composição de aminoácidos de uma dada enzima varia e seus aminoácidos substituídos portam cargas diferentes, as enzimas diferem em carga líquida e se movem em velocidades diferentes, separando-se no gel. Suas posições no gel podem ser encontradas por técnicas específicas que incluem o uso de substratos fluorogênicos ou substratos aliados a corantes. Neste último caso, o corante liga-se ao produto da reação enzima-substrato, o que produz uma banda colorida que indica a posição das enzimas. Diferentes genótipos são, assim, identificados pelas variações de posição das bandas no gel.

Entre as enzimas altamente variáveis incluem-se as esterases, já mencionadas pelo seu envolvimento com resistência, cujas variações têm sido estudadas em organismos tão diferentes como as bactérias (Brisabols & Goullet, 1993) e o homem (Harris, 1966 e Moretto *et al.*, 1994, entre outros).

As esterases (hidrolases de ésteres carboxílicos EC 3.1.1.1) compreendem um grupo de enzimas que participam da hidrólise dos ésteres, estando presentes em todos os organismos investigados até o momento. Além dos ésteres, as esterases apresentam a capacidade de atuar sobre outros substratos, hidrolisando peptídios, amidas e haletos. Embora a especificidade aos substratos, dessas enzimas, possa ser limitada *in vivo*, algumas são capazes de hidrolisar uma ampla classe de substratos *in vitro*, sendo por isso denominadas esterases não-específicas.

Dados genéticos, bioquímicos e moleculares têm sido usados para estabelecer o relacionamento entre as diferentes esterases. Critérios bioquímicos



permitiram distinguir duas classes de esterases: esterases-A (esterases aromáticas ou arilesterases, EC 3.1.1.2) que participam da hidrólise dos ésteres aromáticos (por exemplo, o fenilacetato) e não são inibidas por organofosforados (podendo até mesmo hidrolisá-los) e esterases-B (esterases alifáticas ou aliesterases) que são inibidas por esses compostos (Aldrige, 1953). Essa inibição se dá através de uma fosforilação irreversível de um resíduo de serina em seu centro ativo (Junge, 1984).

Estudos mais refinados permitiram a divisão das esterases em quatro classes principais: arilesterases, carboxilesterases, colinesterases e acetilesterases. Essas classes foram definidas com base na sua especificidade ao substrato, sua sensibilidade a diferentes tipos de inibidores e no resíduo de aminoácido do seu centro ativo. Admite-se que esterases similares estão relacionadas quanto à sequência de aminoácidos, à estrutura e, possivelmente, quanto à sua função, *in vivo* (Healy *et al.*, 1991).

As arilesterases (EC 3.1.1.2) também designadas esterases A ou esterases aromáticas, apresentam uma hidrólise preferencial por ésteres aromáticos e são sensíveis a compostos mercuriais. Existem poucas informações a respeito das suas propriedades moleculares. Nos mamíferos, as arilesterases estão associadas a partículas de lipoproteínas de alta densidade do plasma (Junge & Klees, 1984).

As carboxilesterases (EC 3.1.1.1) formam um grupo de enzimas não-específicas amplamente distribuídas na natureza, que como o próprio nome diz, participam da hidrólise de ésteres carboxílicos, entre os quais incluem-se ésteres alifáticos, ésteres aromáticos, amidas aromáticas e tioésteres com preferência aos ésteres formados por radicais acila de cadeia curta (Junge, 1984). As carboxilesterases mais bem estudadas são as que ocorrem em fígado de mamíferos, inclusive no homem (Huang *et al.*, 1994, Morgan *et al.*, 1994). A maioria dessas carboxilesterases, são proteínas triméricas, isto é, esterases com 3 subunidades idênticas, cada uma com peso molecular de 60 kd (kilodaltons), contendo um centro ativo em cada subunidade. O papel fisiológico destas enzimas não é ainda conhecido. Alguns autores acreditam que elas participem do metabolismo de ésteres ou amidas, auxiliando o sistema de desintoxicação do organismo (Heymann, 1980, Junge, 1981).

As colinesterases, enzimas que hidrolisam ésteres de colina, encontram-se subdivididas em acetilcolinesterases (EC 3.1.1.7) e pseudocolinesterases (EC 3.1.1.8). As acetilcolinesterases estão localizadas nas membranas de algumas células de vertebrados (por exemplo, eritrócitos) e



invertebrados. Essa enzima controla a corrente iônica nas membranas excitáveis e desempenha um papel essencial nos processos de condução nervosa e nas junções neuromusculares (Whittaker, 1984). Nos insetos, a deficiência de acetilcolinesterase é letal no estágio embrionário e sua inibição causa a morte. Duas classes de compostos, os inseticidas organofosforados e os carbamatos, são utilizados como inibidores, quase irreversíveis, destas enzimas. A conformação destes compostos é análoga à estrutura do substrato natural das acetilcolinesterases, a acetilcolina (Mutero *et al.*, 1994). Essa propriedade tem sido empregada na produção de inseticidas (Fournier *et al.*, 1992). Já as pseudocolinesterases podem ser distinguidas das acetilcolinesterases com base na sua afinidade para vários substratos e inibidores. Uma atividade significativa das pseudocolinesterases está presente na massa cinzenta do cérebro, fígado e músculo. Seu papel fisiológico ainda não está estabelecido, mas devem estar envolvidas em processos metabólicos importantes, uma vez que são encontradas em microorganismos, tecidos vegetais e vertebrados (Soreq *et al.*, 1989, Graybiel & Ragsdale, 1982, Layer & Sporns, 1987 e Oakeshott *et al.*, 1993). No homem, a deficiência de uma pseudocolinesterase (colinesterase sérica), impede a degradação do anestésico succinilcolina, quando este é administrado a pacientes em preparação pré-operatória ou em terapia convulsiva, causando apnéia e paralisia do músculo estriado (Nora & Fraser, 1991).

As acetilesterases (EC 3.1.1.6) são diferenciadas de outras esterases pelo fato de que elas não são inibidas pelo diisopropilfosfofluoridato, nem pelo hidroximercurio benzoato ou eserina (Krish, 1971, *apud* Arav & Rimon, 1987).

As esterases são consideradas pertencentes a um grupo ou família multigênica. A origem dessas famílias multigênicas através de duplicação e subsequente modificação, constitui o ponto chave da teoria da evolução molecular nos eucariontes. Normalmente, a similaridade funcional entre proteínas reflete correlações genéticas (Myers *et al.*, 1988).

Augustinsson (1968, *apud* Myers *et al.*, 1988) propôs que as esterases são filogeneticamente relacionadas com as serino-proteases, compreendendo assim, uma família multigênica de serino-hidrolases. Algumas características das esterases e hidrolases sustentam esta hipótese. A evidência mais forte, segundo Myers *et al.* (1988), provém da análise de peptídios tripticos que contêm parte do sítio catalítico, isolado de várias carboxilesterases devido à sua ligação com o diisopropil fluorofosfato (DFP), que é análogo do substrato. As seqüências destes



peptídios têm um octapeptídio de consenso, que contém um resíduo de serina, envolvido diretamente na reação hidrolítica. O sítio catalítico de várias proteases foi isolado e caracterizado por este método e também possui um octapeptídio de consenso, incluindo uma serina. Além disso, existem outras evidências que demonstram a similaridade entre as carboxilesterases e as serino-proteases: concordância (três-em-oito) entre as duas seqüências consenso, sugerindo sua origem a partir de um ancestral comum; inativação de ambos os tipos de enzimas pelo DFP, por ligação irreversível à serina presente no centro ativo; inibição por inseticidas organofosforados e carbamatos e especificidade aos mesmos substratos.

A clonagem e o seqüenciamento dos genes de várias serino-proteases também forneceram evidências de que elas estão relacionadas entre si. Evidências indiretas suportam a hipótese de parentesco evolutivo entre estas enzimas, pois muitas serino-proteases possuem atividade esterásica e algumas colinesterases possuem um mecanismo catalítico semelhante ao das proteases (Heymann, 1980). Contudo, existem algumas indicações contrárias, apresentadas por Myers *et al.* (1988), baseadas em análises comparativas de seqüências completas entre duas acetilcolinesterases (AChE), uma da raia *Torpedo californica* e a outra de *Drosophila melanogaster*, uma butirilcolinesterase humana, e duas carboxilesterases tipo B, uma humana (EST-D) e a outra de *D. melanogaster* (Est-6). Foram encontrados valores significativamente altos de similaridade entre as seqüências completas das enzimas referidas, com exceção da EST-D em relação a qualquer das outras 4 esterases. As seqüências gênicas das quatro esterases relacionadas foram comparadas com as de outras proteínas da biblioteca da "National Biomedical Research Foundation" e apenas o gene de uma tiroglobulina bovina mostrou similaridade de seqüência à sonda derivada dos quatro genes esterásicos. Nenhuma das seqüências gênicas das serino-proteases estudadas mostrou similaridade significativa às sondas esterásicas. Os autores concluíram que as esterases não podem ser incluídas, juntamente com as serino-proteases, na família multigênica das hidrolases e, além disso, a EST-D representaria uma família diferente das outras 4 esterases. Respostas definitivas para explicar a evolução de funções similares, em grupos diferentes de enzimas, requerem mais estudos.

Como já foi dito, considera-se que, novos genes originam-se, comumente, por duplicação de locos pré-existentes com a subsequente divergência do gene duplicado. Entre as esterases, temos inúmeros casos fortemente



indicativos desta situação. Por exemplo, Brady *et al.* (1990) verificaram que o loco Est-5 (Est-5 = gene; EST-5 = proteína), de *Drosophila pseudoobscura*, reside em um *cluster* do cromossomo X que possui três genes intimamente ligados e altamente similares, Est-5A, Est-5B, e Est-5C, e podem ter evoluído a partir de um loco ancestral comum. A região cromossômica homóloga, em *D. melanogaster*, contém somente dois genes, Est-6 e Est-P (Collet *et al.*, 1990). Os três genes de *D. pseudoobscura*, foram introduzidos, individualmente, em *D. melanogaster*, através da transformação por elementos-P e revelaram que o gene da região central, Est-5B, codifica a proteína EST-5. O gene Est-5A, como o Est-P em *D. melanogaster*, produz um único transcrito, predominante no terceiro estágio larval e, o gene Est-5C parece não produzir um transcrito abundante em nenhuma fase do desenvolvimento (Brady *et al.*, 1990).

Brady & Richmond (1992) utilizaram esses dados para propor um modelo evolutivo que sugere que o gene Est-5A está linearmente relacionado com o gene Est-P. Esta observação foi baseada na similaridade da sequência flanqueadora 3', na posição relativa destes dois genes dentro dos respectivos *clusters* gênicos, de cada espécie, e no fato de que ambos transcrevem, predominantemente, no terceiro estágio larval. Possivelmente, os genes Est-5A e Est-5B originaram-se a partir de uma duplicação do gene ancestral de *D. pseudoobscura*, e este último gene está relacionado linearmente com o Est-6. Esta última suposição surgiu a partir do alinhamento do DNA codificador e da sequência flanqueadora 5', da observação de que Est-5B e Est-6 codificam produtos homólogos (isto é, enzimas com semelhança quanto às preferências para substratos, especificidade para inibidores e resposta a anticorpos), e devido a estes dois genes produzirem os dois maiores transcritos em moscas adultas. Estes dados sugerem que uma duplicação gênica neste loco ocorreu antes da divergência de *D. pseudoobscura* e *D. melanogaster*, entre 20 e 46 milhões de anos atrás. Esta duplicação provavelmente originou os genes Est-5A e Est-5B em *D. pseudoobscura* e os genes Est-P e Est-6 em *D. melanogaster*. Uma possível explicação para a origem do gene Est-5C em *D. pseudoobscura*, seria uma duplicação posterior do gene Est-5B. Entretanto, os autores não excluem a possibilidade da duplicação ter ocorrido pouco antes das espécies divergirem, seguida pela perda do gene Est-5C em *D. melanogaster*.

Segundo Devonshire & Sawicki (1979), as duplicações de genes estruturais são pré-requisitos para a evolução, porque elas permitem a ocorrência



de mutações em cópias redundantes, preservando o gene parental vantajoso. Evidências para este fenômeno são derivadas de estudos de proteínas com estruturas intimamente relacionadas, mas que apresentam papéis diferentes no metabolismo. O primeiro estágio do processo, isto é a duplicação, não seguida de mutação, leva à produção de maior quantidade do produto gênico. Isto é vantajoso durante o desenvolvimento, quando grandes quantidades dos diferentes tipos de RNA são necessárias. Segundo os mesmos autores, até aquela data, exemplos da ocorrência destes mecanismos causadores do aumento da produção de proteínas específicas, em resposta a modificações das condições ambientais, eram provenientes de estudos em bactérias, leveduras e culturas de célula eucariontes. Utilizando linhagens resistentes a inseticidas, do afídeo *Myzus persicae*, aqueles autores obtiveram evidências de duplicação gênica sem mutação subsequente, conferindo uma vantagem seletiva a organismos superiores em condições ambientais adversas.

Vários exemplos da origem de novos genes esterásicos por duplicação gênica mostram relação com a aquisição de resistência aos inseticidas. Em *Myzus persicae*, a resistência ocorre devido ao aumento da síntese de uma carboxilesterase capaz de hidrolisar e sequestrar moléculas do inseticida, antes que elas alcancem o sítio alvo. Segundo Field *et al.* (1993), existem duas esterases com estruturas muito semelhantes (E4 e FE4) as quais não foram encontradas juntas no mesmo inseto. A superprodução dessas esterases correlacionada com o alto nível de RNAm E4 e FE4, resulta da presença de um dos genes amplificados (o E4 ou o FE4). Mapas de restrição de clones do DNA genômico mostraram que esses genes são muito similares, diferindo provavelmente na extremidade 3'. Prody *et al.* (1989) observaram a amplificação de uma seqüência gênica, localizada no braço curto do cromossomo três humano, que codifica uma butirilcolinesterase, em trabalhadores agrícolas expostos a organofosforados.

Nos insetos, as esterases parecem estar envolvidas em importantes atividades fisiológicas, como a regulação dos níveis de hormônio juvenil (Kort & Granger, 1981, Jones *et al.* 1982, 1986, Hanzilick & Hammock, 1988, Hanzilick *et al.*, 1989, Rauschenbach *et al.*, 1984), processos digestivos (Kapin & Ahmad, 1980, Jones & Brancoft, 1986, Argentine & James, 1995) e a degradação de inseticidas (Motoyama & Dauterman, 1974). Outras enzimas esterásicas estão, ainda, envolvidas no comportamento reprodutivo (Ceron, 1988).



PROCESSO DE O estudo das esterases relacionadas com a degradação do hormônio juvenil tem sido realizado por muitos pesquisadores. Hanzilick *et al.* (1989) e Harshman *et al.* (1994) clonaram e seqüenciaram um gene que codifica para uma esterase (denominada JH), relacionada com a degradação deste hormônio, presente na mariposa *Heliothis virescens*, uma importante praga agrícola. O hormônio juvenil, está envolvido intimamente na regulação do desenvolvimento dos insetos, atuando na vitelogênese, na síntese e secreção das glândulas acessórias reprodutivas das fêmeas e na produção de ferormônios, entre outros. Embora os detalhes do mecanismo de ação deste hormônio não estejam totalmente conhecidos, sabe-se que sua precisa modulação é necessária para a ocorrência da oogênese, da metamorfose e de outros eventos fisiológicos do desenvolvimento dos insetos. Para que a metamorfose ocorra, o nível do hormônio juvenil deve diminuir durante o último estágio larval. A esterase JH, é membro do grupo das carboxilesterases, e possui um papel crucial na diminuição da taxa do hormônio juvenil em insetos lepidópteros, hidrolisando o metil-éster, presente neste hormônio, no momento certo. Devido à sua função, o estudo dessa enzima contribuiu para o entendimento de como a metamorfose se inicia nestes organismos. A secreção da esterase JH na hemolinfa é um dos primeiros sinais fisiológicos de que a metamorfose se inicia. No período final do desenvolvimento de algumas larvas, o próprio hormônio juvenil parece induzir a ação desta enzima, que por sua vez, o elimina da circulação. Além deste importante papel na metamorfose de *Heliothis virescens*, Harshman *et al.* (1994) sugeriram uma extensão prática dos seus resultados no desenvolvimento de novos inseticidas biológicos, baseados nos mecanismos de regulação da expressão do gene que codifica a esterase JH, visando o controle de insetos e pragas agrícolas.

ESTERASE Outra importante função das esterases está relacionada com a participação em processos digestivos. Jones & Brancroft (1986) detectaram a presença de esterases em diferentes tecidos do bicudo-do-algodão *Anthonomus grandis*, analisados separadamente (intestino, túbulos de Malpighi, corpo gorduroso, testículos e ovários) e, encontraram cinco locos esterásicos polimórficos, com algumas variantes eletroforéticas. A esterase EST-4 foi encontrada em maior quantidade e foi detectada no intestino, relacionada com a digestão dos alimentos ingeridos. Argentine & James (1995) identificaram três esterases características da glândula salivar de fêmeas e machos adultos de *A. aegypti*. A saliva de insetos hematófagos contém um grande número de proteínas e enzimas que facilitam o



processo de alimentação, como por exemplo, inibidores da agregação de plaquetas, agentes vasodilatadores, anticoagulantes e enzimas associadas com a ingestão de açúcar. A esterase com maior atividade e de maior massa molecular (65 kd) foi denominada EST-SG e nenhuma outra enzima correspondente foi encontrada em outras fases do desenvolvimento ou em outros tecidos do corpo. As duas outras esterases detectadas na glândula salivar apresentaram uma atividade menor do que a EST-SG e, uma delas foi detectada em todos os estádios do desenvolvimento, enquanto que a outra (a de menor atividade), está relacionada a uma esterase ligada ao exoesqueleto adulto. Nos machos a atividade da EST-SG foi menor e mais constante do que nas fêmeas, nas quais esta enzima atinge altos picos de atividade entre o segundo e terceiro dias de vida após a eclosão.

Como já foi dito, algumas enzimas esterásicas estão ainda envolvidas no comportamento reprodutivo. São muitos os exemplos que mostram espécies nas quais um dos sexos apresenta esterases exclusivas, sendo denominadas esterases sexo-específicas. No gênero *Drosophila*, por exemplo, Ceron (1988) demonstrou que *D. arizonensis* apresenta uma beta-esterase, denominada EST-9, presente só nos machos e uma alfa-esterase, a EST-7 que ocorre só nas fêmeas. Em *D. melanogaster*, uma carboxilesterase denominada EST-6, presente no fluido seminal e encontrada predominantemente no bulbo ejacatório dos machos, parece estar envolvida nos processos reprodutivos desta espécie. Essa esterase não é exclusiva desse tecido, nem dos machos, e tem sido objeto de muitos estudos (Mane *et al.*, 1983 a, b, Labate *et al.*, 1989).

A relação entre a atividade das esterases e a degradação de inseticidas tem sido muito estudada. Em geral, a ação de carbamatos, organofosforados e piretróides, nos insetos, ocorre pela inibição de colinesterases e/ou carboxilesterases. Por outro lado, esses compostos podem ser metabolizados em produtos inócuos, nesses organismos, pela ação de carboxilesterases e/ou fosfatases (Sudderuddin & Lim, 1978).

Estudos comparativos entre linhagens sensíveis e resistentes a organofosforados, realizados em *Tribolium castaneum* (Mackness *et al.*, 1983), *Culex pipiens* (Maruyana *et al.*, 1984, Bonning *et al.*, 1991) e *Musca domestica* (Kao *et al.*, 1985) demonstraram que, no geral, a atividade de carboxilesterases, capazes de hidrolisar aqueles compostos, é bem maior nas linhagens resistentes. Entretanto, há controvérsias quanto aos eventos moleculares responsáveis por essa atividade pois, em muitos casos, não é possível distinguir se o desenvolvimento do fenômeno



de resistência é decorrente de mutação(ões) produzindo uma enzima com maior atividade em relação a esses compostos, ou é devido à síntese aumentada de uma enzima pré-existente nas linhagens sensíveis, da qual tenha se originado.

Experimentos moleculares têm mostrado que os mecanismos de resistência parecem envolver três tipos de mudanças, no nível do DNA: mutações em ponto nos genes estruturais, mudanças nos genes reguladores e amplificação do DNA (Besansky *et al.*, 1992).

✂ Entre os mosquitos, as espécies de *Culex* têm sido o principal objeto de estudos moleculares de resistência a inseticidas. Em *Culex*, um mecanismo comum de resistência a inseticidas organofosforados é o aumento da desintoxicação, devido à superprodução de uma ou ambas as esterases não específicas A e B (Mouches *et al.*, 1987). Segundo esses autores, existem grandes diferenças na sequência de aminoácidos entre as enzimas A e B. Assim, se os genes que codificam essas enzimas originaram-se da duplicação de um gene ancestral comum, este fato deve ter ocorrido há muito tempo atrás.

Uma aleloenzima (B1) da esterase B, foi purificada a partir de uma linhagem resistente a organofosforados, de *Culex quinquefasciatus*, denominada Tem-R. Nesta linhagem, a esterase B1 foi 500 vezes mais abundante do que na linhagem susceptível (Lab-S), da mesma espécie. Mouches *et al.* (1986), clonaram o gene responsável pela síntese de esterase B1 em *Culex quinquefasciatus*, utilizaram o fragmento clonado como sonda e observaram que as linhagens Tem-R apresentavam pelo menos 250 cópias a mais do gene que codifica esta enzima quando comparadas às linhagens susceptíveis (Lab-S). Raymond *et al.* (1989) demonstraram que amplificações gênicas ocorriam em populações naturais, e que eram responsáveis pelo aumento da atividade de diferentes alelos da esterase B, (B1, B2, B3 e B4) de *Culex*. Segundo Mouches *et al.* (1990) evidências indicam que a amplificação de cada gene esterásico B ocorreu como um evento único e independente.

A natureza do evento de amplificação foi bem estudada para esterase B1 da linhagem Tem-R (Mouches *et al.*, 1990). Esses autores observaram que a resistência dessa linhagem a inseticidas resultou da amplificação do gene esterásico B1 e de uma grande quantidade de DNA que ladeia este gene. Para chegar a esta conclusão, os autores seqüenciaram e caracterizaram o gene da esterase B1 e da estrutura da unidade de amplificação (amplicom). A unidade de amplificação possui aproximadamente 30 kb (kilobases) e contém uma sequência



constante e altamente conservada de 25 kb, que é chamada de *core*. Esse *core* é a parte comum de várias unidades de amplificação. O gene esterásico (que possui 2,8 kb) está incluído dentro do *core*, em cópia única. As seqüências heterogêneas que se estendem dos lados do *core*, resultaram, provavelmente, de rearranjos que ocorreram durante o processo de amplificação. Essas seqüências são formadas por segmentos moderadamente repetidos de vários tamanhos. No *core*, o gene esterásico é ladeado por duas seqüências de DNA (denominadas CE1, na extremidade 5' e CE2 na extremidade 3') que se encontram repetidas em outras partes do genoma do mosquito resistente e são encontradas, também, no genoma do mosquito sensível, mas, não próximas ao gene esterásico B1. Os autores sugerem que essas seqüências repetidas têm uma função no processo de amplificação.

Mapas de restrição da seqüência gênica da esterase B2 no DNA genômico de 6 linhagens resistentes, de *Culex pipiens*, mostraram que, da mesma forma que a unidade amplificada da esterase B1, a unidade amplificada da esterase B2 consiste de cerca de 30 kb de DNA contendo um único gene esterásico (Raymond *et al.*, 1991).

O processo de amplificação do alelo da esterase B parece ter envolvido o aumento gradual do número de cópias. Esta hipótese é suportada pela observação de que o nível de resistência a organofosforados, devido à esterase B1, em mosquitos Tem-R, tem aumentado significativamente ao longo do tempo (Besansky *et al.*, 1992).

Embora a esterase B não se expresse em todos os tecidos ou estádios do desenvolvimento, todos os tipos celulares examinados, incluindo gametas, contêm o gene amplificado (Raymond & Pasteur, 1989). Uma vez amplificado, o gene que confere resistência ao inseticida pode se espalhar rapidamente, na população, até atingir escala global (Raymond *et al.*, 1991).

Raymond *et al.* (1993) verificaram que os genes amplificados nas linhagens resistentes Tem-R (gene B1 amplificado) e Se Lax (gene B2 amplificado) continuam presentes até 3 anos (aproximadamente 60 gerações) após a remoção completa do inseticida. Isto contrasta com o observado em *Myzus persicae* por Devonshire & Field (1991, *apud* Raymond *et al.*, 1993) no qual a expressão do gene esterásico amplificado, que confere resistência, é perdida após poucas gerações, na ausência de exposição a inseticidas.



A análise molecular de outros genes que conferem resistência a inseticidas tem sido feita em várias espécies de mosquitos. A acetilcolinesterase (AChE) é o alvo para inseticidas organofosforados e carbamatos. Formas inativas do gene AChE têm sido encontradas em mosquitos resistentes. Análises da sequência de aminoácidos revelou 69% de homologia entre a AChE de *Drosophila melanogaster* e de *Anopheles stephensi* (Hall & Malcolm, 1991, *apud* Besansky *et al.*, 1992). Através de hibridização *in situ*, duas localizações diferentes para o gene da AChE foram encontradas, nos cromossomos politênicos de *A. stephensi*, sendo uma próxima do telômero do cromossomo 2R e a outra próxima do centrômero do cromossomo 3L. Entretanto, essas localizações são incertas, porque análises de Southern Blot indicam a presença de somente 1 loco. Em *A. albimanus*, o gene AChE está localizado na extremidade telomérica do cromossomo 2R, a qual deve ser também a verdadeira localização para *A. stephensi*.

✂ Assim, utilizando variadas técnicas, diferentes autores, em diferentes organismos, têm procurado obter informações relativas às esterases, abrangendo aspectos tais como sua caracterização bioquímica, seu papel fisiológico, suas características genéticas e mecanismos reguladores. Embora, como vimos, um grande número de dados tenham sido obtidos nesses estudos, muito ainda resta por elucidar.

✂ Em *Aedes aegypti*, a utilização de técnicas de eletroforese permitiu demonstrar que a espécie pode ser dividida em grupos de populações, em bases genéticas e geográficas (Wallis *et al.*, 1984).

No presente trabalho foram analisados os padrões de esterases, no decorrer do desenvolvimento, das espécies *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, com os objetivos de verificar diferenciação entre as duas espécies, quanto a esse parâmetro e quanto à existência de variações no decorrer das diferentes fases do ciclo biológico, indicativas da presença de mecanismos reguladores agindo no desenvolvimento e diferenciação. Objetivou-se também verificar uma possível relação entre os padrões detectados e o desenvolvimento de resistência em área intensamente submetida ao controle populacional com inseticidas.

II. MATERIAL E MÉTODOS



1. Origem das Amostras

Foram analisados indivíduos de duas espécies do gênero *Aedes*, *A. aegypti* e *A. albopictus*.

As amostras de *A. aegypti* foram obtidas de duas localidades diferentes: (1) do Laboratório de criação da Superintendência de Campanhas de Endemias (SUCEN) da cidade de Marília - SP, e (2) amostras coletadas na cidade de São José do Rio Preto - SP, em criadouros formados em depósitos de detritos (latas, garrafas e pneus, entre outros).

A cidade de São José do Rio Preto tem sido intensamente submetida a nebulizações com inseticidas de base de piritróides. De acordo com informações obtidas na SUCEN, no período em que este trabalho foi desenvolvido, foram realizadas quatro ciclos, de uma semana de duração cada, em 1993 (início 21/05 - término 16/07), 16 ciclos em 1994 (início 28/03 - término 27/05) e 22 ciclos em 1995 (início 10/01 - término 29/06). As amostras de São José do Rio Preto, utilizadas neste trabalho, foram coletadas pelo pessoal da SUCEN, ao longo desses três anos, dentro e fora dos períodos de nebulizações.

As amostras de *A. albopictus* foram obtidas no Laboratório de criação da SUCEN, da cidade de Taubaté - SP.

As amostras de *A. aegypti* e de *A. albopictus*, obtidas nos criadouros da SUCEN, foram transferidas para o laboratório na forma de ovos fixados em tiras de papel absorvente, ou na forma de larvas. Já as amostras de *A. aegypti* de São José do Rio Preto, que foram obtidas na natureza, foram transferidas para o laboratório com a água do local de coleta.

No laboratório, as amostras foram colocadas em bacias de plástico, contendo água. As larvas foram alimentadas com ração para peixe. No caso de ovos, as larvas eram colocadas na água e a permanência até eclosão. A cada dois dias a água era trocada e adicionava-se novo suprimento de alimento. Conforme atingiam os estágios desejados, as amostras foram congeladas a -20°C para posterior análise.

II. MATERIAL E MÉTODOS

No presente trabalho, foram analisadas as fases de larvas de 2º, 3º e 4º estágios (L2, L3 e L4), pupas e adultos machos (M) e fêmeas (F). O número de indivíduos analisados em cada fase do desenvolvimento, nas três populações das duas espécies, consta da Tabela 1.



1. Origem das Amostras

Foram analisados indivíduos de duas espécies do gênero *Aedes*: *A. aegypti* e *A. albopictus*.

As amostras de *A. aegypti* foram obtidas de duas localidades diferentes: (1) do Laboratório de criação da Superintendência de Campanhas Endêmicas (SUCEN), da cidade de Marília - SP, e (2) amostras coletadas na cidade de São José do Rio Preto - SP, em criadouros formados em depósitos de detritos (latas, garrafas e pneus, entre outros).

A cidade de São José do Rio Preto tem sido intensamente submetida a nebulizações com inseticidas a base de piretróides. De acordo com informações obtidas na SUCEN, no período em que este trabalho foi desenvolvido, foram realizados quatro ciclos, de uma semana de duração cada, em 1993 (início 21/06 - término 16/07), 18 ciclos em 1994 (início 28/03 - término 27/05) e 22 ciclos em 1995 (início 16/01 - término 29/05). As amostras de São José do Rio Preto, utilizadas neste trabalho, foram coletadas pelo pessoal da SUCEN, ao longo desses três anos, dentro e fora dos períodos de nebulizações.

As amostras de *A. albopictus* foram obtidas no Laboratório de criação da SUCEN, da cidade de Taubaté - SP.

As amostras de *A. aegypti* e de *A. albopictus*, obtidas nos criadouros da SUCEN, foram transferidas para o laboratório na forma de ovos fixados em tiras de papel absorvente, ou na forma de larvas. Já as amostras de *A. aegypti* de São José do Rio Preto, que foram obtidas na natureza, foram transferidas para o laboratório com a água do local de coleta.

No laboratório, as amostras foram colocadas em bacias de plástico, contendo água. As larvas foram alimentadas com ração para peixe. No caso de ovos, as tiras eram colocadas na água e aí permaneciam até eclosão. A cada dois dias a água era trocada e colocava-se novo suprimento de alimento. Conforme atingiam os estádios desejados, as amostras foram congeladas a -20°C para posterior análise.

No presente trabalho, foram analisadas as fases de larvas de 2°, 3° e 4° estádios (L2, L3 e L4), pupas e adultos machos (M) e fêmeas (F). O número de indivíduos analisados, em cada fase do desenvolvimento, nas três populações das duas espécies, consta da Tabela 1.



2. Preparo dos Géis

O gel de poliacrilamida, usado neste trabalho, é formado por uma reação de polimerização entre a acrilamida e seu monômero de ligação cruzada, a bisacrilamida (N, N'-metileno-bis-acrilamida), transformando-se em uma espécie de "malha" por onde as proteínas podem ser separadas. Uma variação no tamanho dos poros existente nesta malha pode ser obtida modificando a proporção acrilamida/bisacrilamida que determina a porcentagem de ligações cruzadas ou variando a concentração do gel. No presente trabalho, os géis foram preparados na concentração de 8% (T%) com 2,6% de ligações cruzadas (C%).

As soluções estoque e tampões empregados foram adaptados dos trabalhos de Davis (1964) e Laemmli (1970). Fazem parte dos géis os seguintes

Tabela 1. Número de indivíduos analisados, em cada fase do desenvolvimento, nas 3 populações, das duas espécies. L2 = larva de 2º estágio; L3 = larva de 3º estágio; L4 = larva de 4º estágio; F = fêmeas; M = machos.

	L2	L3	L4	Pupas	Adultos		Total
					F	M	
<i>A. aegypti</i> Marília	439	274	239	323	153	157	1585
<i>A. aegypti</i> São José do Rio Preto	255	190	162	120	61	58	846
<i>A. albopictus</i> Taubaté	183	144	230	162	68	100	887

Os volumes de água e demais componentes utilizados para o preparo de 30 ml a 8% são os seguintes:

Água	14,0 ml
Tampão do gel (1,5 M, pH 8,8)	5,0 ml
Solução de acrilamida/bis	7,5 ml
Persulfato de amônia a 2%	0,45 ml
TEMED	25 µl

Esta solução será acondicionada entre duas placas de vidro de 15 x 17 x 0,5 cm para polimerização. As placas serão presas por garras com um espaço



2. Preparo dos Géis

O gel de poliacrilamida, usado neste trabalho, é formado por uma reação de polimerização entre a acrilamida e seu comonômero de ligação cruzada, a bisacrilamida (N, N', metileno-bis-acrilamida), transformando-se em uma espécie de "malha" por onde as proteínas podem ser separadas. Uma variação no tamanho dos poros existentes nesta malha pode ser obtida modificando a proporção acrilamida/bisacrilamida que determina a porcentagem de ligações cruzadas ou variando-se a concentração do gel. No presente trabalho, os géis foram preparados na concentração de 8% (T%) com 2,6% de ligações cruzadas (C%).

As soluções estoques e tampões empregados foram adaptados dos trabalhos de Davis (1964) e Laemmli (1970). Fazem parte dos géis os seguintes componentes:

- Solução de acrilamida/bisacrilamida, preparada com 30 g de acrilamida e 0,8 g de bisacrilamida dissolvidas em água em um volume final de 100 ml. Essa solução é mantida em geladeira, em frasco escuro.
- Tampão do gel: Tris 1,5 M ajustado a pH 8,8 com HCl 6M. Deve ser mantido em frasco escuro.
- Solução de persulfato de amônio a 2% (recém-preparada). O persulfato de amônio em pó deve ser armazenado em dessecador para evitar sua hidratação.
- TEMED (N, N, N, N, tetrametilenodiamina) com aproximadamente 99% de pureza, este deve ser o último componente adicionado à solução, dando início à polimerização.

Os componentes c e d atuam como catalisadores da reação de polimerização.

Os volumes de água e demais componentes utilizados para o preparo de 30 ml a 8% são os seguintes:

Água_____	14,0 ml
Tampão do gel (1,5 M) pH 8,8_____	8,0 ml
Solução de acrilamida/bis_____	7,5 ml
Persulfato de amônia a 2%_____	0,45 ml
TEMED_____	25 µl

Esta solução era acondicionada entre duas placas de vidro de 15 x 17 x 0,5 cm para polimerização. As placas eram presas por garras com um espaço



entre elas formado pela introdução de espaçadores de acrílico, com um milímetro de espessura, colocados nos lados e no bordo inferior. Para a vedação, colocava-se uma camada de vaselina, com o auxílio de uma seringa, entre os espaçadores. Uma das placas apresenta um recorte com dois centímetros de profundidade, no qual era adaptado um pente de acrílico, com 15 ou com 20 dentes, para a formação dos poços de aplicação das amostras. As placas contendo a solução eram mantidas por 30 minutos no escuro para formação do gel, após o que, o pente e o espaçador inferior eram retirados e as placas dispostas, na posição vertical, em uma cuba de acrílico, com o auxílio de quatro garras. O modelo da cuba possibilitava a adaptação de dois conjuntos de placas ao mesmo tempo, permitindo a análise simultânea de 30 ou 40 amostras (dependendo do pente de acrílico utilizado no preparo dos géis).

3. Preparo das Amostras e Condições de Eletroforese

As amostras foram maceradas em grupos de 5 indivíduos para larvas de 2º estágio, em grupos de 3 indivíduos para larvas de 3º estágio e, individualmente, para larvas de 4º estágio, pupas e adultos a 0°C em 25 µl do tampão de amostra (Tris 0,1 M pH 8,8, contendo glicerol a 10%) e em seguida centrifugadas a 3000 rpm, em centrífuga clínica da marca Celm, por três minutos. Para cada amostra utilizou-se um volume de 10 µl do sobrenadante para a eletroforese. Após a aplicação das amostras, os géis foram submetidos à eletroforese por duas horas e trinta minutos, a uma voltagem constante de 200 V, utilizando-se para o preenchimento dos compartimentos superior e inferior da cuba, um tampão Tris-glicina 0,1 M pH 8,3.

4. Tratamento dos Géis para a Identificação das Esterases

A identificação das bandas com atividade esterásica, nos géis, foi baseada nos métodos de coloração descritos por Johnson *et al.* (1966) e Steiner & Johnson (1973) modificados por Ceron (1988). Os géis foram pré-incubados por 60 minutos, à temperatura ambiente, em 50 ml de tampão fosfato 0,1 M pH 6,2. A seguir, o tampão foi retirado e adicionada a solução de coloração constituída de 50 ml de tampão fosfato 0,1 M pH 6,2 contendo 15 mg de beta-naftil acetato e 30 mg de alfa-naftil acetato (previamente solubilizados em 1 ml de acetona ou metanol), 60 mg de Fast Blue RR e 5 ml de N-propanol. Após a coloração por uma hora, na ausência de luz e à temperatura ambiente, as esterases são visualizadas nos géis como bandas de coloração preta ou vermelha, indicando, respectivamente, a



hidrólise preferencial de alfa ou beta-naftil acetato. As reações que levam a essa visualização estão descritas na Figura 1.

Em alguns experimentos foram testadas concentrações diferentes de α e β -naftil acetatos para verificar a atividade diferencial das esterases de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* frente a esses substratos. As mesmas amostras foram submetidas a 3 outras soluções de coloração:

- a. solução contendo apenas o α -naftil acetato (45 mg),
- b. solução contendo apenas o β -naftil acetato (45 mg)
- c. solução contendo os dois substratos, nas quantidades de 15 mg de α e 30 mg de β -naftil acetato.

Após a coloração, os géis foram tratados com 100 ml de uma solução de descoloração contendo álcool etílico comercial, ácido acético e água na proporção de 2:1:8, por 24 a 48 horas. Em seguida, os géis foram mantidos em uma solução de ácido acético a 7,5% e glicerol a 10% até o momento da secagem

As bandas foram diferenciadas pela sua posição no gel, que se refere à mobilidade eletroforética, e quanto ao padrão de coloração, que reflete sua especificidade ao substrato. Esses padrões foram determinados por uma análise comparativa entre as populações, isto é, as bandas presentes em uma população foram numeradas em relação à posição das bandas da outra população. Para este estudo comparativo, amostras das populações foram analisadas num mesmo gel procurando, assim, evitar erros de interpretação quando são comparadas eletroforeses realizadas separadamente.

5. Secagem dos Géis

A secagem dos géis foi realizada como descrito em Ceron *et al.* (1992). Inicialmente os géis são banhados numa solução de gelatina comercial a 5%, prensados em um bastidor entre duas folhas de papel celofane e deixados à temperatura ambiente por três a quatro dias para a secagem. Com este procedimento os géis sofrem desidratação, transformando-se em uma fina película entre as folhas de celofane que são recortadas e guardadas para a análise.



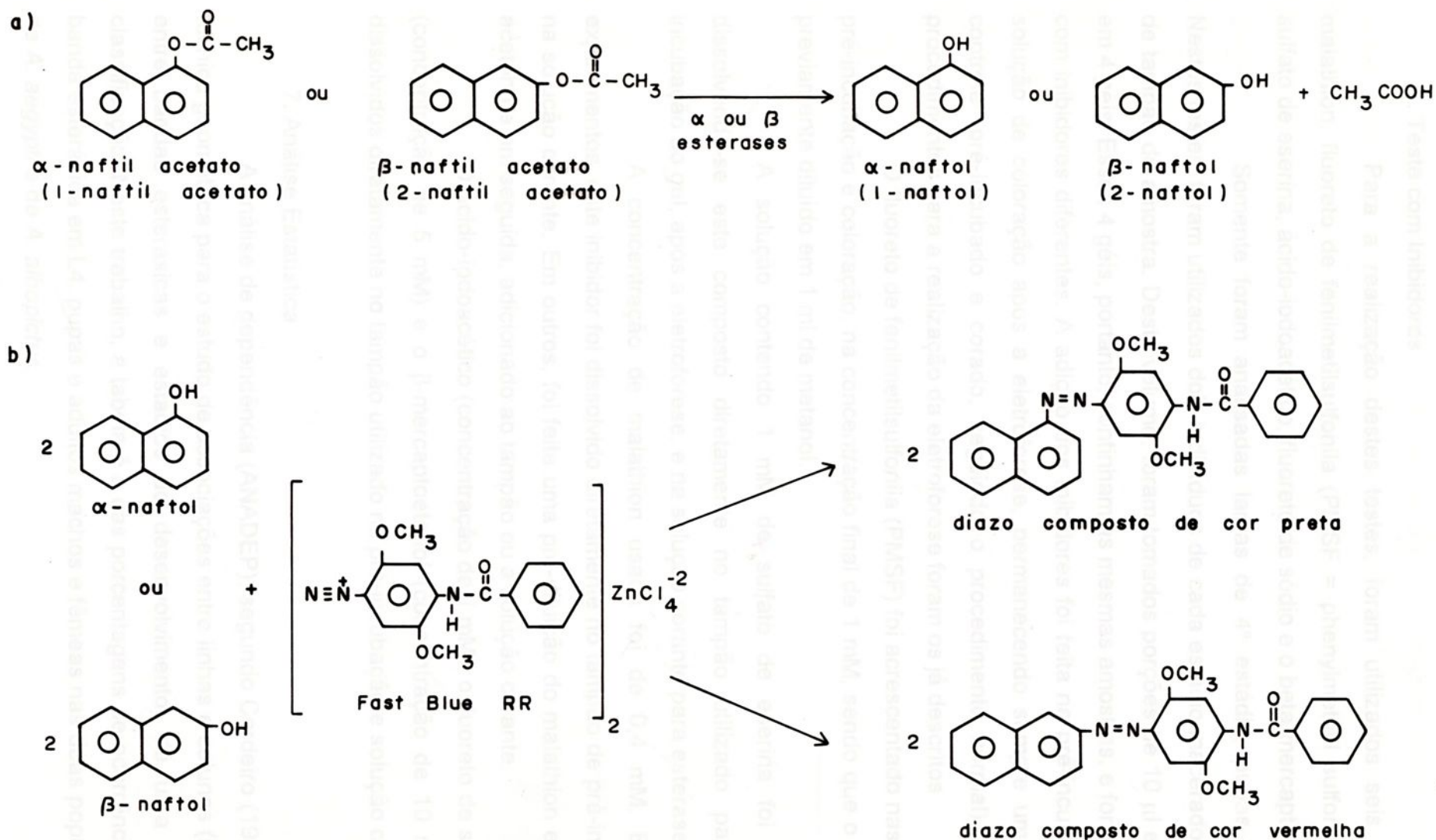


Figura 1 - Reações envolvidas na identificação das α ou β esterases, por coloração (segundo Ceron, 1988).

6. Teste com Inibidores

Para a realização destes testes, foram utilizados seis inibidores: malathion, fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF = phenylmethyl sulfonyl fluoride), sulfato de eserina, ácido-iodoacético, fluoreto de sódio e o beta-mercaptoetanol.

Somente foram analisadas larvas de 4º estágio, pupas e adultos. Nestes testes, foram utilizados dois indivíduos de cada estágio macerados em 50 µl de tampão de amostra. Deste volume, foram tomados porções de 10 µl e aplicados em 4 géis. Esses 4 géis, portanto, continham as mesmas amostras, e foram testados com inibidores diferentes. A adição dos inibidores foi feita na pré-incubação, e na solução de coloração após a eletroforese, permanecendo sempre um gel como controle (pré-incubado e corado, seguindo o procedimento normal). Os outros procedimentos para a realização da eletroforese foram os já descritos.

O fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) foi acrescentado nas etapas de pré-incubação e coloração, na concentração final de 1 mM, sendo que o mesmo foi previamente diluído em 1 ml de metanol.

A solução contendo 1 mM de sulfato de eserina foi preparada dissolvendo-se este composto diretamente no tampão utilizado para a pré-incubação do gel, após a eletroforese, e na solução corante para esterases.

A concentração de malathion usada foi de 0,4 mM. Em alguns experimentos, este inibidor foi dissolvido diretamente no tampão de pré-incubação e na solução corante. Em outros, foi feita uma pré-diluição do malathion em 1 ml de acetona e em seguida, adicionado ao tampão ou à solução corante.

O ácido-iodoacético (concentração de 1 mM), o fluoreto de sódio - NaF (concentração de 5 mM) e o β-mercaptoetanol (concentração de 10 mM) foram dissolvidos diretamente no tampão utilizado na pré-incubação e solução corante.

7. Análise Estatística

A análise de dependência (ANADEP), segundo Cordeiro (1987), é uma técnica geométrica para o estudo de associações entre linhas e colunas (neste caso entre bandas esterásicas e estádios do desenvolvimento) de uma tabela de classificação. Neste trabalho, a tabela é a das porcentagens de ocorrência de cada banda esterásica em L4, pupas e adultos machos e fêmeas nas duas populações de *A. aegypti* e de *A. albopictus*.



O coeficiente de co-dependência (δ) na ANADEP mede a associação entre os estádios nas espécies. Ele varia em $-1 < \delta \leq 1$ e, quando for igual a 1 significa que as frequências e bandas são totalmente iguais. Quanto mais próximo de -1, mais díspares vão ficando as frequências das bandas nos estádios, isto é, quando em um determinado estádio, uma banda tem frequência alta, no outro tende a tê-la baixa.

III. RESULTADOS



1. *Aedes aegypti*

1.1. Análises das bandas e sua distribuição

Os resultados obtidos neste estudo, referentes à análise de 2431 indivíduos, estão apresentados na Tabela 1. Foram analisados 1585 de Marília (439 larvas de 2ª, 274 de 3ª, 239 de 4ª, 223 pupas e 150 adultos fêmeas e 157 adultos machos) e 846 de São José do Rio Preto (255 larvas de 2ª, 190 de 3ª, 162 de 4ª, 120 pupas e 61 adultos fêmeas e 58 adultos machos). Um total de 23 bandas com características específicas foi encontrada ao longo do desenvolvimento nos indivíduos das duas populações.

Na Figura 2 temos uma representação esquemática (zimograma) das bandas características encontradas em *A. aegypti* em ambas as populações analisadas e nas faixas larvais (L2, L3, L4), pupas e adultos de ambos os sexos. Um gel completo é mostrado na Figura 3.

Como foi mencionado em Materiais e Métodos, o α -nftal e o β -nftal acetato funcionam como substratos para as enzimas esterases. Quando geladas, estas substâncias coram as bandas com ambos os substratos. A proporção de 30 mg de α e 15 mg de β acetato nas bandas de número 1 a 16, 22 e 23 coram com o α -nftal e as bandas de número 17 e 21 com o β -nftal. Modificando-se as quantidades das substâncias (proporção de 15 mg de α e 30 mg de β -nftal acetato), o resultado não se alterou. Dessa maneira, as bandas de 1 a 16, 22 e 23 coram com o α -nftal, enquanto as bandas 17 e 21 coram com o β -nftal. Como esperado nos experimentos com o substrato α , foi observado o coramento de bandas de 1 a 16, 22 e 21 (bandas α) não se coraram ou coraram-se muito pouco quando se utilizou o substrato β acetato. Entretanto, quando se utilizou o substrato β -nftal acetato, as bandas de 17 e 21 coraram-se muito intensamente. Esses resultados são específicos para o substrato β -nftal. Entretanto, quando se utilizou o substrato α -nftal acetato, as bandas de 17 e 21 coraram-se muito pouco. Esses resultados são específicos para o substrato α -nftal. Portanto, a análise de 23 bandas é suficiente para a identificação de indivíduos de *A. aegypti* (Figuras 4 a 6).

III. RESULTADOS

Na amostra de *A. aegypti* de Marília foram encontradas 23 bandas (Tabela 2). Das bandas, todas as faixas de número 1 a 16, 22 e 23 coram com o substrato α -nftal acetato e as faixas de número 17 e 21 coram com o substrato β -nftal acetato. As bandas de número 1 a 16, 22 e 23 coram com o substrato α -nftal acetato e as faixas de número 17 e 21 coram com o substrato β -nftal acetato.

1. *Aedes aegypti*

1.1. Análise das bandas e sua distribuição

Os resultados obtidos neste estudo, referem-se à análise de 2431 indivíduos, sendo 1585 de Marília (439 larvas de 2º estágio, 274 de 3º, 239 de 4º, 323 pupas e 153 adultos fêmeas e 157 adultos machos) e 846 de São José do Rio Preto (255 larvas de 2º estágio, 190 de 3º, 162 de 4º, 120 pupas e 61 adultos fêmeas e 58 adultos machos). Um total de 23 bandas com atividade esterásica foi encontrado, ao longo do desenvolvimento, nos indivíduos das duas populações.

Na Figura 2 temos uma representação esquemática (zimograma) das bandas esterásicas encontradas em *A. aegypti*, em ambas as populações analisadas e nas fases larvais (L2, L3, L4), pupas e adultos de ambos os sexos. Um gel comparativo é mostrado na Figura 3.

Como foi mencionado em Material e Métodos, o α -naftil e o β -naftil acetatos funcionam como substratos para as enzimas esterásicas. Quando géis das duas populações foram submetidos à coloração com ambos os substratos (proporção de 30 mg de α e 15 mg de β -naftil acetato), as bandas de número 1 a 16, 22 e 23 coraram-se com o α -naftil e as bandas de número 17 a 21 com o β -naftil. Modificando-se as quantidades dessas duas substâncias (proporção de 15 mg de α e 30 mg de β -naftil acetato), o resultado não se alterou. Dessa maneira, as bandas de 1 a 16, 22 e 23 foram denominadas bandas α , enquanto as bandas 17 a 21, bandas β . Como esperado, nos experimentos onde apenas o substrato α foi utilizado, as bandas 17 a 21 (bandas β) não se coraram ou coraram-se muito fracamente, reforçando a indicação de que elas são específicas para o substrato β -naftil. Entretanto, quando apenas este estava presente na solução de coloração, todas as bandas se coraram, mostrando que as bandas de número 1 a 16, 22 e 23 (bandas α), na ausência do substrato α , também hidrolisam o β (Figuras 4 a 6).

Na amostra de *A. aegypti* de Marília foram encontradas 22 bandas esterásicas (Tabela 2). Seis bandas foram comuns a todas as fases analisadas (1, 2, 7, 13, 14 e 16), três bandas ocorreram em larvas e pupas (bandas 11, 12 e 20). Oito bandas (3, 4, 5, 6, 9, 18, 22 e 23) foram encontradas apenas nas fases larvais



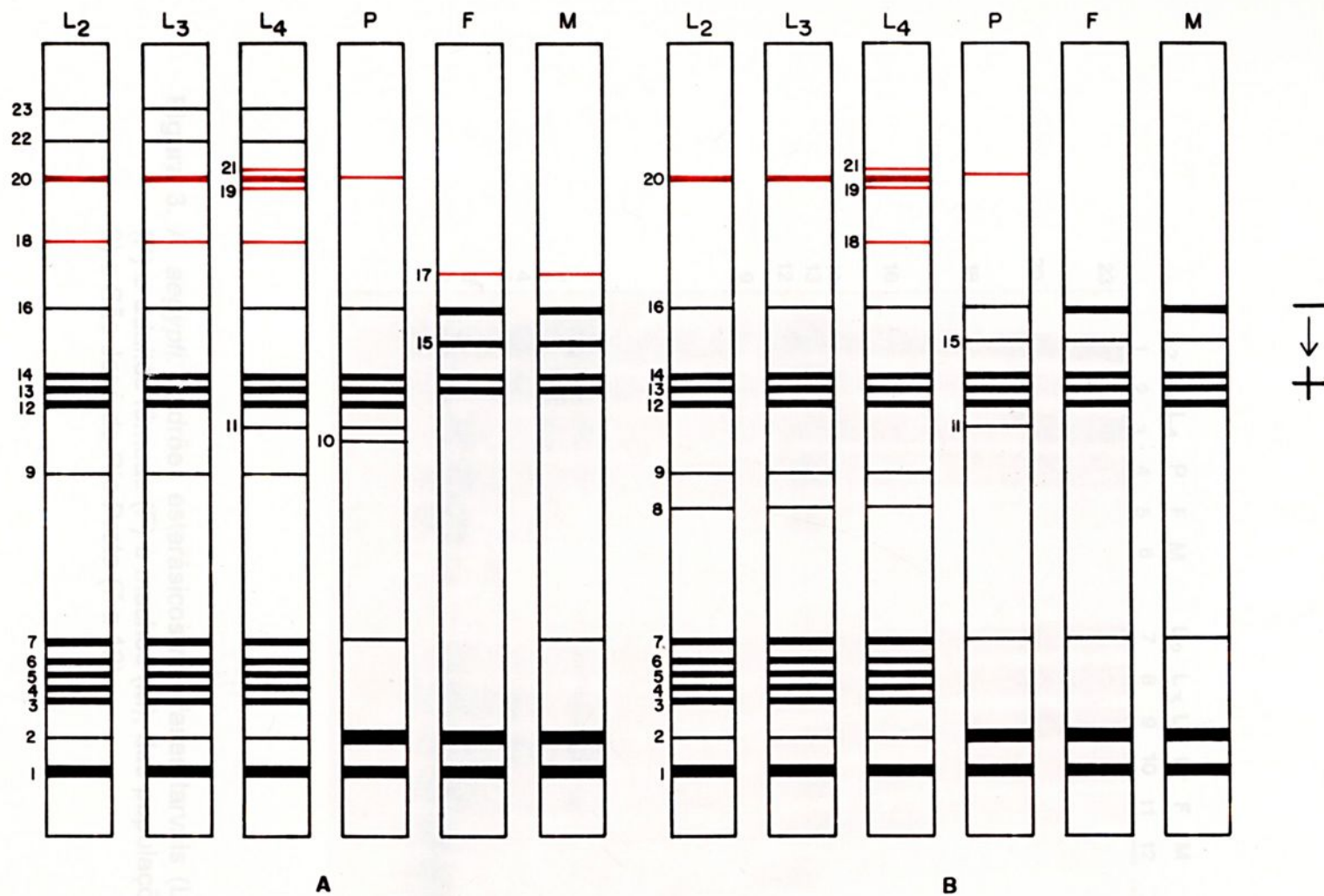


Figura 2 - Padrão de bandas esterásicas, observados em larvas (L₂ a L₄), pupas (P) e adultos (fêmeas - F e machos - M) de *A. aegypti* de Marília (A) e São José do Rio Preto (B).

Bandas α (—), Bandas β (—)

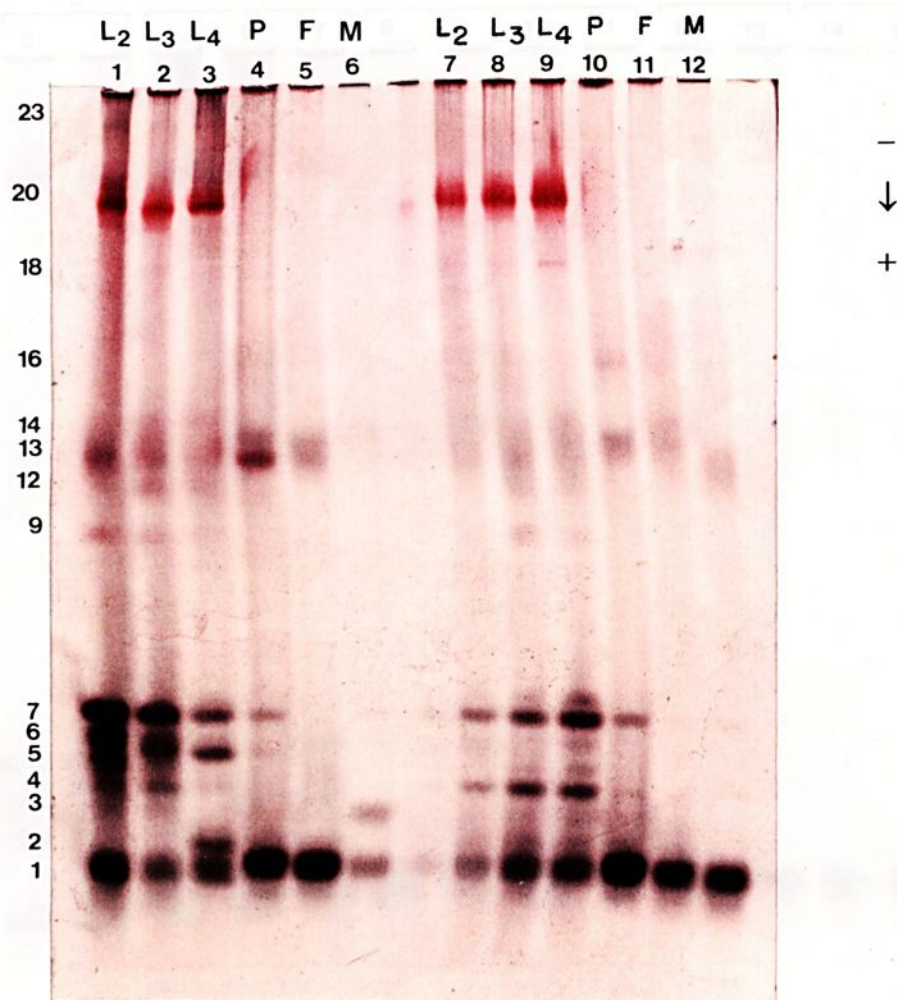


Figura 4. *A. aegypti*. Bandas esterásicas no desenvolvimento, em gel submetido

Figura 3. *A. aegypti*. Padrões esterásicos nas fases larvais (L2, L3, L4), pupas (P) e adultos fêmeas (F) e machos (M), das populações de Marília (1 a 6) e São José do Rio Preto (7 a 12).

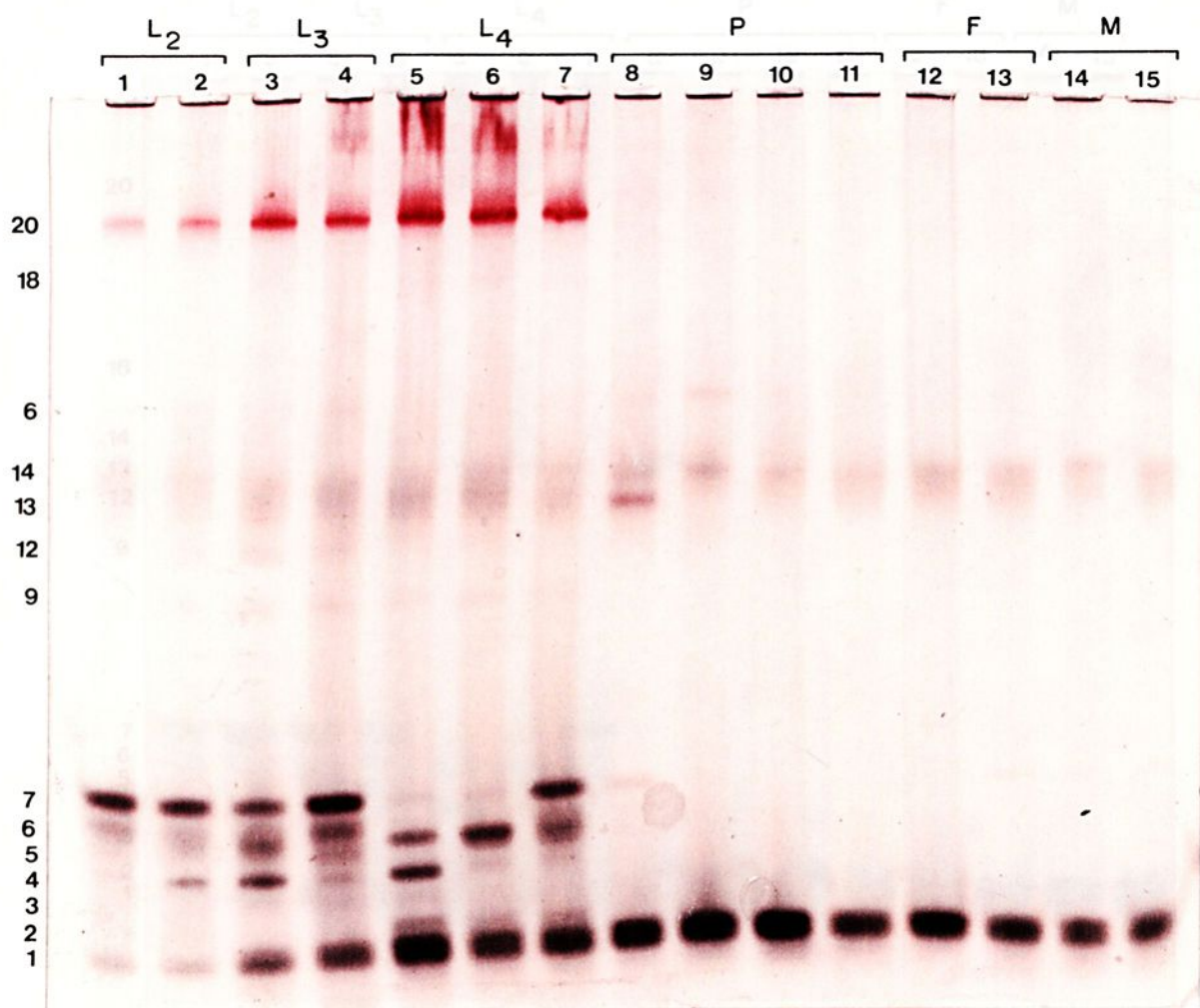


Figura 4. *A. aegypti*. Bandas esterásicas no desenvolvimento, em gel submetido à coloração com α e β -naftil acetatos nas quantidades de, respectivamente, 30 mg e 15 mg.

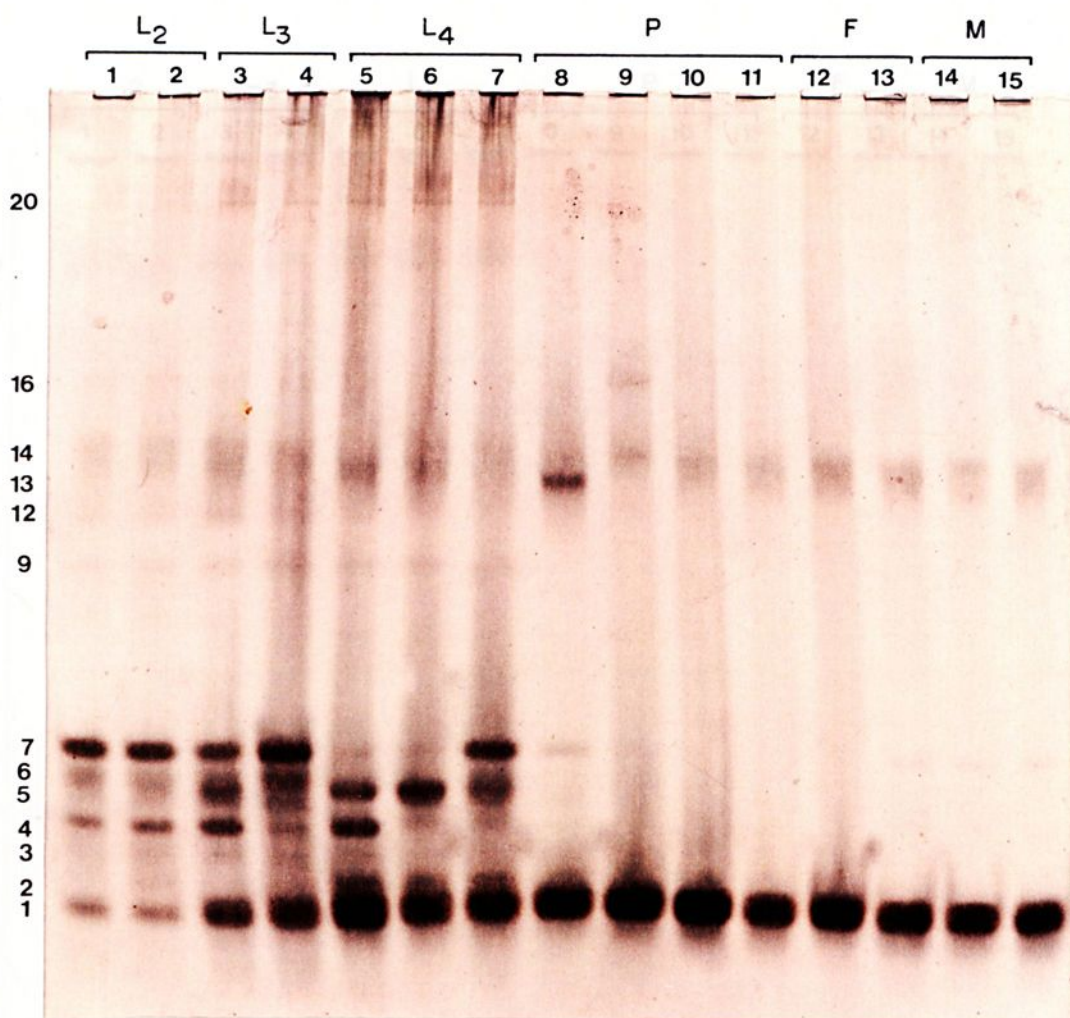


Figura 5. *A. aegypti*. Bandas esterásicas no desenvolvimento, em gel submetido à coloração com α -naftil acetato na quantidade de 45 mg.

Tabela 2. Distribuição das bandas esterásicas encontradas nas amostras de *A. aegypti* de Marília, em cada fase analisada.

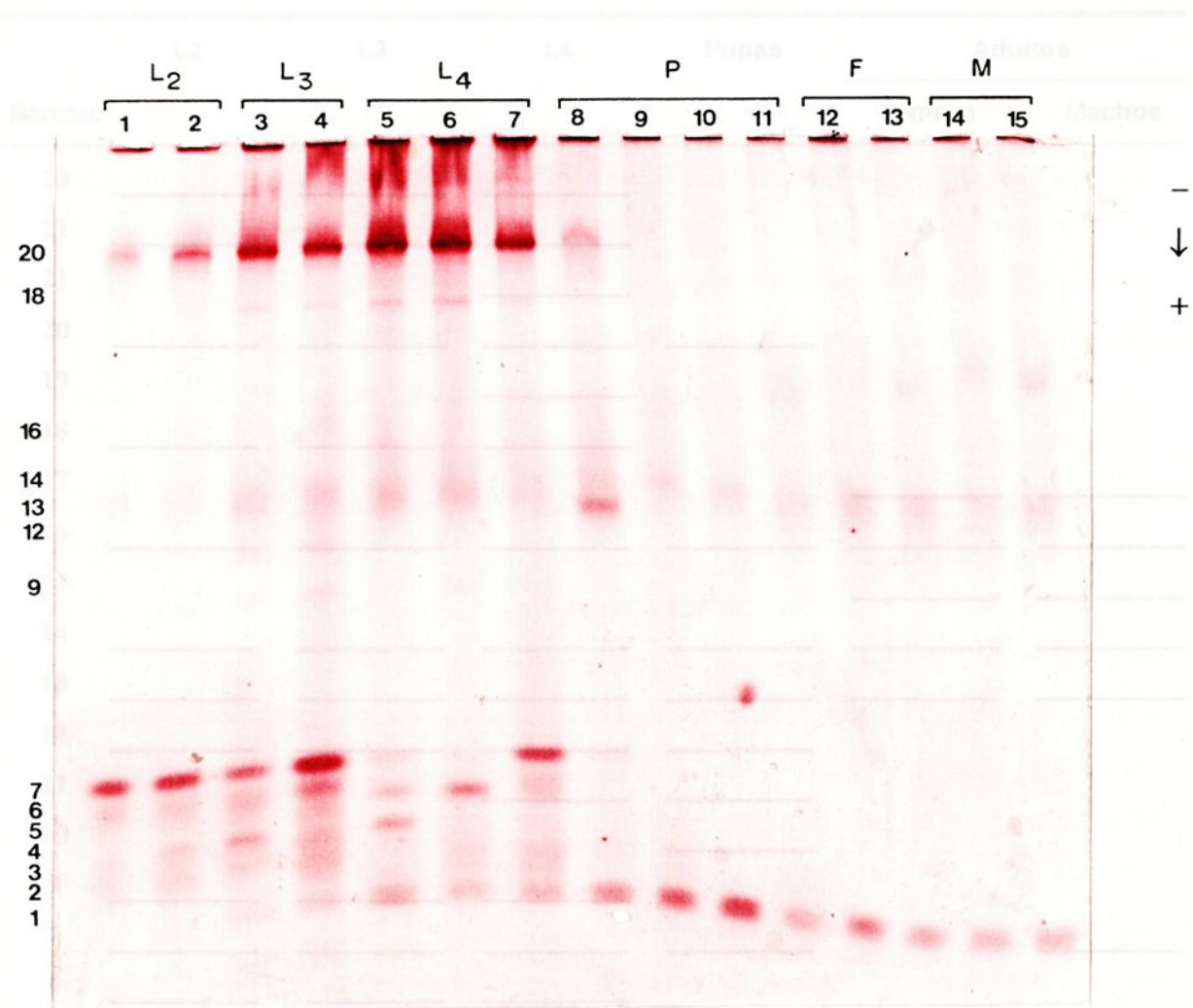


Figura 6. *A. aegypti*. Bandas esterásicas no desenvolvimento, em gel submetido à coloração com β -naftil acetato na quantidade de 45 mg.

Tabela 2. Distribuição das bandas esterásicas encontradas nas amostras de *A. aegypti* de Marília, em cada fase analisada.

Bandas	L2	L3	L4	Pupas	Adultos	
					Fêmeas	Machos
23	_____	_____	_____			
22	_____	_____	_____			
21						
20	_____	_____	_____	_____		
19			_____			
18	_____	_____	_____			
17					_____	_____
16	_____	_____	_____	_____	_____	_____
15					_____	_____
14	_____	_____	_____	_____	_____	_____
13	_____	_____	_____	_____	_____	_____
12	_____		_____			
11			_____			
10				_____		
9	_____	_____	_____			
7	_____	_____	_____	_____		_____
6	_____	_____	_____			
5	_____	_____	_____			
4	_____	_____	_____			
3	_____	_____	_____			
2	_____	_____	_____	_____	_____	_____
1	_____	_____	_____	_____	_____	_____

(L2 a L4). Duas bandas só foram encontradas nas larvas de 4º estágio (19 e 21). A banda número 10 foi observada na fase de pupa e as bandas 15 e 17 nos adultos. A Figura 7 mostra 11 das 22 bandas detectadas nessas amostras. A variabilidade do padrão de bandas das amostras de L2 e L3 é menor que das demais fases, pelo fato de se referirem, respectivamente, a cinco e três indivíduos.

Em *A. aegypti*, coletados em São José do Rio Preto, foram encontradas 19 bandas com atividade esterásica (Tabela 3). São comuns a todas as fases analisadas, as bandas de nº 1, 2, 7, 12, 13, 14 e 16. As bandas 3, 4, 5, 6, 8 e 9 só foram encontradas nas fases larvais (L2 a L4). Três bandas foram encontradas somente nas larvas de 4º estágio (18, 19 e 21). A banda de número 11 foi encontrada exclusivamente na fase de pupa. A banda 20 foi encontrada em larvas e pupas e a 15 em pupas e adultos. Na Figura 8, são vistas 13 das 19 bandas observadas nas amostras de São José do Rio Preto.

Foram observadas variações quanto à espessura e à intensidade de coloração das bandas, em diferentes indivíduos de uma mesma população. A banda 1, porém, foi constante em ambas as características, apresentando-as no grau mais acentuado, detectado no estudo, em ambas as populações.

A banda 2 apresentou espessura semelhante à da banda 1, nas pupas e nos adultos. Nas fases larvais apresentou-se visivelmente mais delgada. Quanto à intensidade de coloração, quando as bandas 1 e 2 ocorrem, simultaneamente, ambas apresentam-se mais claras. Essas observações também são válidas para as duas populações.

Dados quanto à frequência das bandas, nas duas populações, constam das Tabelas 4 e 5 e das Figuras 9, 10 e 11. Esses dados foram obtidos para L4, pupas e adultos, pois somente nestas fases foi possível analisar os indivíduos isoladamente. Na Figura 9 são apresentados gráficos das duas populações de *A. aegypti* em que constam as frequências de todas as bandas encontradas.

Verifica-se que a banda 1 foi a de maior frequência nas duas populações, estando presente em 100% dos indivíduos analisados, em todas as fases, e em ambos os sexos da fase adulta. Seguem-se com frequência elevada, porém variável entre as fases do desenvolvimento, as bandas 13, 14 e 16 na população de Marília e as bandas 13 e 14 na população de São José do Rio Preto. A banda 16 na amostra de São José do Rio Preto, embora presente em todos os



Tabela 3. Distribuição das bandas esteréotípicas encontradas nas amostras de *A. aegypti* de São José do Rio Preto, em cada fase analisada.

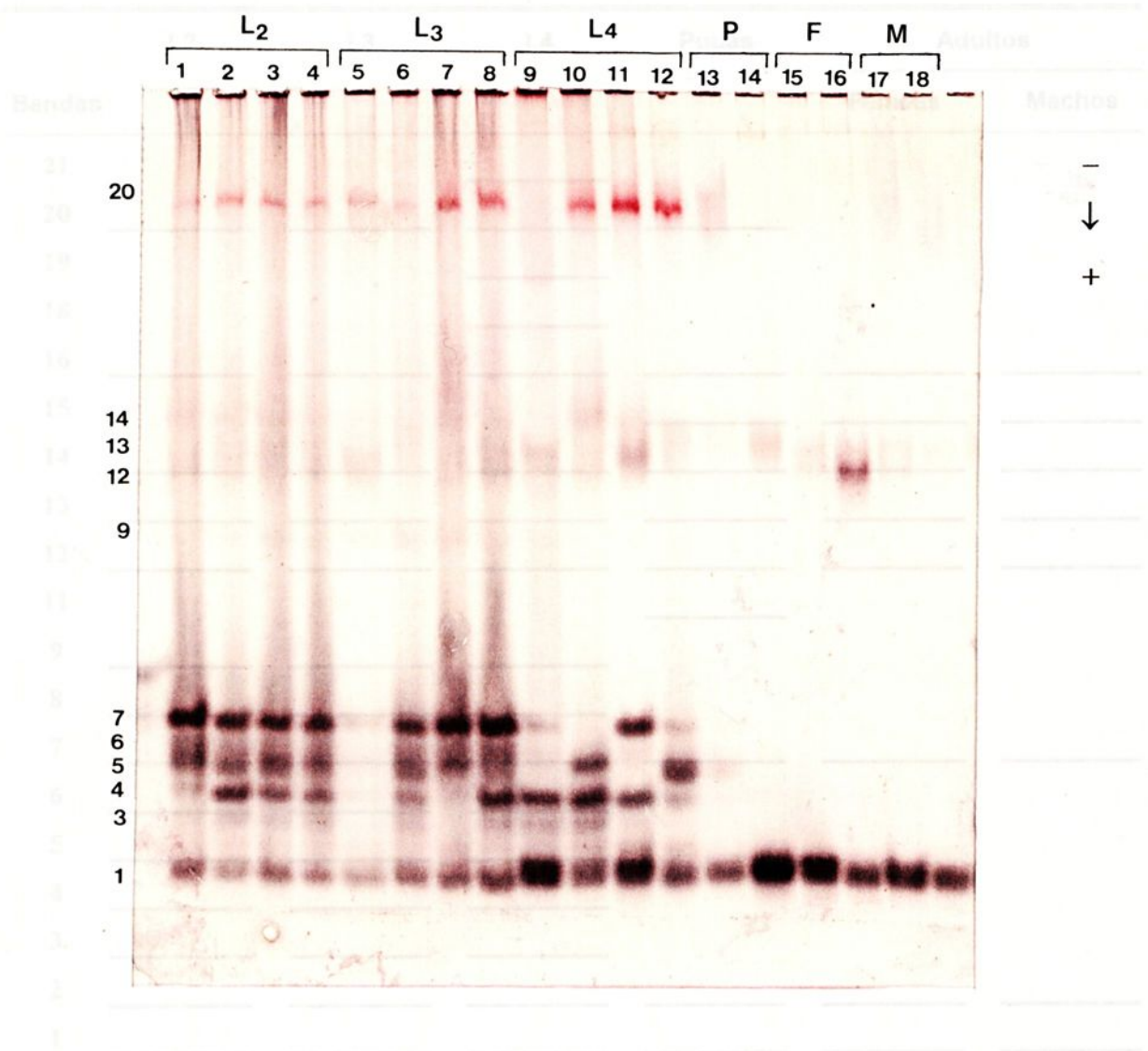


Figura 7. *A. aegypti*. Gel contendo 11 das 22 bandas detectadas nas amostras de Marília. Observe-se a redução do número de bandas nas fases de pupa e adultos.

Tabela 3. Distribuição das bandas esterásicas encontradas nas amostras de *A. aegypti* de São José do Rio Preto, em cada fase analisada.

Bandas	L2	L3	L4	Pupas	Adultos	
					Fêmeas	Machos
21						
20						
19						
18						
16						
15						
14						
13						
12						
11						
9						
8						
7						
6						
5						
4						
3						
2						
1						

São José do Rio Preto

Tabela 4. Frequência (%) de indivíduos portadores das bandas esteréicas encontradas nas amostras de *A. aegypti* de Marília, em cada fase analisada.

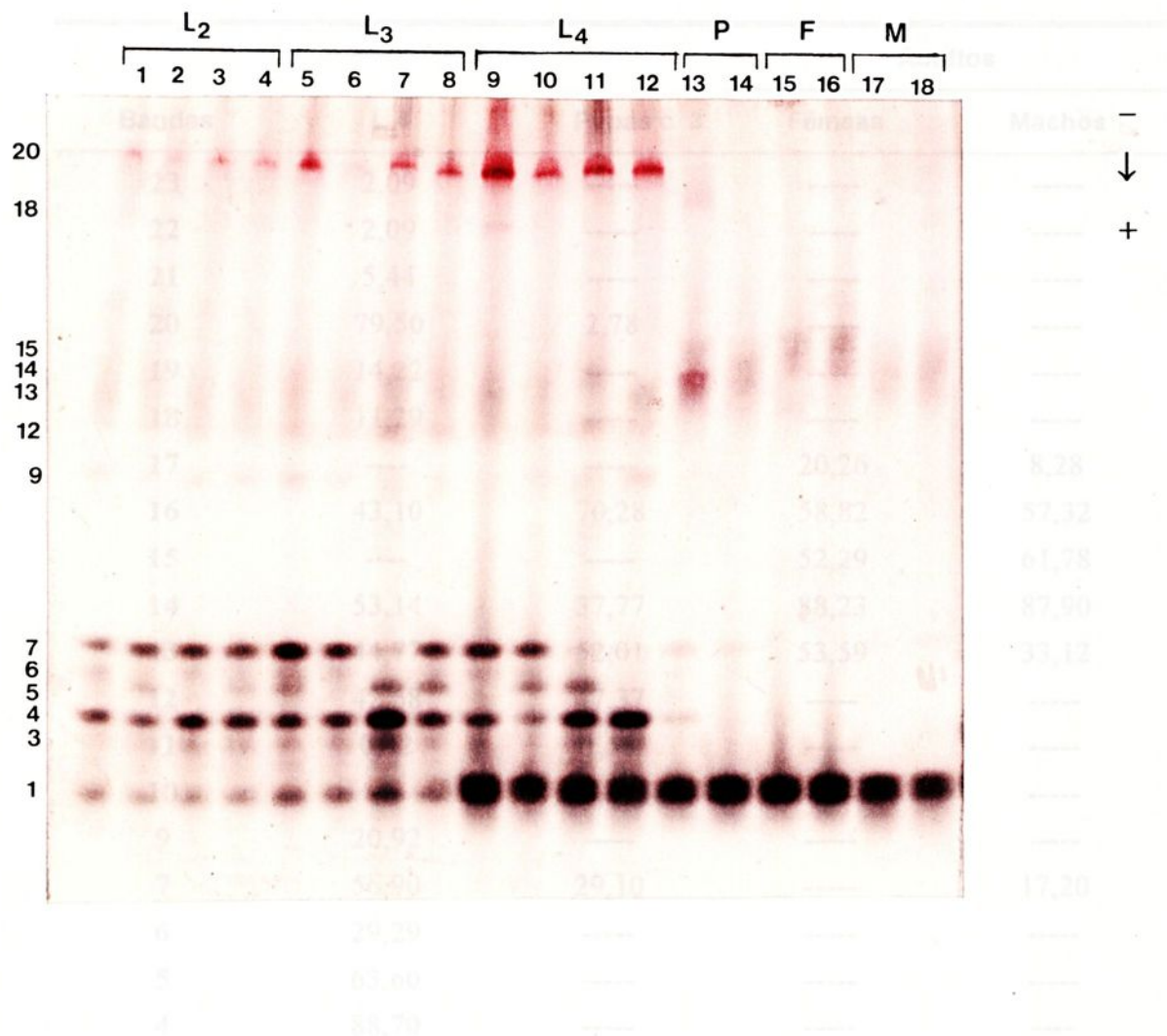


Figura 8. *A. aegypti*. Gel contendo 13 das 18 bandas detectadas nas amostras de São José do Rio Preto.

Tabela 4. Frequência (%) de indivíduos portadores das bandas esterásicas encontradas nas amostras de *A. aegypti* de Marília, em cada fase analisada.

Bandas	L 4	Pupas c 3	Adultos	
			Fêmeas	Machos
23	2,09	-----	-----	-----
22	2,09	-----	-----	-----
21	5,44	-----	-----	-----
20	79,50	2,78	-----	-----
19	14,22	-----	-----	-----
18	11,29	-----	-----	-----
17	----	-----	20,26	8,28
16	43,10	70,28	58,82	57,32
15	----	-----	52,29	61,78
14	53,14	37,77	88,23	87,90
13	44,77	52,01	53,59	33,12
12	42,68	47,37	-----	-----
11	0,42	1,55	-----	-----
10	---	0,31	-----	-----
9	20,92	-----	-----	-----
7	56,90	29,10	-----	17,20
6	29,29	-----	-----	-----
5	63,60	-----	-----	-----
4	88,70	-----	-----	-----
3	56,48	-----	-----	-----
2	6,70	2,17	5,23	5,09
1	100,00	100,00	100,00	100,00

Tabela 5. Frequência (%) de indivíduos portadores das bandas esterásicas encontradas nas amostras de *A. aegypti* de São José do Rio Preto, em cada fase analisada.

Bandas	L 4	Pupas	Adultos	
			Fêmeas	Machos
21	0,62	-----	-----	-----
20	82,72	10,00	-----	-----
19	0,62	-----	-----	-----
18	1,85	-----	-----	-----
16	12,96	55,83	8,19	15,51
15	-----	2,50	22,96	8,62
14	51,85	49,17	75,41	48,27
13	52,47	60,00	60,65	77,58
12	53,70	50,00	13,11	46,55
11	-----	0,83	-----	-----
9	50,00	-----	-----	-----
8	24,69	-----	-----	-----
7	64,20	1,33	44,26	13,79
6	40,12	-----	-----	-----
5	53,09	-----	-----	-----
4	85,80	-----	-----	-----
3	86,10	-----	-----	-----
2	6,79	2,50	26,23	34,48
1	100,00	100,00	100,00	100,00



Trebatoski & Haynes (1969) analisaram larvas de 4º estágio em eletroforese de gel de amido, tendo como substrato o α -naftil acetato, e encontraram também 6 bandas esterásicas.

Quanto a *A. albopictus*, Tadano (1987) utilizando géis de ágar, encontrou 5 bandas com atividade esterásica que foram designadas EST-1 a EST-5 em ordem de mobilidade decrescente.

É normalmente aceito que, em iguais condições experimentais, proteínas que migram na mesma posição são geneticamente as mesmas (Richardson & Smouse, 1976). Portanto, na tentativa de caracterizar as bandas, no presente trabalho, foram usadas diferentes soluções de coloração para detectar possíveis diferenças entre as bandas que apresentavam uma mesma mobilidade eletroforética. Assim, foi verificada a especificidade ao α e ao β -naftil acetato isoladamente, e em misturas de ambos em concentrações variadas.

Johnson *et al.* (1966) observaram que a especificidade ao α ou β -naftil acetato é fracamente definida, de modo que se α ou β -naftil acetatos são usados, separadamente, como substratos, em géis de uma mesma espécie, são obtidos padrões de bandas semelhantes e nenhuma especificidade é detectada. Segundo os mesmos autores, a única variação no gel é quanto à coloração, vermelha ou azul escuro.

No presente trabalho, entretanto, usando α ou β -naftil acetatos, separadamente, nas amostras de *A. aegypti* das duas populações, notamos que nem todas as esterases que hidrolisam o β -naftil acetato apresentam a capacidade de hidrolisar o α -naftil acetato. Assim as bandas 17 a 21 não se coraram quando apenas o substrato α foi utilizado na solução de coloração. Por outro lado, todas as esterases que hidrolisaram o α eram também capazes de hidrolisar o β -naftil acetato.

Em *A. albopictus* quando apenas o α -naftil foi utilizado, as bandas 15 a 17 não se coraram, mostrando que elas somente são capazes de hidrolisar o β -naftil acetato. Um comportamento diferenciado durante o desenvolvimento foi observado quando apenas o β -naftil acetato estava presente na solução de coloração. Na fase larval as esterases correspondentes às bandas (4 a 6) específicas para o α -naftil conseguem, na ausência deste, hidrolisar o β -naftil. Já nas pupas e nos adultos essas mesmas enzimas não conseguem hidrolisar o β -naftil. Esta diferença entre as fases larvais e adulta pode ser devida a uma quantidade maior da enzima na fase



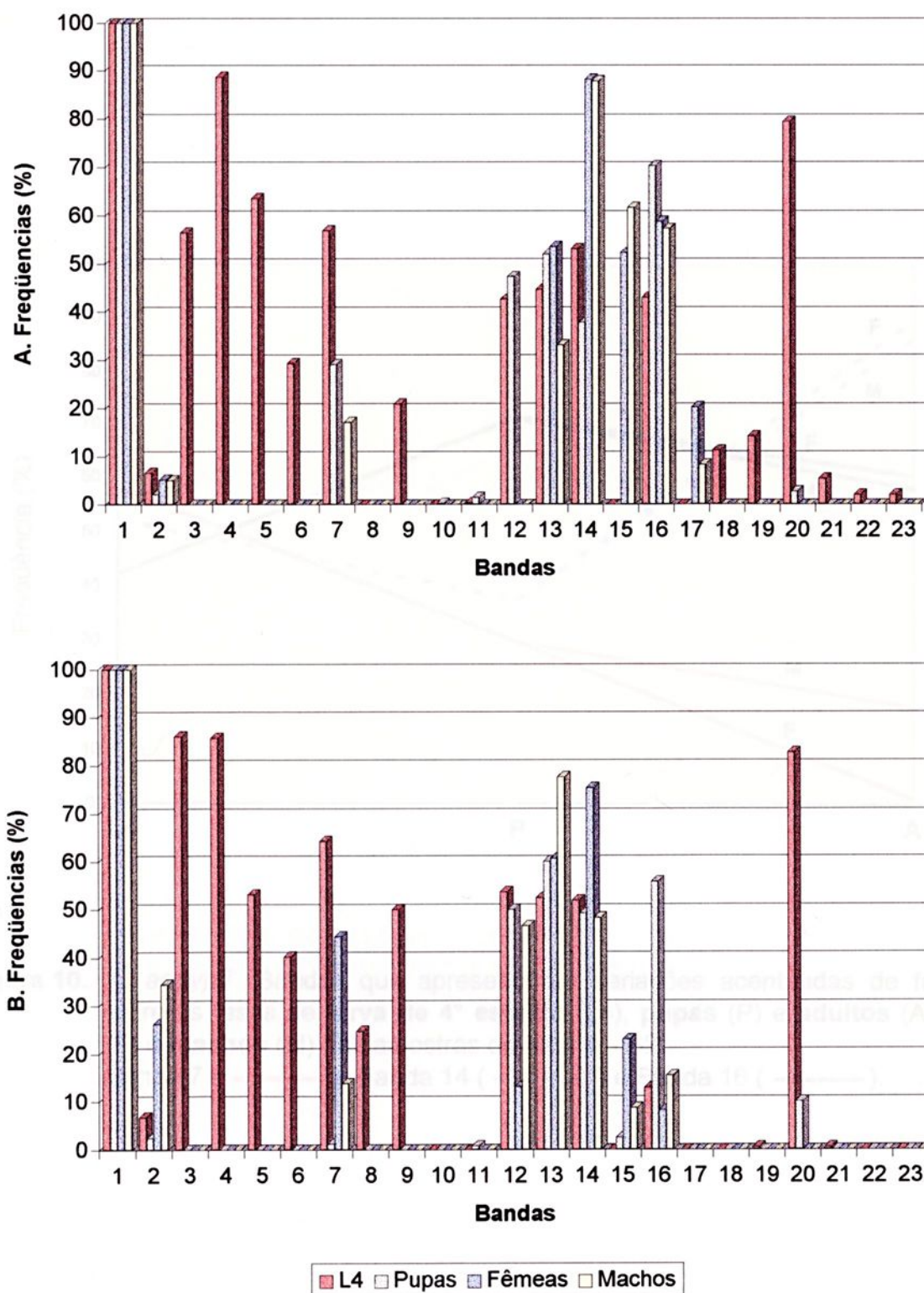


Figura 9. Distribuição das freqüências (%) das bandas esterásicas detectadas nas fases de L4, pupas e adultos, nas populações de *A. aegypti* de Marília (A) e de São José do Rio Preto (B).

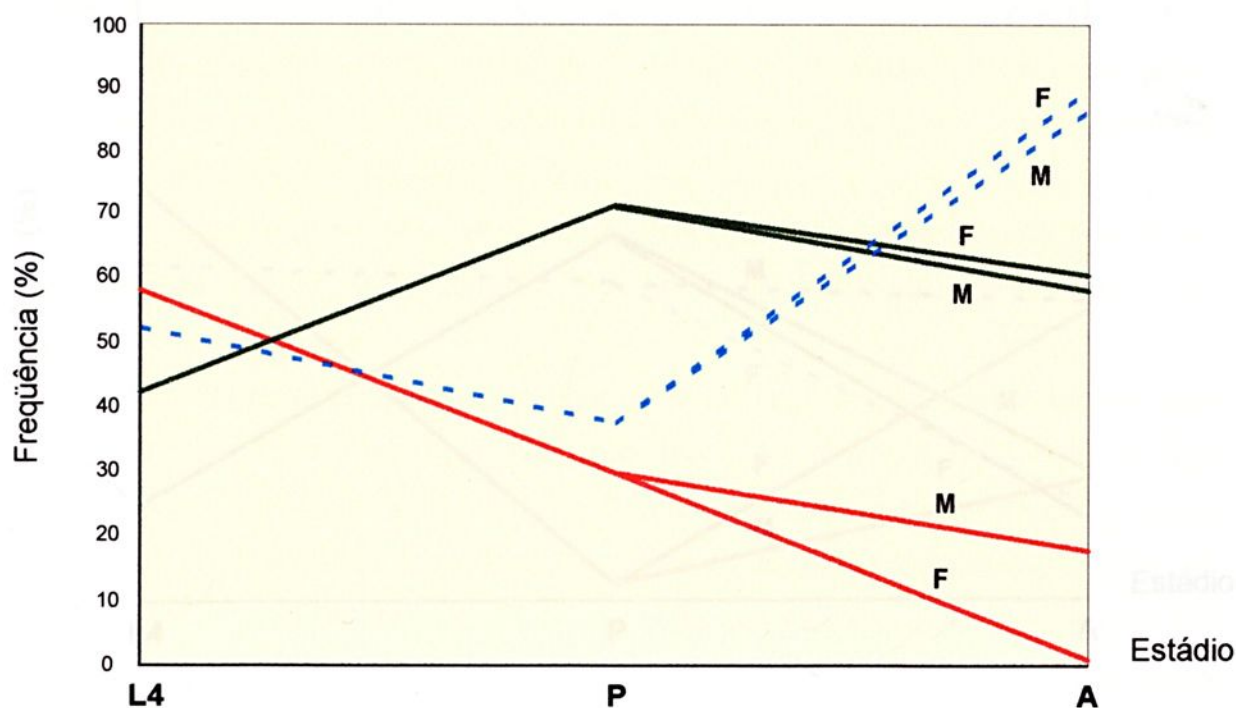


Figura 10. *A. aegypti*. Bandas que apresentaram variações acentuadas de frequência entre as fases de **larva de 4º estágio (L4)**, **pupas (P)** e **adultos (A) fêmeas (F)** e **machos (M)** nas amostras de Marília - SP.
Banda 7 (—), Banda 14 (- - -) e Banda 16 (—).

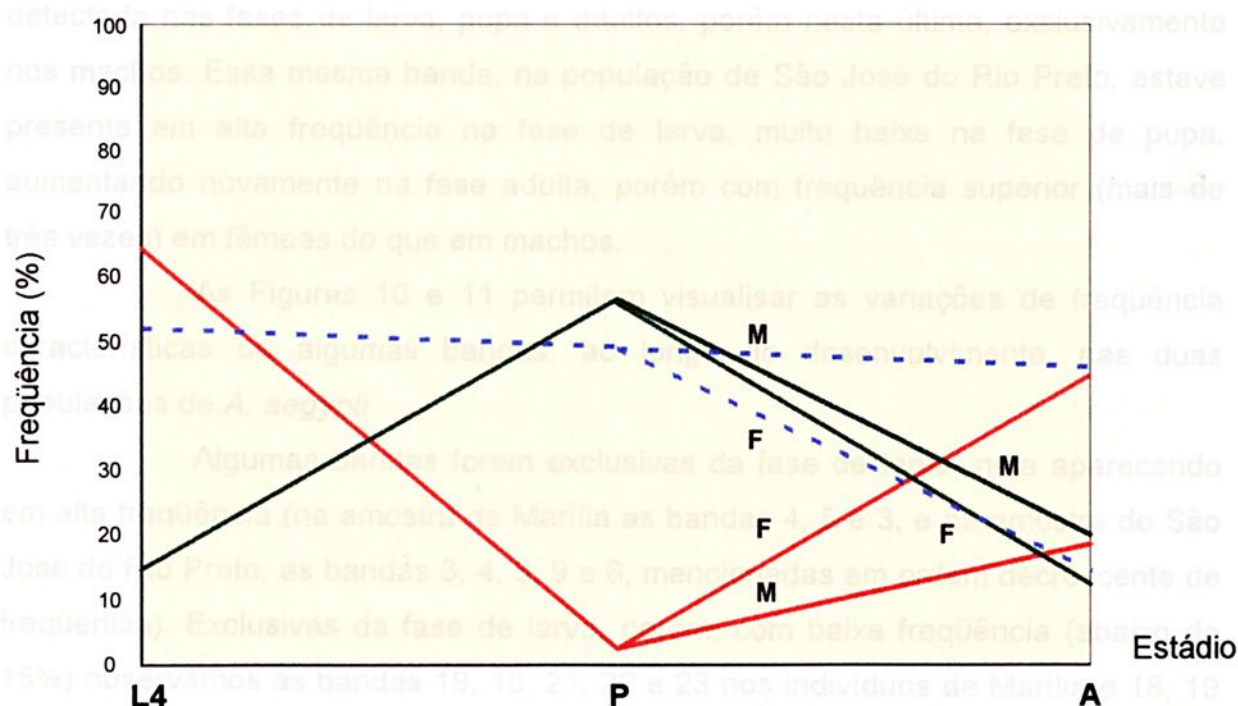


Figura 11. *A. aegypti*. Bandas que apresentaram variações acentuadas de frequência entre as fases de larva de 4º estágio (L4), pupas (P) e adultos (A) fêmeas (F) e machos (M) nas amostras de São José do Rio Preto - SP. Banda 7 (—), Banda 12 (- - -) e Banda 16 (—).

estádios, apresenta uma freqüência maior na fase de pupa. Em L4 e nos adultos a freqüência desta banda é bem reduzida.

A banda 2, nos indivíduos de Marília, foi observada em todas as fases analisadas, com baixas freqüências. Na amostra de São José do Rio Preto, porém, essa mesma banda foi pouco freqüente nas fases de larva e pupa sofrendo um aumento acentuado na fase adulta. A banda 7, em *A. aegypti* de Marília, foi detectada nas fases de larva, pupa e adultos, porém nesta última, exclusivamente nos machos. Essa mesma banda, na população de São José do Rio Preto, esteve presente em alta freqüência na fase de larva, muito baixa na fase de pupa, aumentando novamente na fase adulta, porém com freqüência superior (mais de três vezes) em fêmeas do que em machos.

As Figuras 10 e 11 permitem visualizar as variações de freqüência características de algumas bandas, ao longo do desenvolvimento, nas duas populações de *A. aegypti*.

Algumas bandas foram exclusivas da fase de larva, nela aparecendo em alta freqüência (na amostra de Marília as bandas 4, 5 e 3, e na amostra de São José do Rio Preto, as bandas 3, 4, 5, 9 e 6, mencionadas em ordem decrescente de freqüência). Exclusivas da fase de larva, porém, com baixa freqüência (abaixo de 15%) observamos as bandas 19, 18, 21, 22 e 23 nos indivíduos de Marília e 18, 19 e 21 nos de São José do Rio Preto. Outras bandas, também exclusivas da fase de larva, apresentaram-se com uma freqüência intermediária. São as bandas 6 e 9 da população de Marília e a 8 na de São José do Rio Preto.

Uma única banda exclusiva da fase de pupa, com freqüência muito baixa, foi detectada em cada população, sendo, a banda 10 na população de Marília e a 11 na de São José do Rio Preto.

A banda 20, nas duas populações, apresentou uma queda acentuada de freqüência entre as fases de larva e pupa, a banda 11 (Marília), porém, apresentou baixa freqüência nas duas fases. Quanto à banda 12 (também de Marília), manteve-se elevada nas duas fases e com valores próximos. Essas três bandas não foram observadas nos adultos.

Na população de Marília, com relação às bandas 15 e 17, exclusivas da fase adulta, observamos que a freqüência da banda 15 foi elevada, porém, maior nos machos que nas fêmeas. O oposto ocorreu com a banda 17.

Na amostra de São José do Rio Preto, a banda 15 foi encontrada em pupas e na fase adulta, nesta exibindo diferença acentuada entre os dois sexos



(maior frequência nas fêmeas que nos machos), na fase de pupa, sua frequência foi baixa. A banda 12 foi observada em todas as fases do desenvolvimento, com frequência elevada em L4, pupas e machos adultos. Observa-se, porém, uma forte redução de frequência nas fêmeas adultas.

1.2. Padrões individuais de esterases

Foi analisada a combinação das diferentes bandas em cada indivíduo das fases de pupa e adultos fêmeas e machos, nas duas populações. Cada combinação foi denominada padrão individual. Essa análise não foi realizada para as fases larvais, em decorrência do grande número de bandas presentes nas mesmas e a grande variabilidade de combinações observadas. Para dar uma idéia dessa variabilidade, mencionamos que nas larvas de 4º estágio da amostra de Marília foram encontrados 202 padrões individuais diferentes, sendo que o mais freqüente foi encontrado em 5 indivíduos. Na Figura 12, apresentamos um gel dos indivíduos de Marília, mostrando padrões verificados nas fases de L4 e pupas.

Nas pupas (Tabela 6, Figuras 12 e 13) foram encontrados 38 padrões individuais diferentes, na amostra de Marília, e 33, na de São José do Rio Preto. Destes padrões, 20 foram comuns às duas populações, sendo que, em ambas, um mesmo padrão foi o mais freqüente. Esse padrão era formado pelas bandas 1, 12 e 16, estando presente, respectivamente, em 18,57% e 16,67% dos indivíduos das populações de Marília e São José do Rio Preto. Entre os demais padrões comuns, houve variação de frequência, maior ou menor, para diferentes padrões, nas duas populações. A menor frequência, para o mesmo padrão individual, nas duas populações foi observada para a combinação das bandas 1, 7, 12, 13 e 14 (respectivamente, 0,93% e 0,83%, nas amostras de Marília e São José do Rio Preto).

A população de Marília mostrou 18 padrões exclusivos, na fase de pupa e destes, o que apresentou frequência mais alta foi o formado pelas bandas 1, 7, 13 e 16 que aparece em 3,71% dos indivíduos analisados. A frequência mais baixa encontrada foi de 0,31% (ou seja, um indivíduo portador) sendo que 8 padrões se incluem nesta categoria. A população de São José do Rio Preto mostrou 13 padrões exclusivos, com frequência de 0,83% a 3,33%, isto é, de 1 a 4 indivíduos portadores.

Quanto aos adultos, na população de Marília foram encontrados 28 padrões individuais nas fêmeas e 29 nos machos. Na população de São José do



Tabela 5. Variabilidade dos padrões individuais e frequência (número de indivíduos e porcentagem) observados nas pupas de *A. aegypti* de Marília e de São José do Rio Preto.

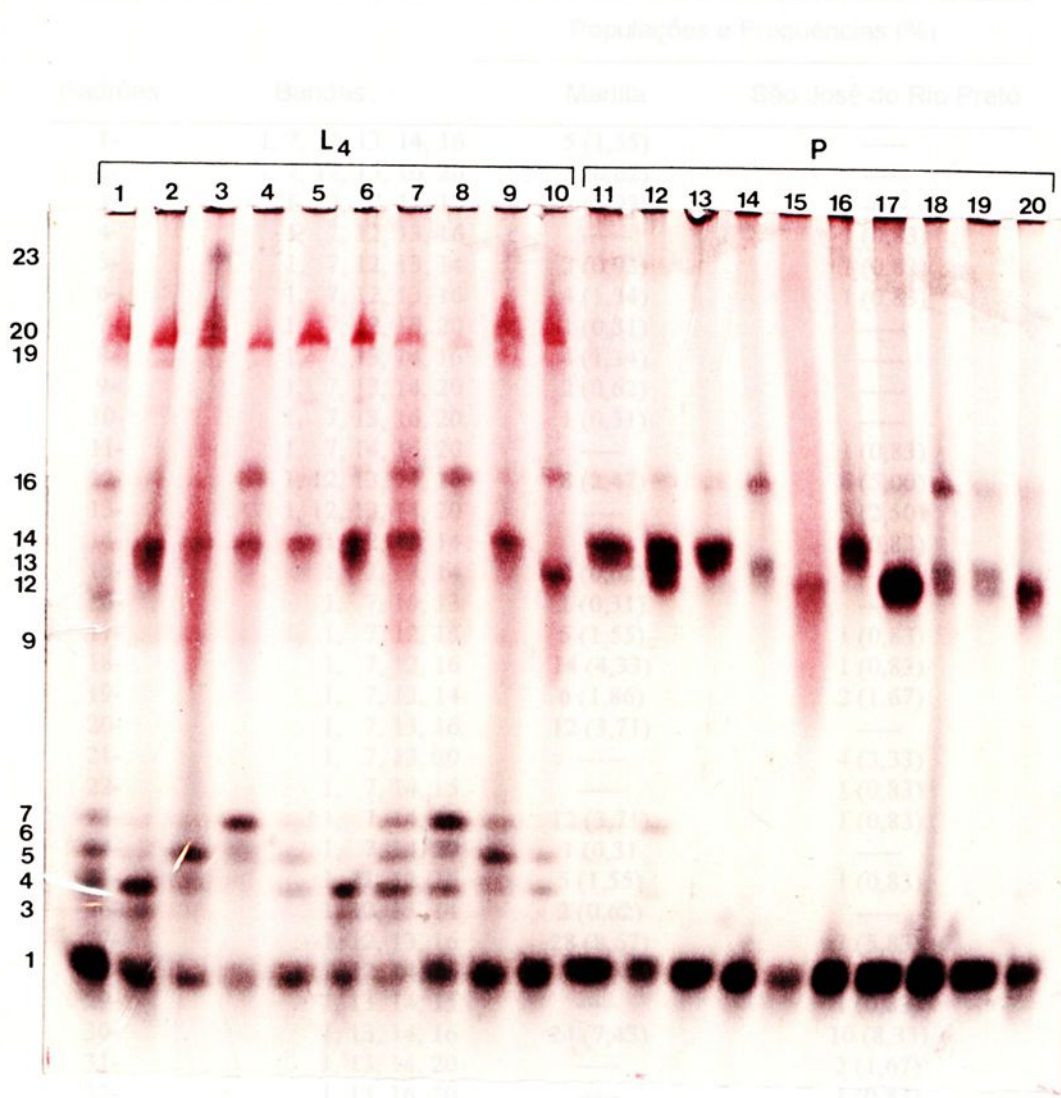


Figura 12. *A. aegypti*. Gel mostrando combinações de bandas (padrões individuais) nas fases de L4 e pupas.

Tabela 6. Variabilidade dos padrões individuais e frequência (número de indivíduos e porcentagem) observados nas pupas de *A. aegypti* de Marília e de São José do Rio Preto.

Padrões	Bandas	Populações e Frequências (%)	
		Marília	São José do Rio Preto
1-	1, 7, 12, 13, 14, 16	5 (1,55)	-----
2-	1, 7, 12, 13, 16, 20	2 (0,62)	-----
3-	1, 2, 7, 12, 14	3 (0,93)	-----
4-	1, 2, 12, 13, 16	-----	1 (0,83)
5-	1, 7, 12, 13, 14	3 (0,93)	1 (0,83)
6-	1, 7, 12, 13, 16	4 (1,34)	1 (0,83)
7-	1, 7, 12, 13, 20	1 (0,31)	-----
8-	1, 7, 13, 14, 16	4 (1,34)	-----
9-	1, 7, 13, 14, 20	2 (0,62)	-----
10-	1, 7, 13, 16, 20	1 (0,31)	-----
11-	1, 7, 14, 16, 20	-----	1 (0,83)
12-	1, 12, 13, 14, 16	8 (2,47)	6 (5,00)
13-	1, 12, 13, 14, 20	-----	3 (2,50)
14-	1, 2, 12, 14	-----	1 (0,83)
15-	1, 2, 13, 14	2 (0,62)	-----
16-	1, 7, 10, 13	1 (0,31)	-----
17-	1, 7, 12, 13	5 (1,55)	1 (0,83)
18-	1, 7, 12, 16	14 (4,33)	1 (0,83)
19-	1, 7, 13, 14	6 (1,86)	2 (1,67)
20-	1, 7, 13, 16	12 (3,71)	-----
21-	1, 7, 13, 20	-----	4 (3,33)
22-	1, 7, 14, 15	-----	1 (0,83)
23-	1, 7, 14, 16	12 (3,71)	1 (0,83)
24-	1, 7, 14, 20	1 (0,31)	-----
25-	1, 11, 12, 16	5 (1,55)	1 (0,83)
26-	1, 12, 13, 14	2 (0,62)	-----
27-	1, 12, 13, 16	28 (8,67)	7 (5,83)
28-	1, 12, 14, 16	-----	1 (0,83)
29-	1, 13, 14, 15	-----	1 (0,83)
30-	1, 13, 14, 16	24 (7,43)	10 (8,33)
31-	1, 13, 14, 20	-----	2 (1,67)
32-	1, 13, 16, 20	-----	1 (0,83)
33-	1, 14, 16, 20	1 (0,31)	-----
34-	1, 2, 12	1 (0,31)	-----
35-	1, 2, 13	1 (0,31)	-----
36-	1, 7, 13	4 (1,34)	3 (2,50)
37-	1, 7, 14	12 (3,71)	1 (0,83)
38-	1, 7, 16	1 (0,31)	-----
39-	1, 12, 13	2 (0,62)	2 (1,67)
40-	1, 12, 14	-----	1 (0,83)
41-	1, 12, 16	60 (18,57)	20 (16,67)
42-	1, 13, 14	7 (2,17)	13 (10,83)
43-	1, 13, 16	27 (8,36)	10 (8,33)
44-	1, 13, 20	-----	1 (0,83)
45-	1, 14, 15	-----	1 (0,83)
46-	1, 14, 16	17 (5,26)	6 (5,00)
47-	1, 12	9 (2,79)	7 (5,83)
48-	1, 13	16 (4,95)	1 (0,83)
49-	1, 14	14 (4,33)	5 (4,16)
50-	1, 16	3 (0,93)	-----
51-	1	2 (0,62)	-----

Rio Preto, foram verificados 16 padrões nas fêmeas e 14 nos machos (Tabela 7, Figuras 14 e 15).

Na fase adulta, quatro padrões foram comuns às duas populações, tendo sido encontrados nos dois sexos (os de número 30, 36, 40 e 48 na Tabela 7). Comuns às duas populações, porém não presentes nos dois sexos, foram encontrados 6 padrões (os de número 20, 24, 26, 41, 42 e 47).

Na população de Matilla, aparecendo nos dois sexos, 14 padrões (os de número 4, 10, 15, 18, 22, 27, 28, 33, 43, 44, 45, 49, 50 e 51). Exclusivos dessa população, porém, presentes só nas fêmeas foram encontrados 6 padrões (os de número 8, 16, 17, 25, 31 e 35) e só nos machos 5 padrões (os de número 1, 3, 9, 12, 13, 14, 25 e 32).

Foram exclusivos da população de São José do Rio Preto, aparecendo nos dois sexos, dois padrões (os de números 21 e 23). Exclusivos dessa população, presentes nas fêmeas, foram observados sete padrões (os de número 11, 19, 37, 38, e 46) e, só nos machos, quatro padrões (os de número 6, 10, 15 e 39).

1.3. Ação de inibidores sobre as bandas estéricas

Fluoreto de ferulicissulfonila (PMSF), sulfato de eserina, malathion, ácido edoacético, fluoreto de sódio (NaF) e β -mercaptoetanol foram utilizados para o tratamento de géis preparados com amostras de L4, pupa e adultos, a fim de verificar se ocorre efeito de inibição da atividade das esterasas detectadas no teste de esterase. Como mostra a referida tabela, o PMSF inibiu completamente as bandas 1 e 7. Em seguida, sua ação foi mais pronunciada sobre as bandas 13 e 14 e 16, que se tornaram totalmente inativas na presença desse composto. A banda 20 foi moderadamente inibida e as bandas 3 e 7 foram fracamente inibidas. A Figura 16B apresenta esses resultados. A inibição sobre a banda 2, ausente nos padrões apresentados nessa figura, foi observada em outros géis.

O sulfato de eserina mostrou uma inibição completa das bandas 12 a 14 e leve das bandas 1 e 7, 18 e 20 (Figura 16C).

O malathion mostrou uma inibição completa das bandas 12 a 14 e leve das bandas 1 e 7, 18 e 20 (Figura 16C).

Figura 13. *A. aegypti*. Gel mostrando combinações de bandas (padrões individuais) na fase de pupa, nas amostras de São José do Rio Preto.

Rio Preto, foram verificados 16 padrões nas fêmeas e 14 nos machos (Tabela 7, Figuras 14 e 15).

→ Na fase adulta, quatro padrões foram comuns às duas populações, tendo sido encontrados nos dois sexos (os de número 30, 36, 40 e 48 na Tabela 7). Comuns às duas populações, porém não presentes nos dois sexos, foram encontrados 6 padrões (os de número 20, 24, 26, 41, 42 e 47).

Na mesma fase do desenvolvimento, foram exclusivos da população de Marília, aparecendo nos dois sexos, 14 padrões (os de número 4, 10, 15, 18, 22, 27, 29, 33, 43, 44, 45, 49, 50 e 51). Exclusivos dessa população, porém, presentes só nas fêmeas foram encontrados 6 padrões (os de número 8, 16, 17, 28, 31 e 35) e só nos machos 8 padrões (os de número 2, 3, 9, 12, 13, 14, 25 e 32).

Foram exclusivos da população de São José do Rio Preto, aparecendo nos dois sexos, dois padrões (os de números 21 e 23). Exclusivos dessa população, presentes só nas fêmeas, foram observados sete padrões (1, 5, 11, 19, 37, 38, e 46) e, só nos machos, quatro padrões (os de número 6, 7, 34, e 39).

1.3. Ação de inibidores sobre as bandas esterásicas

Fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF), sulfato de eserina, malathion, ácido iodoacético, fluoreto de sódio (NaF) e β -mercaptoetanol foram utilizados para o tratamento de géis preparados com amostras de L4, pupa e adultos, a fim de verificar se ocorre efeito de inibição da atividade das esterases detectadas no presente trabalho. Os resultados constam da Tabela 8 e foram os mesmos para as duas populações.

Como mostra a referida tabela, o PMSF inibiu completamente as bandas 1 e 2. Em seguida, sua ação foi mais pronunciada sobre as bandas 12 a 14 e 18, que se coraram levemente no gel tratado, o que é indicativo de que estas enzimas não perderam totalmente sua atividade na presença desse composto. A banda 20 foi moderadamente inibida e as bandas 3 a 7 foram fracamente inibidas. A Figura 16B apresenta esses resultados. A inibição sobre a banda 2, ausente nos padrões apresentados nessa figura, foi observada em outros géis.

O sulfato de eserina mostrou uma inibição completa das bandas 12 a 14 e leve das bandas 1 a 7, 18 e 20 (Figura 16C).



Tabela 7. Variabilidade dos padrões individuais e frequência (número de indivíduos e porcentagem) observados nos adultos, machos e fêmeas, de *A. aegypti* de Marília e de São José do Rio Preto.

Padrões	Bandas	Populações e Frequências (%)			
		Marília		São José do Rio Preto	
		Fêmeas	Machos	Fêmeas	Machos
1	1, 2, 7, 13, 14, 15	----	----	4 (6,56)	----
2	1, 7, 13, 14, 15, 16	----	7 (4,46)	----	----
3	1, 7, 14, 15, 16, 17	----	1 (0,64)	----	----
4	1, 13, 14, 15, 16, 17	1 (0,65)	5 (3,18)	----	----
5	1, 2, 7, 13, 14	----	----	5 (8,20)	----
6	1, 2, 12, 13, 14	----	----	----	4 (6,90)
7	1, 2, 13, 14, 16	----	----	----	2 (3,45)
8	1, 2, 13, 14, 17	1 (0,65)	----	----	----
9	1, 2, 13, 15, 16	----	1 (0,64)	----	----
10	1, 2, 14, 15, 16	2 (1,31)	1 (0,64)	----	----
11	1, 7, 12, 13, 14	----	----	2 (3,28)	----
12	1, 7, 13, 14, 17	----	2 (1,27)	----	----
13	1, 7, 14, 15, 16	----	8 (5,09)	----	----
14	1, 7, 14, 16, 17	----	4 (2,55)	----	----
15	1, 13, 14, 15, 16	19 (12,42)	19 (12,10)	----	----
16	1, 13, 14, 15, 17	4 (2,61)	----	----	----
17	1, 13, 14, 16, 17	1 (0,65)	----	----	----
18	1, 14, 15, 16, 17	8 (5,23)	1 (0,64)	----	----
19	1, 2, 7, 14	----	----	2 (3,28)	----
20	1, 2, 12, 13	1 (0,65)	----	----	4 (6,90)
21	1, 2, 13, 14	----	----	2 (3,28)	4 (6,90)
22	1, 2, 14, 15	1 (0,65)	2 (1,27)	----	----
23	1, 7, 12, 13	----	----	2 (3,28)	8 (13,80)
24	1, 7, 13, 14	----	3 (1,91)	5 (8,20)	----
25	1, 7, 15, 16	----	2 (1,27)	----	----
26	1, 13, 14, 15	4 (2,61)	----	----	2 (3,45)
27	1, 13, 14, 16	12 (7,84)	3 (1,91)	----	----
28	1, 13, 14, 17	11 (7,19)	----	----	----
29	1, 13, 15, 16	3 (1,96)	1 (0,64)	----	----
30	1, 14, 15, 16	25 (16,34)	29 (18,47)	5 (8,20)	3 (5,17)
31	1, 14, 15, 17	2 (1,31)	----	----	----
32	1, 14, 16, 17	----	2 (1,27)	----	----
33	1, 15, 16, 17	1 (0,65)	1 (0,64)	----	----
34	1, 2, 12	----	----	----	3 (5,17)
35	1, 2, 13	1 (0,65)	----	----	----
36	1, 2, 14	2 (1,31)	4 (2,55)	3 (4,92)	3 (5,17)
37	1, 7, 13	----	----	4 (6,56)	----
38	1, 7, 14	----	----	3 (4,92)	----
39	1, 12, 13	----	----	----	8 (13,80)
40	1, 13, 14	20 (13,07)	9 (5,73)	8 (13,11)	6 (10,34)
41	1, 13, 16	4 (2,61)	----	----	4 (6,90)
42	1, 14, 15	7 (4,57)	11 (7,01)	5 (8,20)	----
43	1, 14, 16	3 (1,96)	1 (0,64)	----	----
44	1, 14, 17	2 (1,31)	1 (0,64)	----	----
45	1, 15, 16	2 (1,31)	3 (1,91)	----	----
46	1, 12	----	----	4 (6,56)	----
47	1, 13	----	2 (1,27)	5 (8,20)	3 (5,17)
48	1, 14	9 (5,88)	25 (15,92)	2 (3,28)	4 (6,90)
49	1, 15	1 (0,65)	5 (3,18)	----	----
50	1, 16	1 (0,65)	1 (0,64)	----	----
51	1	5 (3,27)	3 (1,91)	----	----

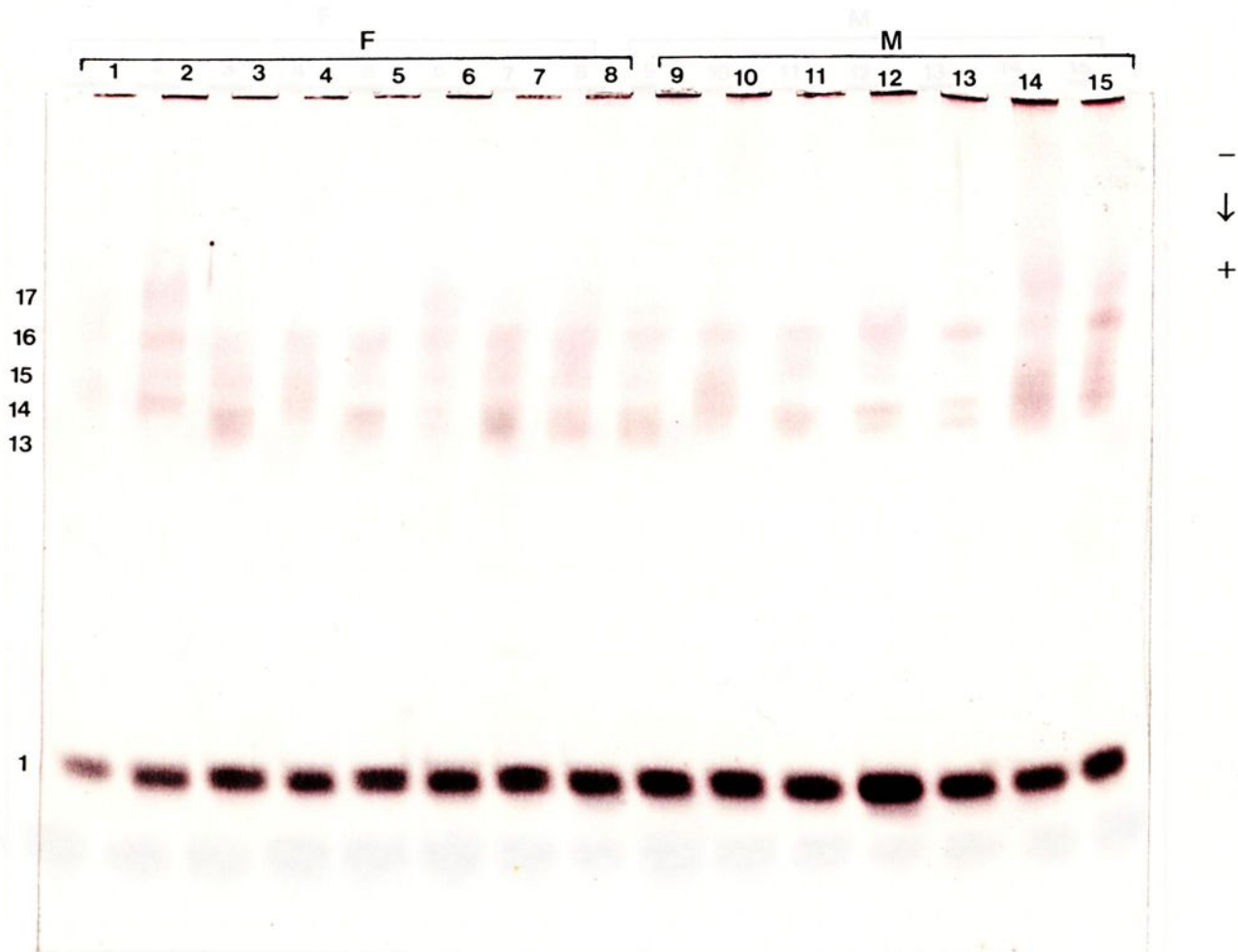


Figura 14. *A. aegypti*. Gel mostrando combinações de bandas (padrões individuais) na fase de adultos fêmeas (F) e machos (M), nas amostras de Marília.

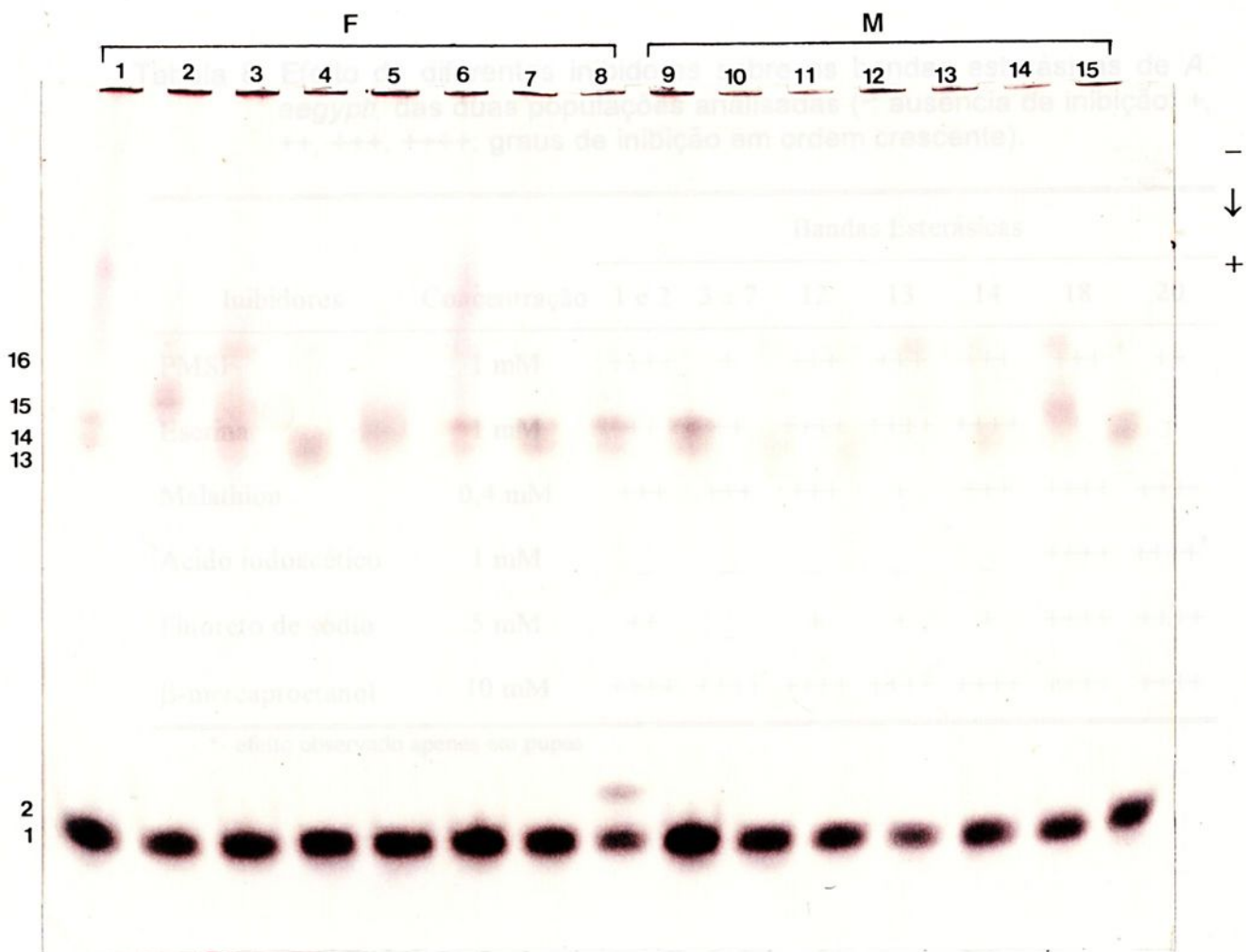


Figura 15. *A. aegypti*. Gel mostrando combinações de bandas (padrões individuais) na fase de adultos fêmeas (F) e machos (M), nas amostras de São José do Rio Preto.

Tabela 8. Efeito de diferentes inibidores sobre as bandas esterásicas de *A. aegypti*, das duas populações analisadas (-: ausência de inibição; +, ++, +++, +++++: graus de inibição em ordem crescente).

Inibidores	Concentração	Bandas Esterásicas						
		1 e 2	3 a 7	12	13	14	18	20
PMSF	1 mM	++++	+	+++	+++	+++	+++	++
Eserina	1 mM	++	++	++++	++++	++++	+	+
Malathion	0,4 mM	+++	+++	+++	+	+++	++++	++++
Ácido iodoacético	1 mM	-	-	-	-	-	++++	++++*
Fluoreto de sódio	5 mM	++	-	+	+	+	++++	++++
β -mercaptoetanol	10 mM	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++

*- efeito observado apenas em pupas

Figura 16 (A-D). *A. aegypti*. Ação de inibidores sobre as bandas esterásicas em pupas e adultos. A. Controle B. PMSF C. Eserina D. Malathion

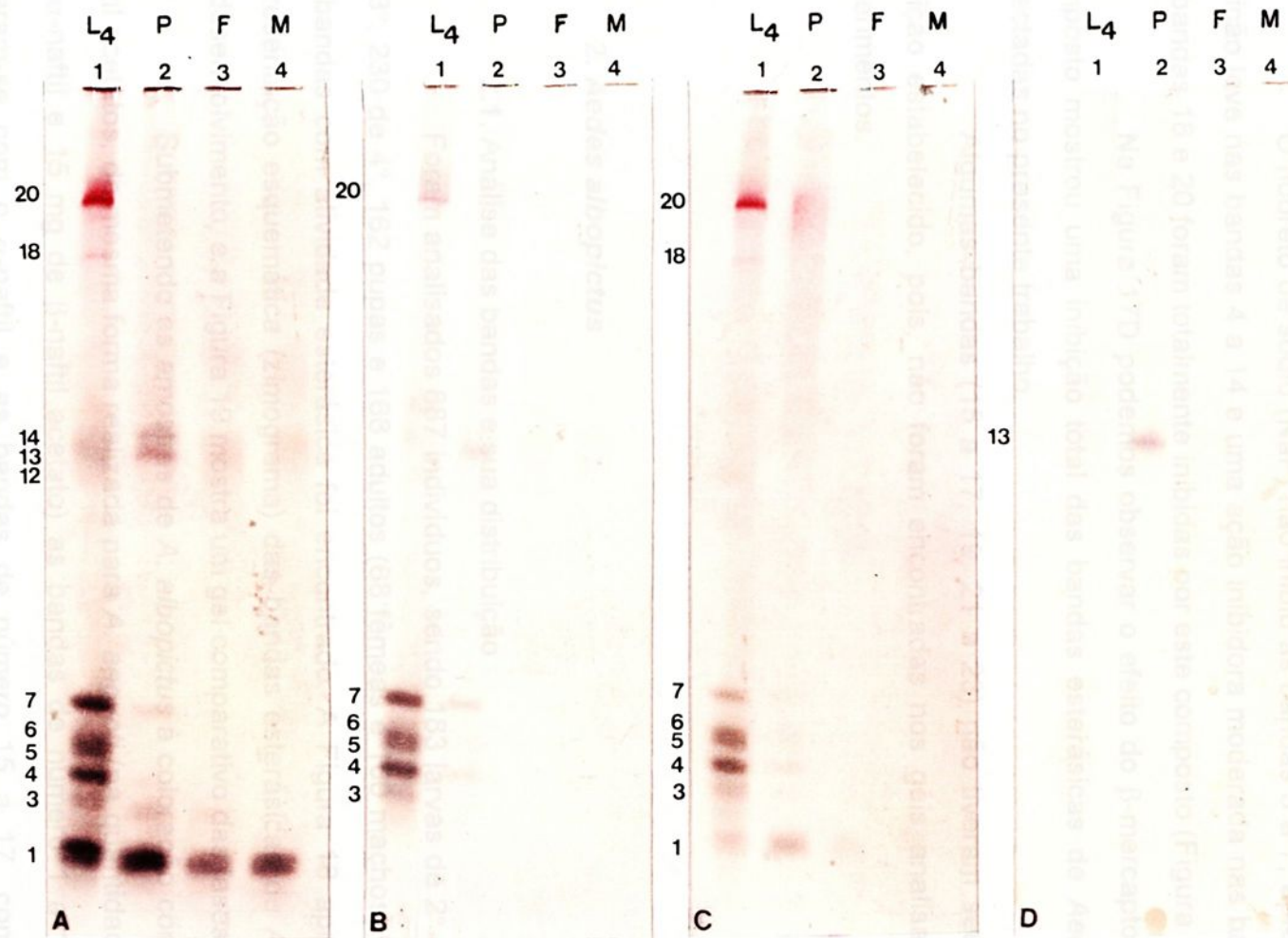


Figura 16 (A-D). *A. aegypti*. Ação de inibidores sobre as bandas esterásicas em géis das fases de L4, pupas e adultos. A. Controle. B. PMSF. C. Eserina. D. Malathion.

Quando os géis foram submetidos ao tratamento com malathion, verificou-se uma inibição completa das bandas 18 e 20, quase total das bandas 1 a 7, 12 e 14 e leve da banda 13 (Figuras 16D).

O ácido iodoacético mostrou efeito inibidor apenas sobre a esterase 20, nas pupas (Figuras 17B).

O fluoreto de sódio (NaF) não inibiu as bandas 3 a 7, apresentou uma inibição leve nas bandas 4 a 14 e uma ação inibidora moderada nas bandas 1 e 2. As bandas 18 e 20 foram totalmente inibidas por este composto (Figura 17C).

Na Figura 17D podemos observar o efeito do β -mercaptoetanol. Este composto mostrou uma inibição total das bandas esterásicas de *Aedes aegypti*, detectadas no presente trabalho.

Algumas bandas (15 a 17, 19, 21 a 23) não tiveram seu padrão de inibição estabelecido, pois, não foram encontradas nos géis analisados, nestes experimentos.

2. *Aedes albopictus*

2.1. Análise das bandas e sua distribuição

Foram analisados 887 indivíduos, sendo 183 larvas de 2º estágio, 144 de 3º, 230 de 4º, 162 pupas e 168 adultos (68 fêmeas e 100 machos). Um total de 20 bandas com atividade esterásica foi encontrado. A Figura 18 apresenta uma representação esquemática (zimograma) das bandas esterásicas de *A. albopictus* no desenvolvimento, e a Figura 19 mostra um gel comparativo das fases analisadas.

Submetendo as amostras de *A. albopictus* à coloração com o α e o β -naftil acetatos, da mesma forma realizada para *A. aegypti* (na quantidade de 30 mg de α -naftil e 15 mg de β -naftil acetato) as bandas de número 1 a 14, 18 a 20 coraram-se com o α -naftil e as bandas de número 15 a 17, com o β -naftil. Modificando-se as quantidades dessas duas substâncias (15 mg de α -naftil e 30 mg de β -naftil acetato), o resultado não se alterou. Assim, as bandas de 1 a 14, 18, 19 e 20 foram denominadas bandas α e as bandas 15 a 17, bandas β . Nos experimentos



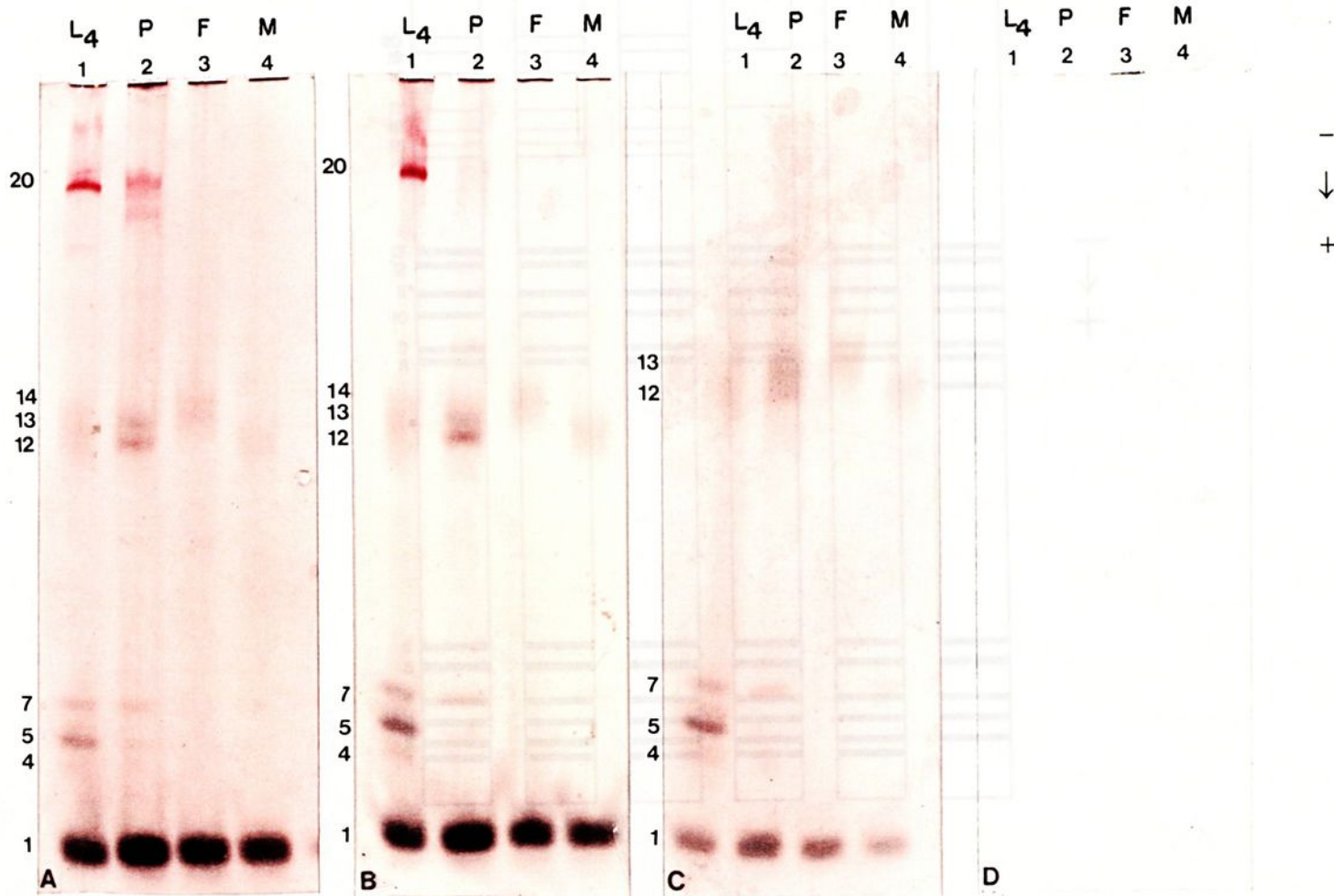


Figura 17 (A-D). *A. aegypti*. Ação de inibidores sobre as bandas esterásicas em géis das fases de L4, pupas e adultos. A. Controle. B. Ácido iodoacético. C. NaF. D. β -mercaptoetanol.

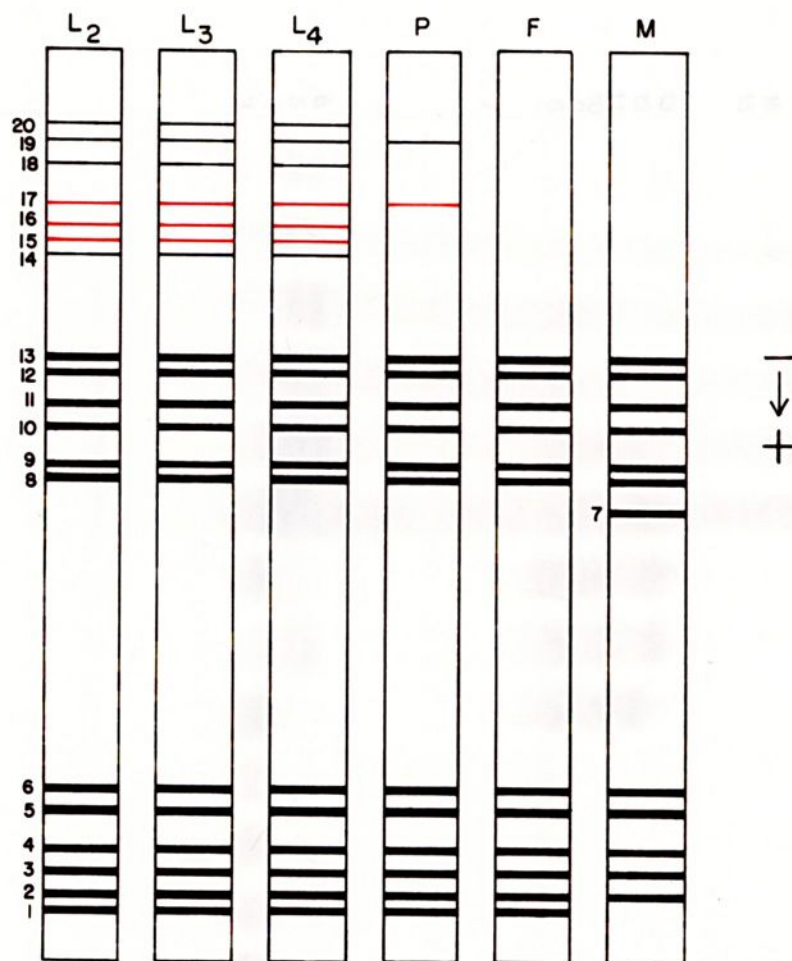


Figura 18 - Padrão de bandas esterásicas, observados em
larvas (L₂ a L₄), pupas (P) e adultos
(fêmeas - F e machos - M) de A. albopictus.
Bandas α (—), Bandas β (—)

onde somente o substrato α (45 mg) foi utilizado, apenas as bandas 15 a 17 e 19 (bandas β) não se coraram, reforçando a ideia de que elas são específicas para o substrato β . Entretanto, quando apenas o β (45 mg) estava presente na solução de coloração, as bandas 3 a 6 praticamente não se coraram nas pupas e nos adultos, mas as bandas 4 e 6 coraram-se nas fases larvais. As demais bandas, independentemente da fase, coraram-se, indicando que na ausência de α , o β -nftif é utilizado.

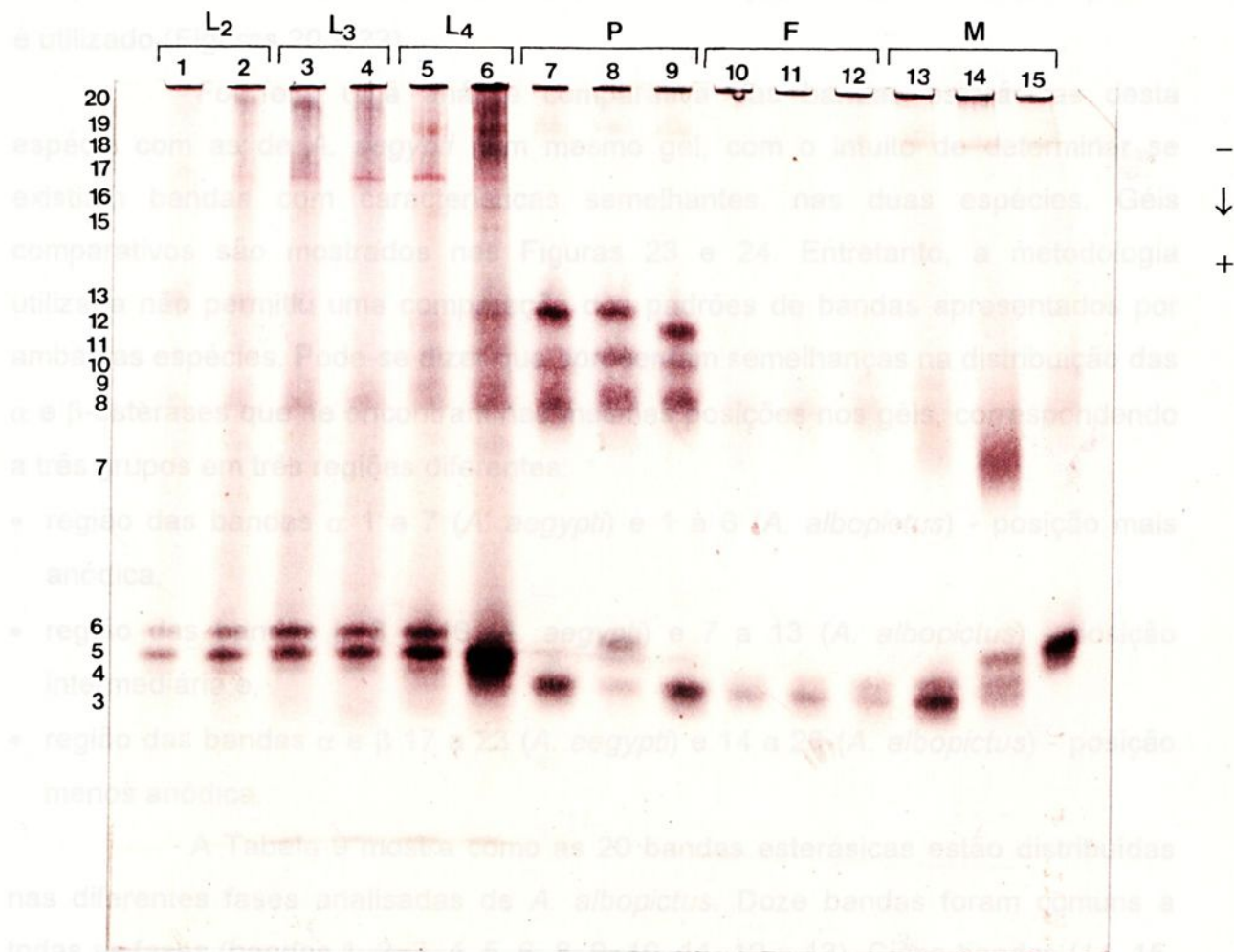


Figura 19. *A. albopictus*. Padrões esterásicos nas fases larvais (L2, L3, L4), pupas (P) e adultos fêmeas (F) e machos (M).

Foram encontradas diferenças na espessura e na intensidade de coloração entre as bandas, e para uma mesma banda em diferentes indivíduos. Na fase de pupa, as bandas de número 5 a 13 encontram-se espessas e bem coradas, enquanto nos estádios larvais essas bandas são delgadas e fracamente coradas, dificultando muitas vezes a visualização. Nos adultos, essas bandas tomam-se ainda mais finas do que nas larvas.

onde somente o substrato α (45 mg) foi utilizado, apenas as bandas 15 a 17 (bandas β) não se coraram, reforçando a idéia de que elas são específicas para o substrato β . Entretanto, quando apenas o β (45 mg) estava presente na solução de coloração, as bandas 3 a 6 praticamente não se coraram nas pupas e nos adultos, mas as bandas 4 a 6 coraram-se nas fases larvais. As demais bandas, independentemente da fase, coraram-se, indicando que na ausência de α , o β -naftil é utilizado (Figuras 20 a 22).

Foi feita uma análise comparativa das bandas esterásicas desta espécie com as de *A. aegypti* num mesmo gel, com o intuito de determinar se existiam bandas com características semelhantes, nas duas espécies. Géis comparativos são mostrados nas Figuras 23 e 24. Entretanto, a metodologia utilizada não permitiu uma comparação dos padrões de bandas apresentados por ambas as espécies. Pode-se dizer que apresentam semelhanças na distribuição das α e β -esterases que se encontram nas mesmas posições nos géis, correspondendo a três grupos em três regiões diferentes:

- região das bandas α 1 a 7 (*A. aegypti*) e 1 a 6 (*A. albopictus*) - posição mais anódica,
- região das bandas α 8 a 16 (*A. aegypti*) e 7 a 13 (*A. albopictus*) - posição intermediária e,
- região das bandas α e β 17 a 23 (*A. aegypti*) e 14 a 20 (*A. albopictus*) - posição menos anódica.

A Tabela 9 mostra como as 20 bandas esterásicas estão distribuídas nas diferentes fases analisadas de *A. albopictus*. Doze bandas foram comuns a todas as fases (bandas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12 e 13). Cinco bandas (14, 15, 16, 18 e 20) foram exclusivas das fases larvais (L2 a L4). As bandas 17 e 19 foram encontradas nos estádios larvais e nas pupas. A banda 7 foi encontrada exclusivamente nos adultos machos. A Figura 19, já referida, mostra 17 das 20 bandas encontradas nessas amostras.

Foram encontradas diferenças na espessura e na intensidade de coloração, entre as bandas, e para uma mesma banda em diferentes indivíduos. Na fase de pupa, as bandas de número 8 a 13 encontram-se espessas e bem coradas, enquanto nos estádios larvais essas bandas são delgadas e fracamente coradas, dificultando muitas vezes a visualização. Nos adultos, essas bandas tornam-se ainda mais finas do que nas larvas.



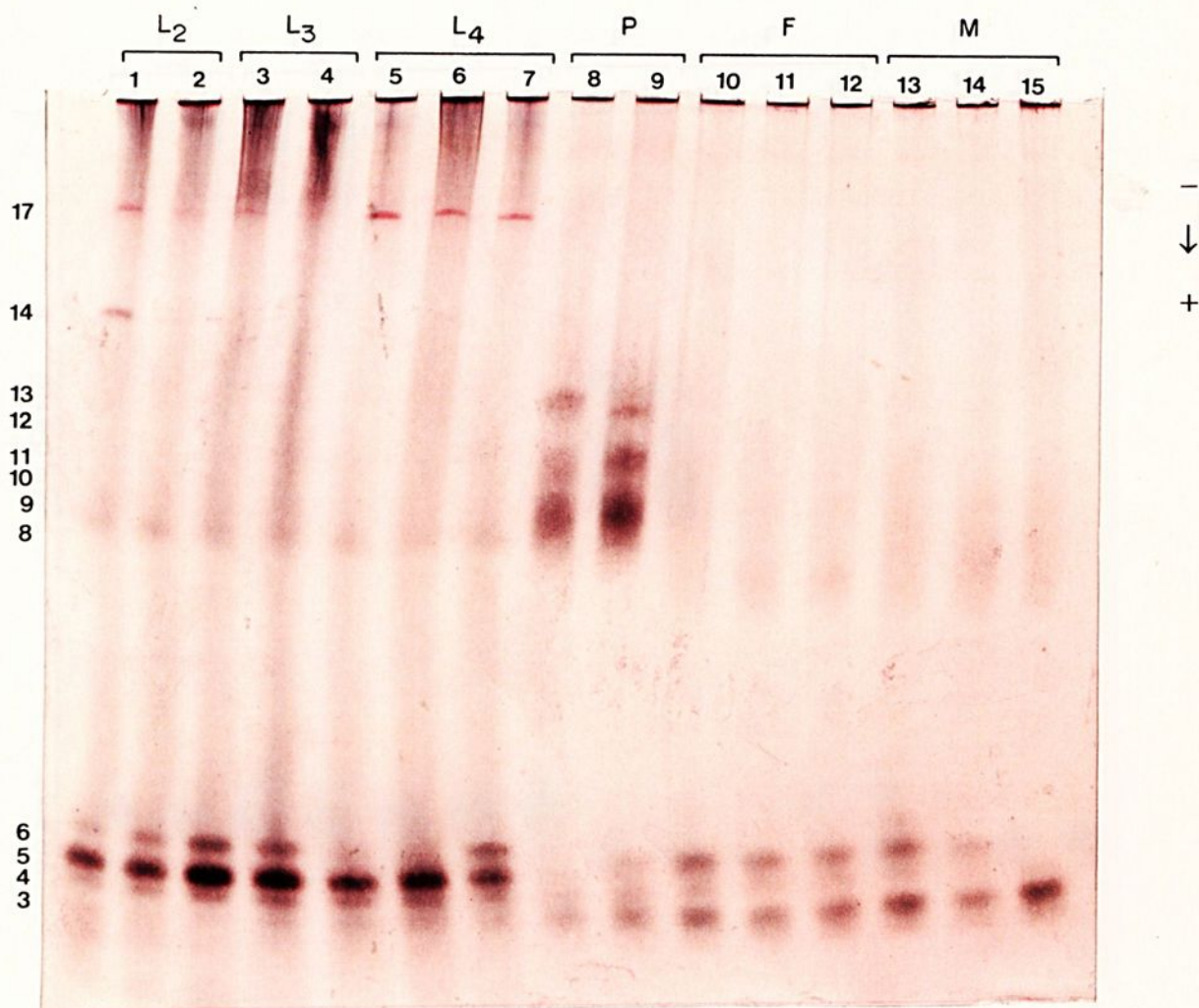


Figura 20. *A. albopictus*. Bandas esterásicas no desenvolvimento, em gel submetido à coloração com α e β -naftil acetato, nas quantidades de, respectivamente, 30 mg e 15 mg.

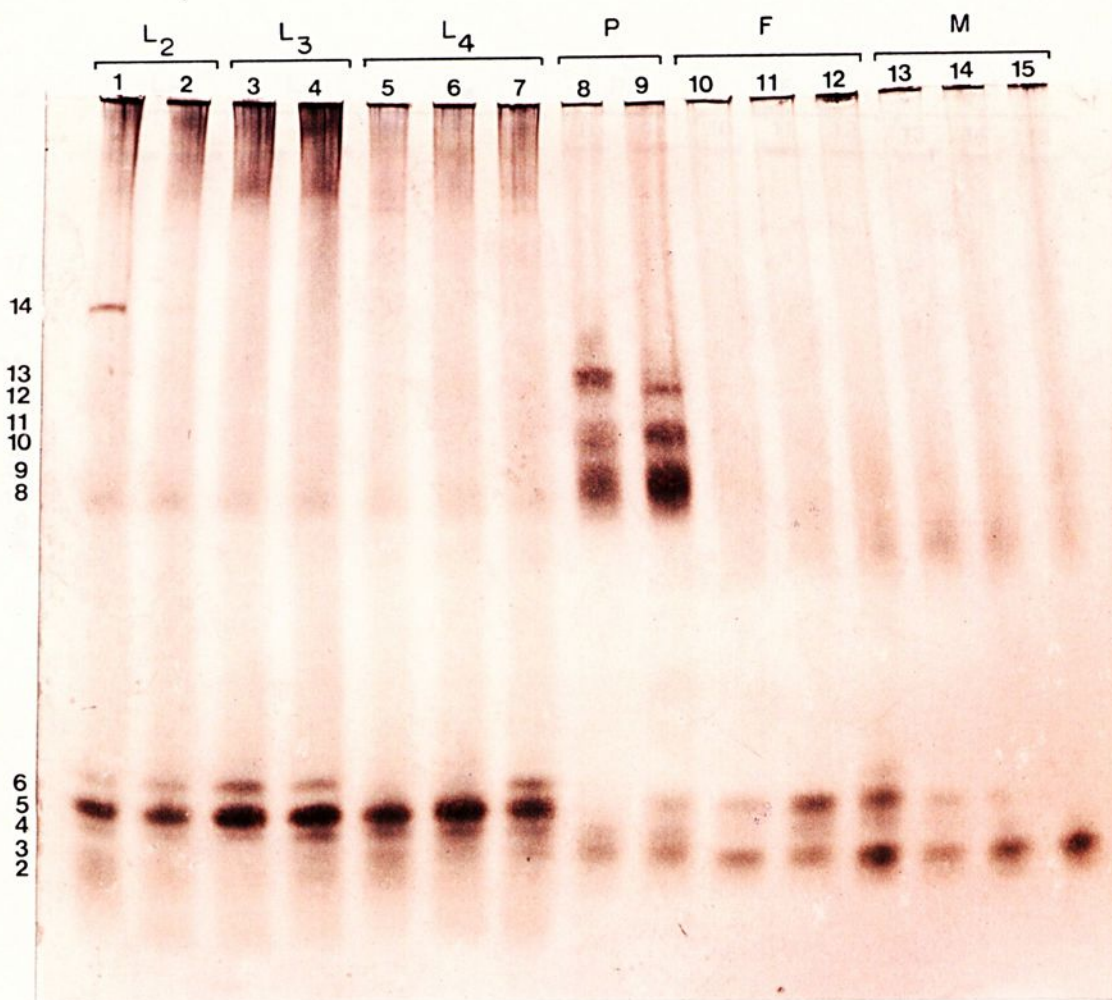


Figura 21. *A. albopictus*. Bandas esterásicas no desenvolvimento, em gel submetido à coloração com α -naftil acetato, na quantidade de 45 mg.

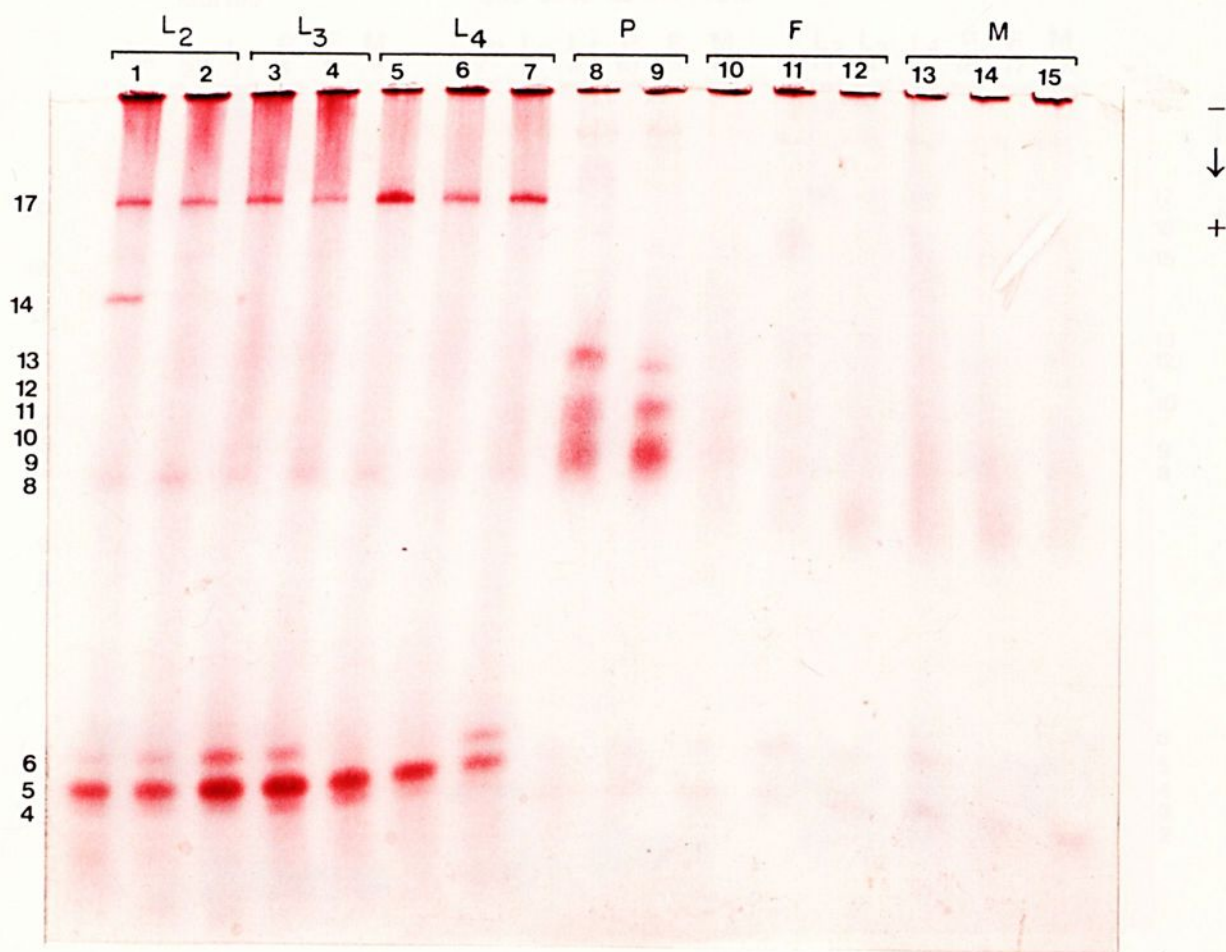


Figura 22. *A. albopictus*. Bandas esterásicas no desenvolvimento, em gel submetido à coloração com β -naftil acetato, na quantidade de 45 mg.

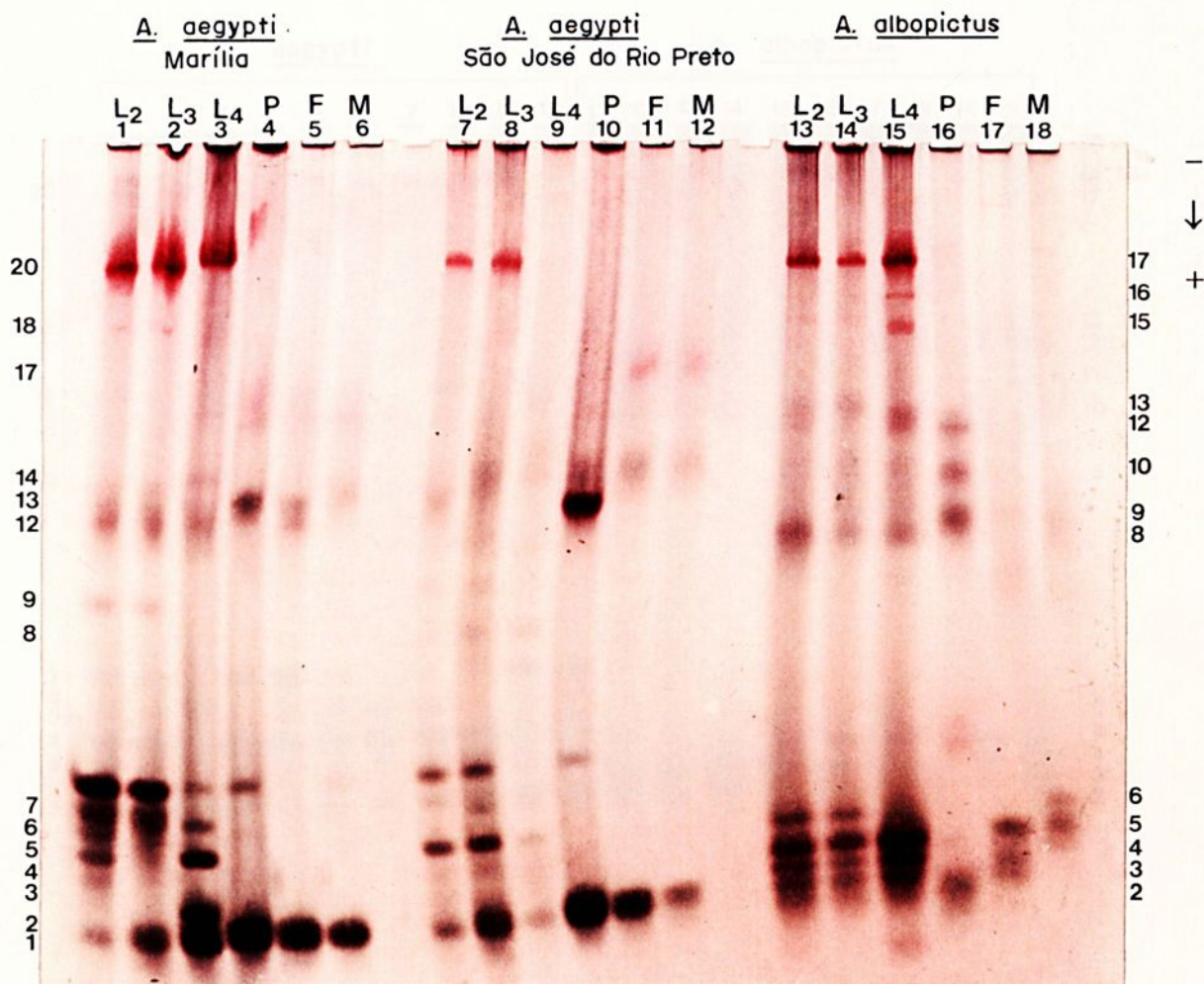


Figura 23. Padrões de esterases nas populações de *A. aegypti* e de *A. albopictus*, analisadas no mesmo gel, no decorrer do desenvolvimento.

Tabela 8 Distribuição das bandas esterases encontradas nas amostras de *A. albopictus* em cada fase analisada.

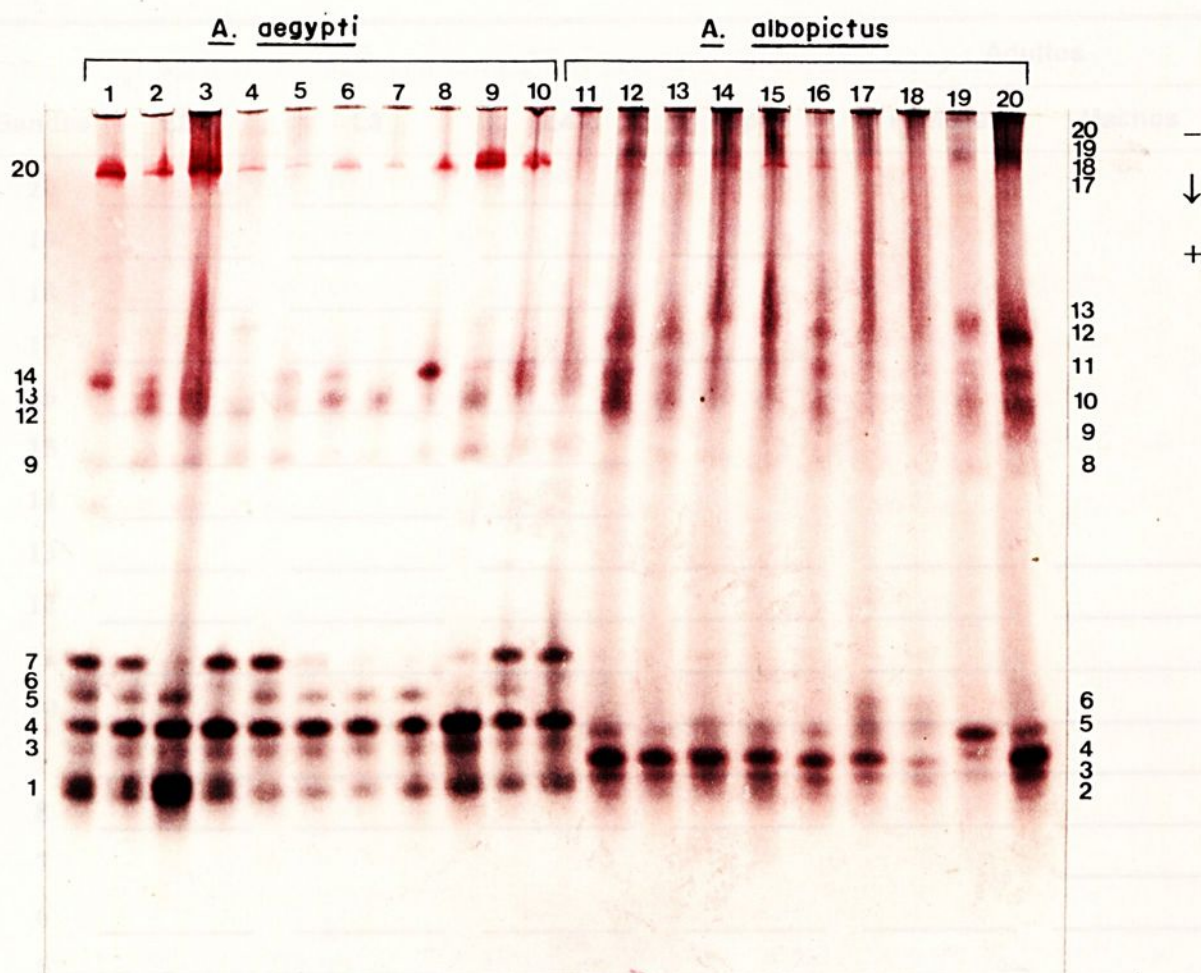


Figura 24. Padrões de esterases em *A. aegypti* de Marília e *A. albopictus*, analisadas no mesmo gel, em larvas de 4º estágio.

Tabela 9. Distribuição das bandas esterásicas encontradas nas amostras de *A. albopictus*, em cada fase analisada.

Bandas	L2	L3	L4	Pupas	Adultos	
					Fêmeas	Machos
20						
19						
18						
17						
16						
15						
14						
13						
12						
11						
10						
9						
8						
7						
6						
5						
4						
3						
2						
1						

Comportamento diferente deste foi o apresentado pelas bandas de número 2 a 6, que se encontram com maior espessura e também maior intensidade de coloração nos estádios larvais, diminuindo gradativamente nas pupas e nos adultos.

Dados quanto à frequência das bandas constam da Tabela 10 e da Figura 25. Da mesma maneira que em *A. aegypti* esses dados só foram obtidos para L4, pupas e adultos.

Entre as bandas comuns a todas as fases, a banda nº1 foi encontrada em baixa frequência tanto em L4 como em pupa e nas fêmeas, estando completamente ausente, em nossas observações, apenas nos machos. A banda 3 foi encontrada com frequência elevada (acima de 65%) em todas as fases analisadas. Outras bandas apresentaram frequência variável entre as fases do desenvolvimento, com diferenças às vezes bastante acentuadas. A Figura 26 mostra o comportamento de algumas delas, tomadas como exemplo dessa variação.

As bandas exclusivas da fase larval (14 a 16, 18 e 20) foram encontradas em frequências baixas, sendo o valor mais alto o da banda 20 (4,78%) e o mais baixo o da banda 18 (0,43%).

Foram comuns às fases de larva e pupa, as bandas 17 e 19. A banda 17 foi encontrada em 64,78% das larvas de 4º estágio, apresentando uma queda acentuada na fase de pupa (8,02%). Comportamento inverso foi observado na banda 19, cuja frequência foi maior na fase de pupa.

2.2. Padrões individuais de esterases

Do mesmo modo que em *A. aegypti*, foi analisada a combinação das diferentes bandas em cada indivíduo das fases L4, pupas, fêmeas e machos, chamando cada uma delas de padrão individual.

Nas larvas de 4º estágio foram encontrados 129 padrões, dos quais o mais freqüente foi encontrado em 10 indivíduos (4,34%), sendo constituído pelas bandas 2, 3, 4, 9, 10, 13 e 17. Os padrões formados pelas bandas 2, 3, 4, 5, 9, 10, 13 e 17 e 2, 3, 4, 5, 8, 10, 12 e 17 foram encontrados em 9 indivíduos (3,91%). Um dos padrões foi encontrado em 8 indivíduos (3,48%), formado pelas bandas 2, 3, 4, 8, 10, 12 e 17. Os demais padrões foram encontrados em 1 a 5 indivíduos.

Nas pupas foram encontrados 119 padrões individuais. Destes o mais freqüente foi encontrado em 4 indivíduos (2,47%), constituído pelas bandas 3, 5, 8,



Tabela 10. Frequência (%) de indivíduos portadores das bandas esterásicas encontradas nas amostras de *A. albopictus*, em cada fase analisada.

Bandas	L 4	Pupas	Adultos	
			Fêmeas	Machos
20	4,78	-----	-----	-----
19	16,95	23,45	-----	-----
18	0,43	-----	-----	-----
17	64,78	8,02	-----	-----
16	2,17	-----	-----	-----
15	2,17	-----	-----	-----
14	2,17	-----	-----	-----
13	37,83	66,67	2,94	8,00
12	32,61	42,80	1,47	7,00
11	17,83	66,67	1,47	5,00
10	54,34	88,27	2,94	13,00
9	44,78	85,80	7,35	21,00
8	58,26	58,02	13,23	9,00
7	-----	-----	-----	7,00
6	20,43	20,37	16,17	15,00
5	63,47	60,49	45,59	37,00
4	96,52	59,88	27,94	36,00
3	89,13	67,90	66,17	69,00
2	69,56	41,36	25	39,00
1	3,04	4,32	1,47	----

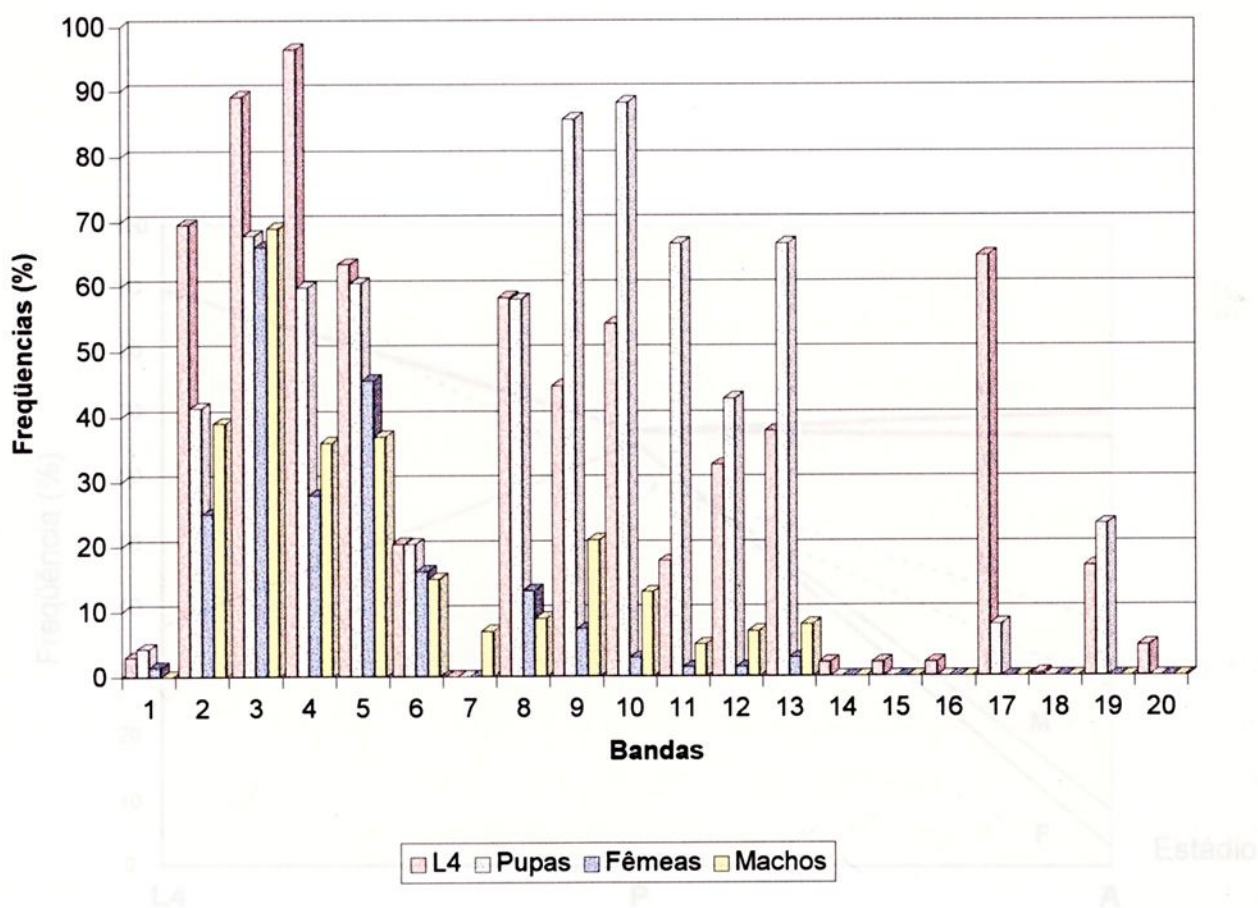


Figura 25. Distribuição das frequências (%) das bandas esterásicas detectadas nas fases de L4, pupas e adultos, nas populações de *A. albopictus*.

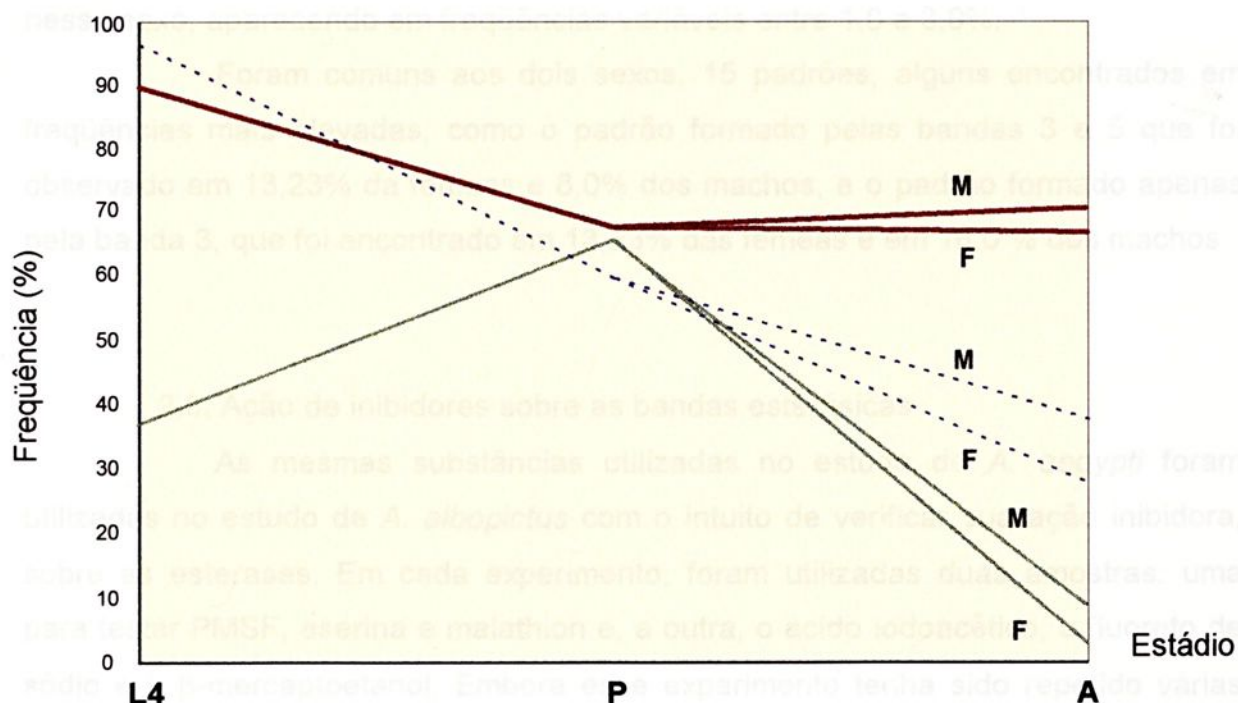


Figura 26. *A. albopictus*. Bandas que apresentaram variações acentuadas de frequência entre as fases de larva de 4º estágio (L4), pupas (P) e adultos (A) fêmeas (F) e machos (M). Banda 7 (—), Banda 14 (- - - - -) e Banda 16 (—).

9, 10, 11 e 12. A maioria das combinações (87) foi encontrada em um único indivíduo.

Nos adultos, foram encontrados 27 padrões individuais, em fêmeas, e 38 nos machos (Tabela 11). Dos 27 padrões encontrados nas fêmeas, 12 foram observados apenas nesse sexo, com a frequência mais alta de 5,88% e a mais baixa de 1,47%. Dos 38 padrões encontrados nos machos, 23 ocorreram apenas nesse sexo, aparecendo em frequências variáveis entre 1,0 e 3,0%.

Foram comuns aos dois sexos, 15 padrões, alguns encontrados em frequências mais elevadas, como o padrão formado pelas bandas 3 e 5 que foi observado em 13,23% das fêmeas e 8,0% dos machos, e o padrão formado apenas pela banda 3, que foi encontrado em 13,23% das fêmeas e em 16,0 % dos machos.

2.3. Ação de inibidores sobre as bandas esterásicas

As mesmas substâncias utilizadas no estudo de *A. aegypti* foram utilizadas no estudo de *A. albopictus* com o intuito de verificar sua ação inibidora, sobre as esterases. Em cada experimento, foram utilizadas duas amostras: uma para testar PMSF, eserina e malathion e, a outra, o ácido iodoacético, o fluoreto de sódio e o β -mercaptoetanol. Embora esse experimento tenha sido repetido várias vezes, algumas bandas, menos freqüentes, não foram detectadas nos géis e, conseqüentemente, não foram testadas quanto aos inibidores.

A Tabela 12 mostra os resultados da ação dessas substâncias. Os graus de inibição, apresentados nesta tabela, foram representados da mesma forma que em *A. aegypti* (Tabela 8). As Figuras 27 e 28 mostram géis tratados. As bandas testadas não estão todas presentes nos dois conjuntos de géis dessas figuras.

O fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) inibiu levemente as bandas 1 a 13. A banda 17 foi acentuadamente inibida por este composto (Figura 27B).

O sulfato de eserina mostrou uma inibição acentuada das bandas 1 a 13 e 17 (Figura 27C).

Quando os géis foram submetidos ao tratamento com malathion, verificou-se uma inibição completa das bandas 1 a 6 e 17, e leve das bandas 8 a 13 (Figura 27D).

O ácido iodoacético não mostrou efeito inibidor sobre as esterases deste organismo (Figura 28B).



Tabela 11. Variabilidade dos padrões individuais e frequência (número de indivíduos e porcentagem) observados nos adultos machos e fêmeas de *A. albopictus*.

Padrões	Bandas	Frequências (%)	
		Fêmeas	Machos
1-	2, 5, 9, 10, 11, 12, 13	----	1 (1)
2-	2, 3, 4, 5, 9, 10, 12	----	2 (2)
3-	2, 3, 4, 7, 9, 10, 13	----	1 (1)
4-	3, 7, 9, 10, 11, 12, 13	----	1 (1)
5-	2, 3, 4, 5, 8, 9	----	1 (1)
6-	2, 3, 4, 9, 10, 13	----	1 (1)
7-	3, 9, 10, 11, 12, 13	----	1 (1)
8-	4, 8, 9, 10, 11, 12	1 (1,47)	1 (1)
9-	2, 3, 4, 5, 6	----	1 (1)
10-	2, 3, 8, 9, 10	----	1 (1)
11-	2, 3, 9, 10, 13	----	1 (1)
12-	2, 7, 9, 10, 13	----	1 (1)
13-	3, 4, 5, 7, 9	----	1 (1)
14-	3, 9, 10, 11, 12	----	1 (1)
15-	2, 3, 4, 7	----	1 (1)
16-	2, 4, 5, 6	1 (1,47)	----
17-	2, 7, 8, 9	----	2 (2)
18-	3, 4, 5, 6	2 (2,94)	5 (5)
19-	3, 5, 6, 8	1 (1,47)	----
20-	3, 8, 9, 10	1 (1,47)	----
21-	5, 6, 8, 13	----	1 (1)
22-	2, 3, 4	2 (2,94)	5 (5)
23-	2, 8, 9	----	1 (1)
24-	3, 4, 5	4 (5,88)	----
25-	3, 4, 8	----	2 (2)
26-	3, 4, 9	----	1 (1)
27-	3, 5, 6	4 (5,88)	4 (4)
28-	3, 5, 8	1 (1,47)	----
29-	3, 8, 13	1 (1,47)	----
30-	3, 9, 10	----	1 (1)
31-	4, 5, 6	----	3 (3)
32-	5, 8, 13	1 (1,47)	----
33-	1, 2	1 (1,47)	----
34-	2, 3	6 (8,82)	8 (8)
35-	2, 5	2 (2,94)	4 (4)
36-	2, 8	----	1 (1)
37-	3, 4	1 (1,47)	6 (6)
38-	3, 5	9 (13,23)	8 (8)
39-	3, 8	2 (2,94)	----
40-	3, 9	2 (2,94)	----
41-	4, 5	3 (4,41)	2 (2)
42-	4, 6	1 (1,47)	1 (1)
43-	4, 9	1 (1,47)	1 (1)
44-	5, 6	1 (1,47)	----
45-	5, 9	----	1 (1)
46-	2	5 (7,35)	7 (7)
47-	3	9 (13,23)	16 (16)
48-	4	3 (4,41)	1 (1)
49-	5	2 (2,94)	3 (3)
50-	6	1 (1,47)	----

Tabela 12. Efeito de diferentes inibidores sobre as bandas esterásicas de *A. albopictus* analisadas (-: ausência de inibição; +, ++, +++, +++++: graus de inibição em ordem crescente).

Inibidores	Concentração	Bandas Esterásicas				
		1-6	8-13	15-16	17	18-20
PMSF	1 mM	+	+		+++	
Eserina	1 mM	+++	+++		+++	
Malathion	0,4 mM	++++	+		++++	
Ácido iodoacético	1 mM	-	-	-	-	-
Fluoreto de sódio	5 mM	++	+++	++++	++++	+++
β-mercaptoetanol	10 mM	++++	++++	++++	++++	++++

Figura 27 (A-D). *A. albopictus*. Ação de inibidores sobre as bandas esterásicas em géis de SDS-PAGE de pupas e adultos. A. Controle. B. PMSF. C. Eserina. D. Malathion.

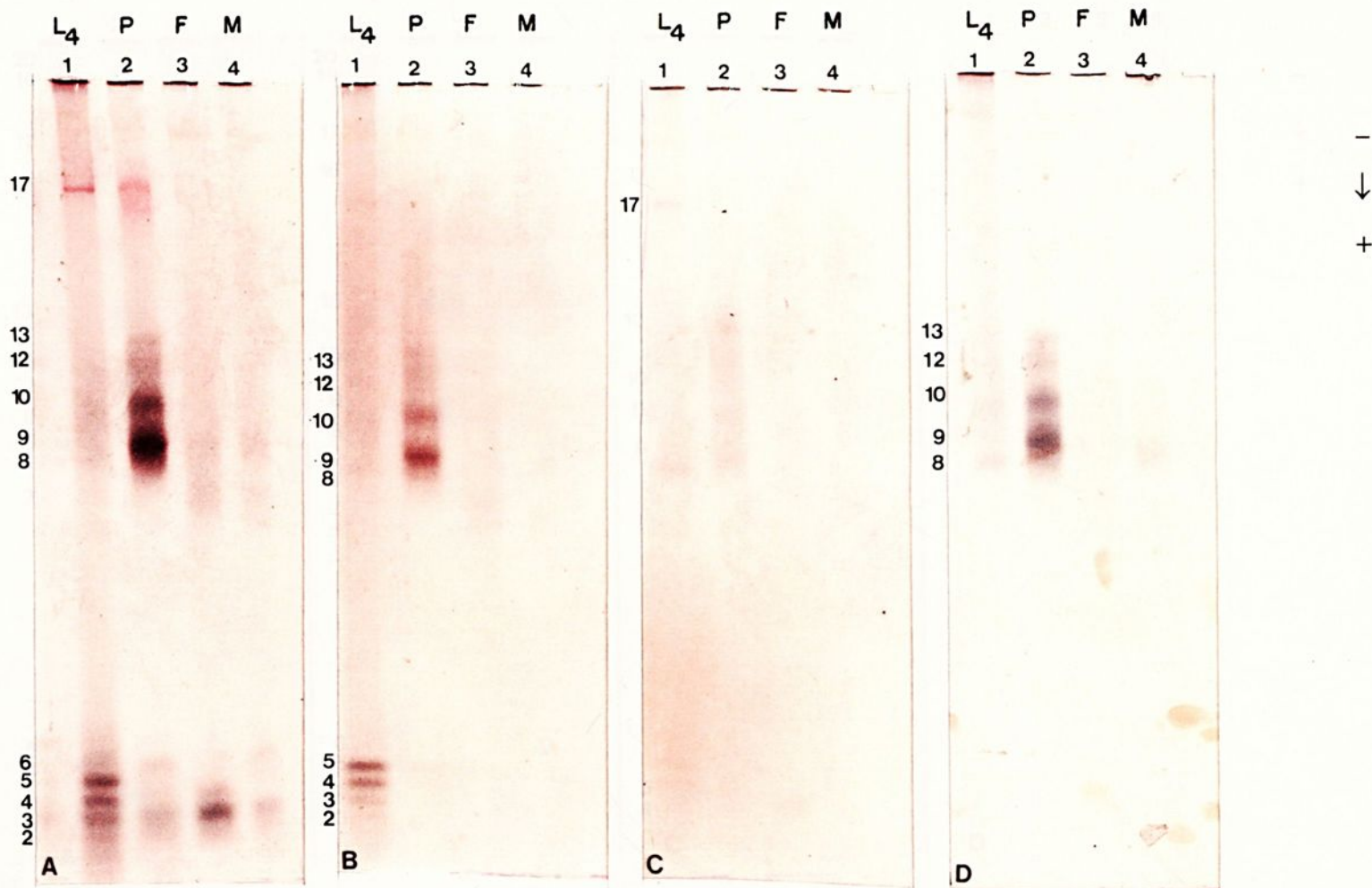


Figura 27 (A-D). *A. albopictus*. Ação de inibidores sobre as bandas esterásicas em géis das fases de L4, pupas e adultos. A. Controle. B. PMSF. C. Eserina. D. Malathion.

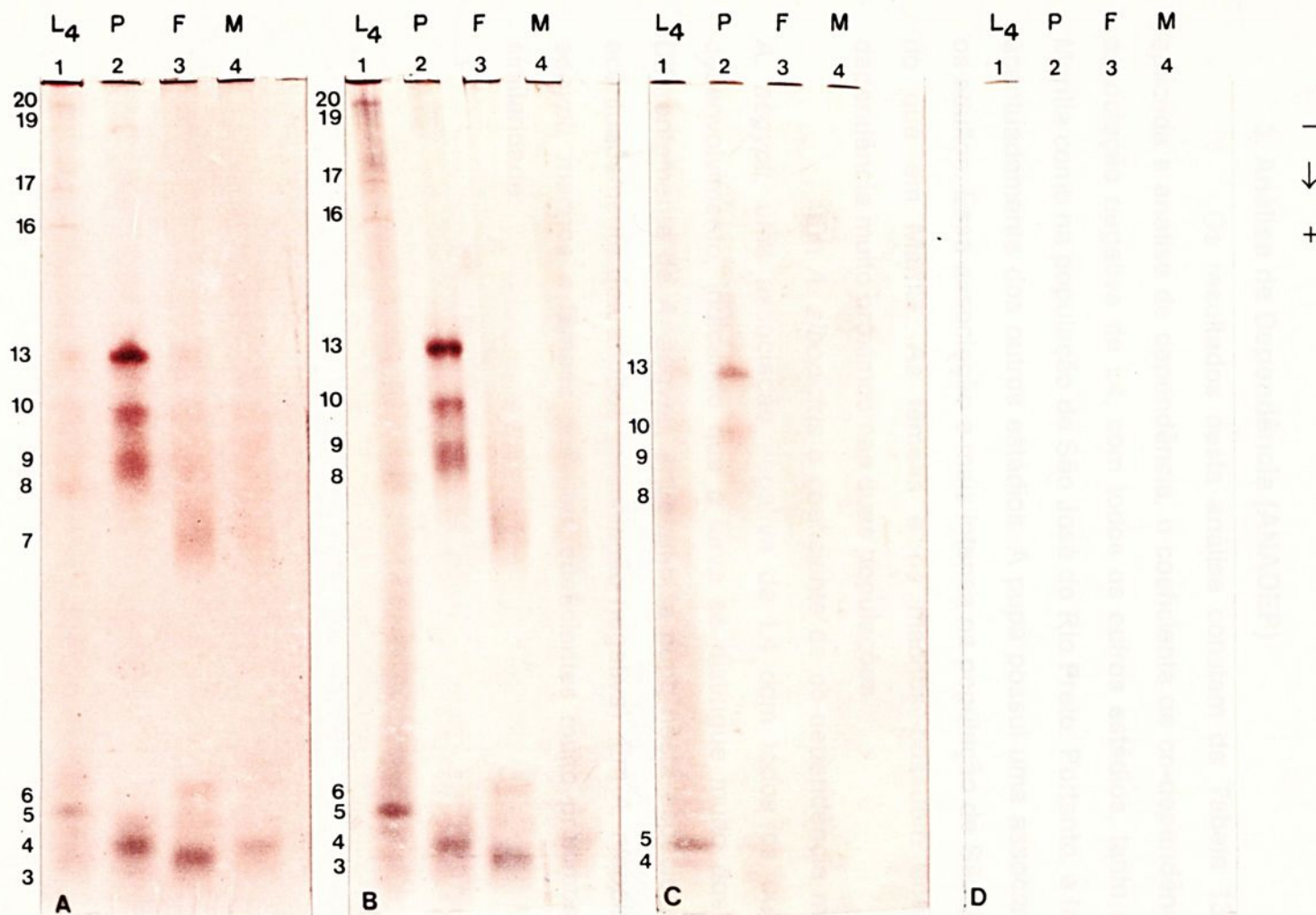


Figura 28 (A-D). *A. albopictus*. Ação de inibidores sobre as bandas esterásicas em géis das fases de L4, pupas e adultos. A. Controle. B. Ácido iodoacético. C. NaF. D. β-mercaptoetanol.

O fluoreto de sódio (NaF) apresentou uma ação inibidora leve das bandas 1 a 6, moderada das bandas 8 a 13 e 18 a 20 e completa das demais (Figura 28C), e o β -mercaptoetanol, mostrou uma inibição total das bandas esterásicas de *A. albopictus* (Figura 28D), da mesma maneira que em *A. aegypti*.

3. Análise de Dependência (ANADEP)

Os resultados desta análise constam da Tabela 13. Em *A. aegypti* aplicada a análise de dependência, o coeficiente de co-dependência, mostrou uma associação negativa de L4, com todos os outros estádios, tanto na população de Marília como na população de São José do Rio Preto. Portanto, a larva se diferencia acentuadamente dos outros estádios. A pupa possui uma associação positiva com os adultos. Essa associação é mais intensa na população de São José do Rio Preto do que em Marília. As fêmeas e os machos possuem coeficientes de co-dependência muito próximos nas duas populações.

Em *A. albopictus* o coeficiente de co-dependência mostrou, como em *A. aegypti*, uma associação negativa de L4 com todos os outros estádios do desenvolvimento, indicando que a larva se distingue muito dos outros estádios. Diferentemente de *A. aegypti*, entretanto, a pupa nesta espécie se distingue mais acentuadamente dos adultos (associação negativa). Em *A. albopictus*, como em *A. aegypti*, machos e fêmeas possuem coeficientes muito próximos, indicando forte similaridade.

<i>albopictus</i>	L4	1,0	-0,4051	-0,2514	-0,5330
<i>Tatami</i>	P	-0,4051	1,0	-0,3922	-0,3063
	F	-0,2514	-0,3922	1,0	0,7883
	M	-0,5330	-0,3063	0,7883	1,0

Tabela 13. Coeficientes de co-dependência entre os estádios de larva de 4º estágio (L4), pupa (P) e adultos (fêmea - F e macho - M), em *A. aegypti* e *A. albopictus*.

Espécies	Estádios	Estádios			
		L4	P	F	M
<i>A. aegypti</i> Marília	L4	1,0	-0,1612	-0,7780	-0,7804
	P	-0,1612	1,0	0,2947	0,3653
	F	-0,7780	0,2947	1,0	0,9145
	M	-0,7804	0,3653	0,9145	1,0
<i>A. aegypti</i> São José do Rio Preto	L4	1,0	-0,6473	-0,7553	-0,8191
	P	-0,6473	1,0	0,5184	0,7398
	F	-0,7553	0,5184	1,0	0,8633
	M	-0,8191	0,7398	0,8633	1,0
<i>A. albopictus</i> Taubaté	L4	1,0	-0,4051	-0,2514	-0,5330
	P	-0,4051	1,0	-0,3922	-0,3063
	F	-0,2514	-0,3922	1,0	0,7883
	M	-0,5330	-0,3063	0,7883	1,0

IV. DISCUSSÃO

Um dos trabalhos pioneiros, relativo a esterases, envolvendo o gênero *Aedes*, foi realizado por Freyvogel et al. (1968). Esses autores prepararam zimogramas de 14 espécies e raças de Culicídeos coletadas em diversos países. Utilizando gels de amido e poliacrilamida, verificaram a existência de padrões diferentes para cada espécie e concluíram que esta metodologia poderia ser útil para estudos de diferenciação entre espécies ou raças geográficas. Esta, e os trabalhos subsequentes, no gênero, envolvendo genes e sistemas enzimáticos, enfocaram quase que exclusivamente *A. aegypti* (Yang et al., 1981).

No presente trabalho, foi analisado o sistema de esterases em duas espécies do gênero *Aedes*, *A. aegypti* e *A. albopictus*, no decorrer do desenvolvimento. As fases analisadas foram as de larva de 2^o, 3^o, e 4^o estádios (L2, L3 e L4), pupas e adultos de ambos os sexos. Essa análise ao longo do desenvolvimento, poderia informar, se esse sistema é submetido a alterações decorrentes da atuação de mecanismos reguladores.

De *A. aegypti* foram analisadas amostras de duas populações: São José do Rio Preto e Marília. Ambas haviam sido estudadas anteriormente por Lima-Catalani (1991) e Lima-Catalani & Bicudo (1994). Esses trabalhos mostraram que a primeira dessas populações, submetida a uma intensa pulverização com inseticidas objetivando o controle do seu tamanho, apresentava uma alta frequência de aberrações cromossômicas não encontrada na segunda, proveniente de uma área não pulverizada de Marília. Assim, pretendemos, ao analisar essas populações quanto ao sistema de esterases, averiguar a existência de diferenças enzimáticas que pudessem estar relacionadas com a resistência aos inseticidas.

Resistência a inseticidas organofosforados e carbamatos foi relatada por inúmeros autores em diversos organismos. Em vários casos, os autores associam a resistência à superprodução de enzimas esterásicas, decorrente de amplificação gênica ou de mutações em pontos nos genes estruturais (Devonshire & Sawicki, 1979; Devonshire et al., 1988 e Field et al., 1993 em *Myzus persicae*; Mouches et al., 1987; Whyard et al., 1994 em *Culex*; Kao et al., 1993 em *Musca domestica*; Fournier et al., 1997 e 1999; Morton & Singh, 1982 e Mulero et al., 1994 em *Drosophila melanogaster*; Prabhakaran & Kamble, 1995 em baratas, entre outros).

IV. DISCUSSÃO



Um dos trabalhos pioneiros, relativo a esterases, envolvendo o gênero *Aedes*, foi realizado por Freyvogel et al. (1968). Esses autores prepararam zimogramas de 14 espécies e raças de Culicidae, coletadas em diversos países. Utilizando géis de amido e poliacrilamida, verificaram a existência de padrões diferentes para cada espécie e concluíram que esta metodologia poderia ser útil para estudos de diferenciação entre espécies ou raças geográficas. Este, e os trabalhos subsequêntes, no gênero, envolvendo genes e sistemas enzimáticos, enfocaram quase que exclusivamente *A. aegypti* (Yong et al., 1981).

No presente trabalho, foi analisado o sistema de esterases em duas espécies do gênero *Aedes*, *A. aegypti* e *A. albopictus*, no decorrer do desenvolvimento. As fases analisadas foram as de larva de 2°, 3°, e 4° estádios (L2, L3 e L4), pupas e adultos de ambos os sexos. Essa análise ao longo do desenvolvimento, poderia informar, se esse sistema, é submetido a alterações decorrentes da atuação de mecanismos reguladores.

De *A. aegypti* foram analisadas amostras de duas populações: São José do Rio Preto e Marília. Ambas haviam sido estudadas anteriormente por Lima-Catelani (1991) e Lima-Catelani & Bicudo (1994). Esses trabalhos mostraram que a primeira dessas populações, submetida a uma intensa pulverização com inseticidas objetivando o controle do seu tamanho, apresentava uma alta freqüência de aberrações cromossômicas não encontrada na segunda, proveniente de uma área não pulverizada de Marília. Assim, pretendemos, ao analisar essas populações quanto ao sistema de esterases, averiguar a existência de diferenças enzimáticas que pudessem estar relacionadas com a resistência aos inseticidas.

Resistência a inseticidas organofosforados e carbamatos foi relatada por inúmeros autores em diversos organismos. Em vários casos, os autores associam a resistência à superprodução de enzimas esterásicas, decorrente de amplificação gênica, ou de mutações em ponto, nos genes estruturais (Devonshire & Sawicki, 1979, Devonshire et al., 1986 e Field et al., 1993 em *Myzus persicae*; Mouches et al., 1987, Whyard et al., 1994 em *Culex*; Kao et al., 1984 e 1985 em *Musca domestica*; Fournier et al., 1987 e 1993, Morton & Singh, 1982 e Mutero et al., 1994 em *Drosophila melanogaster*; Prabhakaran & Kamble, 1995 em baratas, entre outros).



No caso de *Aedes*, em função de se tratar de um vetor de doenças, o desenvolvimento de resistência é preocupante por dificultar sua eliminação e conseqüentemente aumentar o risco do aparecimento de epidemias graves. Mourya *et al.* (1993) verificaram que, nessa espécie, a resistência ao DDT era devida à maior quantidade da enzima glutathion S-transferase e a tolerância ao malathion era devida a um aumento na atividade de enzimas esterásicas (Mourya *et al.* 1994).

A análise de *A. aegypti* e de *A. albopictus* teve por objetivo verificar a diferenciação entre as duas espécies, sendo a primeira de introdução mais antiga no Estado que a segunda.

Como foi dito na Introdução deste trabalho, *A. aegypti* e *A. albopictus* são espécies relacionadas que ocupam nichos ecológicos similares podendo coexistir na mesma região e utilizar os mesmos tipos de criadouros nos estágios larvais (Klowden, 1993).

Os zimogramas obtidos a partir de géis de poliacrilamida mostraram em *A. aegypti* um total de 22 bandas com atividade esterásica na população de Marília e 19 bandas na população de São José do Rio Preto. Em *A. albopictus*, foram encontradas 20 bandas com atividade esterásica. Entretanto, não foi possível estabelecer uma correspondência entre as bandas de ambas as espécies.

Na literatura, vários trabalhos mencionam números de bandas semelhantes aos de *A. aegypti* e de *A. albopictus*, em outras espécies de organismos, como por exemplo, Healy *et al.* (1991) que encontraram 22 esterases em *Drosophila melanogaster* utilizando eletroforese em gel de poliacrilamida e focalização isoelétrica. Também Ceron (1988) detectou 17 bandas esterásicas em fêmeas e 20 em machos de *D. mulleri* e 13 em fêmeas e 17 em machos de *D. arizonensis*. Lapenta (1992) detectou 43 bandas esterásicas em 8 linhagens isofêmeas, sendo sete da superespécie *D. serido* e uma de *D. buzzatii*. A95F3 foi a que apresentou o menor número de bandas (13) e B31D1, o maior (18).

Em *A. aegypti*, porém, outros autores encontraram um número muito menor de bandas que o mencionado neste trabalho. Por exemplo, Townson (1969) detectou seis bandas com atividade esterásica em adultos machos e fêmeas, utilizando gel de poliacrilamida, tampão borato pH 9,0 e como substrato o alfa-naftil acetato. O autor salientou que existia uma grande variabilidade individual e que raramente as seis bandas eram encontradas em um mosquito.



larval, o que acarretaria uma maior atividade ou pode também refletir alguma diferenciação da proteína no nível do desenvolvimento.

Ainda segundo Johnson *et al.* (1966) se α ou β -naftil acetatos são usados juntos, em uma mesma solução corante, as taxas de hidrólise dos dois ésteres, por algumas esterases, são suficientemente diferentes para levar ao predomínio do azul escuro (α -esterases) ou do vermelho (β -esterases).

Carrasco *et al.* (1984) observaram que soluções de coloração com α e β -naftil acetatos proporcionam boas resoluções e revelam diferenças na especificidade aos substratos.

Neste trabalho, as quantidades dos substratos utilizados na solução de coloração (15 mg de β e 30 de α -naftil acetato) permitiu identificar, em *A. aegypti*, 18 bandas (as de número 1 a 16, 22 e 23) coradas em tons escuros, variando de cinza claro a preto. Estas bandas são α -esterases. Cinco bandas (nº 17 a 21) coraram-se em tons de vermelho claro a escuro, correspondendo às bandas β -esterases.

Em *A. albopictus*, das 20 bandas esterásicas encontradas, 17 (as de nº 1 a 14, 18 a 20) são α -esterases e três (15 a 17) comportam-se como β -esterases.

Modificando-se as quantidades dos dois substratos (15 mg de α e 30 de β -naftil acetato) o resultado não se alterou, reforçando a indicação da atuação preferencial da maioria das bandas esterásicas, nestas espécies, sobre o substrato α .

As bandas β nas duas espécies foram encontradas apenas na região menos anódica do gel. As bandas α , entretanto, foram encontradas em três regiões: a primeira em uma região mais anódica, a segunda na porção central do gel e a terceira em uma região menos anódica.

As bandas encontradas tanto em *A. aegypti* como em *A. albopictus* ocorreram em maior número nos estádios larvais. Além disso, nessa fase as bandas são mais definidas e se coram mais intensamente do que nos outros estádios. O resultado da aplicação da análise de dependência (ANADEP) reforça essa maior diferenciação da fase larval em ambas as espécies. Esta constatação está de acordo com o trabalho de Saul *et al.* (1976) em *A. aegypti* e Tadano (1987) em *A. albopictus*.



Em *A. aegypti* da população de Marília foram encontradas 16 bandas nas fases de L2 e L3 e 19 na fase de L4. Na população de São José do Rio Preto, 14 bandas nas fases de L2 e L3 e 17 na fase de L4.

Em *A. albopictus* não foi detectada variação do número de bandas (19) entre os três estádios larvais analisados.

Khoo *et al.* (1992) mediram a atividade total de esterases em L4, pupa e adultos de 5 espécies de mosquitos, entre elas, *A. aegypti* e *A. albopictus*. De acordo com esses autores, em todas as espécies analisadas a atividade esterásica é maior em L4 do que nos outros estádios

O número de bandas decresce na fase de pupa e mais ainda nos adultos das duas populações e espécies, indicando um envolvimento menor das esterases, à medida em que o desenvolvimento prossegue. Como mencionamos na Introdução, as esterases têm sido relacionadas a quatro atividades fisiológicas básicas dos organismos, isto é, processo digestivo (Argentine & James, 1995), regulação do hormônio juvenil (Hanzilick *et al.*, 1989, Harshman *et al.*, 1994), reprodução (Ceron, 1988) e degradação de inseticidas (Bonning *et al.*, 1991, Field *et al.*, 1993, entre outros).

O número maior de bandas esterásicas na fase de larva pode ser atribuído a uma maior atividade destas com relação à alimentação e à regulação do hormônio juvenil relacionada às transformações mais intensas na forma. A transformação de insetos imaturos em adultos com capacidade reprodutiva está sob controle endócrino. Um dos hormônios envolvidos é a ecdisona, que estimula o crescimento e a muda. Um outro hormônio, o hormônio juvenil, é secretado nos estágios larvais e é responsável pela manutenção das estruturas larvais e inibição da metamorfose. O hormônio juvenil exerce seu efeito junto com a ecdisona, o hormônio responsável pela muda. Quando um nível sanguíneo relativamente alto de hormônio juvenil está presente, o resultado é a muda de um estágio larval para outro. Quando o nível de hormônio juvenil é baixo, a muda é de fase larval para pupa e, na ausência dele, tem-se a muda da fase de pupa para adulto (Barnes, 1984).

Em *Aedes*, durante o ciclo larval, o inseto se prepara para tornar-se adulto. As patas, asas e partes do aparelho bucal vão se formando lentamente e no último estágio larval, podem ser vistos sob o tegumento da larva (Jones, 1978).

Sabe-se que os insetos holometabólicos (insetos com metamorfose completa, com três estádios distintos: larva, pupa e adultos), na fase larval



alimentam-se ativamente para a intensa atividade metabólica subjacente aos processos de desenvolvimento e diferenciação. O desenvolvimento holometábolo é considerado de grande significado adaptativo na evolução dos táxons superiores, pois as larvas podem utilizar fontes alimentares, habitats e estilos de vida diferentes daqueles dos indivíduos adultos (Barnes, 1984).

No caso de *Aedes*, a alimentação das larvas é muito variada, pois, estas vivem na água, são onívoras, alimentando-se principalmente de detritos orgânicos, bactérias, leveduras vivas e pólen, através da filtração da água (Vanderley *et al.*, 1987). A alimentação variada e intensa, que caracteriza essa fase, pode ser um dos fatores básicos na presença de número elevado de bandas esterásicas que observamos.

Já na fase de pupa não ocorre ingestão de alimentos. Durante este estágio completa-se a transformação em adulto, boca e ânus são selados e assim a pupa não se alimenta, nem elimina excretas sólidos ou líquidos (Jones, 1978). Esta poderia ser uma das causas da diminuição do número de bandas esterásicas.

Na fase adulta, a situação também é diferente. O adulto recém-emergido passa suas primeiras 24 horas em repouso, pousado nas paredes ou superfícies verticais, sombreadas, ao redor do criadouro. Depois inicia um período de vôos curtos em busca do sexo oposto para a cópula, e de um hospedeiro para alimentar-se. Não há ordem preferencial para cópula e alimentação. Durante o repouso, ocorre nas fêmeas um desenvolvimento folicular parcial, cujo término está sujeito à ingestão de sangue (anautogenia) na maioria dos insetos hematófagos (Reyes-Villanueva, 1990). Os machos alimentam-se preferencialmente de fluidos "doces", como o néctar das flores. As fêmeas podem se alimentar de açúcar também, mas são dotadas de acentuada hematofagia (Jones, 1978). Embora a alimentação torne a ficar intensa nos adultos, não chega a atingir os padrões observados nas larvas. Além disso, o desenvolvimento está completo, com o inseto atingindo sua forma definitiva. Assim, é possível que as enzimas esterásicas detectadas nesta fase se relacionem predominantemente à reprodução e à alimentação.

Os dados obtidos neste trabalho, mostraram uma redução aproximada de 50% das bandas entre larva e pupa e 30% entre pupas e adultos na população de *A. aegypti* de Marília, e de 40% de bandas entre larva e pupa e 20% entre pupas e adultos na população de *A. aegypti* de São José do Rio Preto. Em *A. albopictus* a redução do número de bandas foi de 26% entre larva e pupa e 14% entre pupas e



adultos. Diferentemente de *A. aegypti*, em *A. albopictus*, na passagem da fase de larva para a de adulto, não desaparecem as bandas mais anódicas 2 a 6, embora não se saiba qual é a correspondência entre elas.

Não foram encontradas diferenças qualitativas entre os dois sexos nos adultos das duas espécies. No que se refere a uma das bandas (nº 7), encontrada exclusivamente em machos de *A. albopictus* possivelmente não foi detectada nas fêmeas pela baixa frequência apresentada.

Outro aspecto interessante refere-se às bandas β -esterásicas que estão predominantemente presentes na fase de larva (em *A. aegypti*, bandas 17 a 21, em *A. albopictus*, bandas 15 a 17). Em *A. aegypti* as bandas 18, 19 e 21 são exclusivas de larva. A banda 20, embora apareça também nas pupas, nestas apresenta uma diminuição drástica na frequência (79,50% em L4 e 2,78% em pupas na população de Marília e 82,72% em L4 e 10,0% em pupas de São José do Rio Preto) e na espessura. A banda 17, também β -esterásica, foi encontrada apenas em *A. aegypti* de Marília e somente na fase adulta.

Em *A. albopictus* a predominância das bandas β -esterásicas, na fase larval, é mais evidente, pois, as bandas 15 e 16 são encontradas somente nos estádios larvais e a 17 apresenta um comportamento muito semelhante ao da banda 20 de *A. aegypti*, isto é, embora também esteja presente nas pupas, sua frequência é menor (64,78% em L4 e 8,02% nas pupas) e sua espessura também.

Com relação ao comportamento da banda 20 de *A. aegypti* e da 17 de *A. albopictus*, observando as frequências com que ocorreram em larvas e pupas, podemos considerá-la específica das fases larvais. Sua ocorrência em algumas pupas, provavelmente, deve-se ao fato de termos trabalhado com pupas recém eclodidas, nas quais ainda haveria uma atividade residual desta enzima.

Bandas altamente frequentes e que ocorrem ao longo de todo o desenvolvimento devem estar relacionadas a funções vitais básicas. É o caso das bandas α -esterásicas 1, 13, e 14 de *A. aegypti* e 3 e 5 de *A. albopictus*. Destaca-se a banda 1 de *A. aegypti* que apareceu em 100% dos indivíduos e em todas as fases analisadas, das duas populações. Esta banda foi também a que apresentou maior espessura e intensidade de coloração. O comportamento dessa banda 1 mostra um paralelismo de comportamento ao das esterases EST-6 (Trebatoski & Craig, 1969) e EST- α (Townson, 1972).



Trabalhando com *Aedes aegypti*, Trebatoski & Craig (1969) designaram EST-6 à banda que se corava mais intensamente e de maior mobilidade em gel de amido, na concentração de 10,5%, em tampão borato, pH 8,6. Esta banda mostrou migração diferencial em 2 linhagens: uma banda mais lenta, 6^a, que aparecia na linhagem RED, e uma mais rápida, 6^b, presente na linhagem BLPCO.

Townson (1972), utilizando Cyanogum-41 (uma mistura pronta de acrilamida e bisacrilamida) e tampão fosfato pH 6,5, também detectou uma esterase (EST- α) que se corava mais intensamente, que possuía a migração mais rápida e que apresentava 4 fenótipos. Os fenótipos fast (F) e slow (S) mostraram uma única banda, sendo, como o próprio nome diz, a forma F mais rápida que a S. O fenótipo FS mostrava as 2 bandas e o fenótipo nulo não mostrava nenhuma das bandas esterásicas. Esses fenótipos foram encontrados em ovos, larvas, pupas e adultos. Com base em cruzamentos entre linhagens, o autor postulou que as formas F e S seriam controladas por 2 alelos, Est- α^f e Est- α^s e que um terceiro alelo ocorreria no mesmo locus, Est- α^x . Existiriam, assim 6 genótipos possíveis: f/f e f/x produzindo o fenótipo F; s/s e s/x produzindo o S; f/x produzindo o FS e x/x produzindo o fenótipo nulo. Não foram encontradas evidências, em nenhum dos cruzamentos, de que o sexo dos pais influenciava o fenótipo das esterases dos descendentes, concluindo, portanto, que o locus Est- α é autossômico. O autor submeteu as linhagens RED e BLPCO, usadas por Trebatoski & Craig (1969), às mesmas condições experimentais e concluiu que o locus da EST-6 e EST- α eram idênticos.

O loco Est-6 mostrou-se polimórfico em muitas populações de diferentes regiões geográficas (Mani *et al.*, 1986). Utilizando géis de poliacrilamida e larvas de 4º estágio ou pupas iniciais de populações de várias regiões, Saul *et al.* (1976), realizaram um trabalho com o objetivo de estudar a variabilidade genética no loco da esterase EST-6. Para isso, variaram substratos e inibidores da enzima. Observaram que esse loco era bastante complexo, com pelo menos 14 alelos, sendo que, para cada indivíduo, o padrão de bandas foi sempre de banda única, dupla ou nula.

Dinardo-Miranda (1994), estudou populações domésticas de *A. aegypti* de três municípios do Estado de São Paulo, em géis de amido, e encontrou o loco da EST-6 monomórfico em todas as amostras estudadas. Segundo a autora, se algum tipo de seleção tem protegido o polimorfismo deste loco, em diversas populações de várias regiões, outro tipo de seleção pode ter atuado nas três



populações paulistas, conduzindo ao monomorfismo. Segundo a autora, um dos fatores que deve ter exercido forte pressão de seleção foi a aplicação sistemática de inseticidas para erradicação do vetor, visto que o loco EST-6 tem sido relacionado à resistência a organofosforados, nessa espécie.

Chen & Sudderunddin (1978) verificaram que as larvas resistentes a compostos organofosforados e carbamatos de *A. aegypti* apresentavam maior atividade de esterases, sugerindo um possível papel delas na desintoxicação de inseticidas, da mesma forma que em outros organismos. Field & Hitchen (1981) e Field *et al.* (1984) demonstraram a existência de relação entre o nível de resistência a organofosforados (malathion) e a intensidade das bandas de todos os alelos do loco Est-6 em *A. aegypti*.

Segundo Dinardo-Miranda (1994), embora os autores acima citados tenham registrado um aumento da intensidade das bandas codificadas por qualquer um dos alelos desse loco, se uma das enzimas se mostrasse mais eficiente na desintoxicação, o alelo que a codificaria poderia se fixar na população, devido à grande pressão de seleção, exercida por aplicações destes produtos. As três populações analisadas por Dinardo-Miranda receberam aplicações de inseticidas por vários anos, e, por esse motivo, segundo a autora, faltam parâmetros para se afirmar que o monomorfismo encontrado seja devido a uma pressão de seleção exercida por estes produtos. No entanto, a grande atividade da enzima codificada pelo loco Est-6 pode ser atribuída a uma resposta do inseto aos organofosforados.

Nossos resultados quanto à banda 1, e supondo que corresponda à EST-6, estão de acordo com os de Dinardo-Miranda acima citados, referentes à ausência de polimorfismos. Talvez a banda 2 detectada no presente trabalho, possa ser um outro alelo desse loco, pois ocupa posição muito próxima no gel, também está presente em todos os estádios analisados e é inibida pelas mesmas drogas que a banda 1. Apesar da banda 2 ser encontrada em baixa frequência na população de Marília, na de São José do Rio Preto sua frequência aumenta, consideravelmente, nos adultos. Vale lembrar que esta última população foi coletada no ambiente externo e, portanto, está submetida a maiores pressões ambientais do que os indivíduos, criados em laboratório, de Marília, incluindo o efeito das pulverizações. Pode-se aventar a possibilidade de envolvimento dessa banda 2 com resistência.

Há ainda a considerar as bandas que são exclusivas de uma ou outra fase e que devem portanto referir-se a características fase-específicas. É o caso por



exemplo das bandas exclusivas da fase de larva, 3 a 5, de *A. aegypti*, cuja frequência é elevada nas duas populações (acima de 50%) e as bandas 6 e 9 cujas frequências são menores na população de Marília do que na de São José do Rio Preto.

Em *A. albopictus*, as bandas 14, 18 e 20, todas com frequência baixa, foram encontradas exclusivamente na fase larval.

Uma banda exclusiva da fase de pupa foi encontrada em *A. aegypti*, apenas na população de São José do Rio Preto, mas com baixa frequência (0,83%), a banda 11. Essa mesma banda, na população de Marília, ocorre nas fases de larva e pupa, também com baixa frequência em ambas (respectivamente 0,42 e 1,55%). É possível que nos indivíduos de São José do Rio Preto, esta banda não tenha sido detectada na larva, exatamente pela baixa frequência.

Na população de *A. aegypti* de Marília foi observada uma banda exclusiva da fase adulta (nº 17), ocorrendo em fêmeas com maior frequência que em machos. Essa mesma banda não foi encontrada na população de São José do Rio Preto, fazendo portanto parte das diferenças entre as duas populações analisadas. Outras diferenças entre ambas são: a banda nº 15 que na amostra de Marília é exclusiva dos adultos e na de São José do Rio Preto, aparece em pupas e adultos; a banda 8, que foi encontrada apenas nas fases larvais da amostra de São José do Rio Preto, e as bandas 10, 17, 22 e 23, que foram encontradas apenas na população de Marília. Dentre essas bandas, somente a de número 8, que é exclusiva da fase larval dos indivíduos de São José do Rio Preto, foi encontrada em frequência acima de 25%. As bandas ausentes na população de São José do Rio Preto ocorrem na de Marília com frequência muito baixa, com exceção da banda 17 (acima de 20%, em fêmeas). Essas bandas pouco frequentes podem ter resultado de detecção casual, em alguns indivíduos e não refletem uma real diferenciação entre as populações. A banda 10, da mesma forma, exclusiva da fase de pupa, também foi encontrada em apenas um indivíduo. As bandas 22 e 23, já mencionadas, ocorreram nas fases larvais, mas em frequência baixa. A ausência da banda 17 na população de São José do Rio Preto pode ser indicativa de que esta banda pode ter desaparecido devido a pressões no habitat, como as frequentes aplicações de inseticidas nos últimos anos.

Em *A. albopictus* a banda 19 foi encontrada nas larvas e nas pupas, nestas últimas, com frequência um pouco mais elevada (respectivamente 16,95 e 23,45%).



Na população de *A. aegypti* de Marília a banda 7 aparece nos machos (frequência de 17,20%) e está ausente nas fêmeas. Talvez essa banda constitua uma esterase macho-específica. Na população de São José do Rio Preto, porém, além de estar presente nos dois sexos, sua frequência maior é nas fêmeas. Isto pode indicar uma diferença entre as duas populações.

Em *A. albopictus*, uma banda coincidentemente também de nº 7, foi encontrada apenas nos adultos machos e, devido à frequência baixa (7%), esta banda não pode ser considerada macho-específica.

Esterases sexo-específicas foram observadas em algumas espécies de *Drosophila*. Kambysellis et al. (1968) detectaram em *D. aldrichi*, uma esterase exclusiva dos machos, presente principalmente no bulbo ejaculatório. Ocasionalmente, esta esterase estava presente em fêmeas recém-acasaladas, aparentemente transmitida pelo macho, durante a cópula. Esta esterase apresentou uma especificidade para o β -naftil acetato, sendo denominada esterase-F. Johnson et al. (1968), baseados no fato destas bandas estarem presentes no gel em forma única ou tripla, sugeriram que seu loco estrutural estaria localizado em um autossomo, mas que sua expressão seria limitada ao sexo.

Há outros exemplos de esterases sexo-específicas na literatura. Uma β -esterase macho-específica, também denominada EST-F, foi detectada em *D. dunni*, estando presente em 78% dos machos e ausente nas fêmeas. Segundo os autores, esta esterase (EST-F) não é ligada ao Y, desde que nove indivíduos machos com atividade desta enzima tiveram descendentes machos sem atividade da enzima e 2 machos sem a esterase ativa tiveram descendentes com atividade (Carrasco et al., 1984).

Ceron (1988) detectou duas esterases específicas dos machos de *D. mulleri*, três bandas esterásicas exclusivas dos machos de *D. arizonensis* e apenas uma banda específica das fêmeas dessa última espécie. Também Lapenta (1992) detectou 5 esterases específicas dos machos de *D. serido* e duas esterases, também específicas para os machos, em *D. koepferae*.

Argentine & James (1995) detectaram, em gel de poliacrilamida a 6%, na glândula salivar de fêmeas e machos de *A. aegypti*, uma atividade de esterase (EST-SG). No momento da eclosão, machos e fêmeas possuem a mesma quantidade dessa esterase mas, dois a três dias após, a atividade nas fêmeas é muito maior, enquanto nos machos permanece constante, indicando uma atividade fisiológica para essas enzimas nas fêmeas, relacionada com a alimentação. Essa



esterase não pode, entretanto, ser considerada fêmea-específica. Os mesmos autores obtiveram uma série de evidências mostrando que, além da esterase SG, as fêmeas devem possuir esterases adicionais, específicas da glândula salivar.

Em *D. melanogaster* ocorre um caso semelhante ao mencionado por Argentine & James (1995) e a esterase também não é considerada pelos vários autores, que a estudaram, como sexo-específica. Esta esterase, denominada EST-6, expressa-se principalmente no macho adulto e a maior parte de sua atividade é encontrada no ducto ejaculatório anterior do sistema reprodutivo (Sheehan *et al.*, 1979). A EST-6, sintetizada neste ducto é transferida para os órgãos reprodutivos da fêmea pelo fluido seminal dos machos, durante a cópula (Richmond *et al.* 1980). Esta esterase, porém, não é exclusiva desse tecido e nem exclusiva dos machos, mas sua função na reprodução está bem estabelecida. Essa transferência se dá durante os três primeiros minutos de cópula e o macho requer 24-48 horas para recuperar o nível de EST-6 (Richmond & Senior, 1981). Após alguns minutos de cópula, a Est-6 é transferida para a hemolinfa onde permanece até quatro dias após a cópula (Meikle *et al.*, 1990).

Mane *et al.* (1983a) mostraram que as fêmeas após o acasalamento com machos que continham a EST-6 ativa, eram menos receptivas na corte que fêmeas inseminadas por machos com esterase 6 inativa. A reação catalisada pela EST-6 é a hidrólise do cis-vaccenil acetato produzindo álcool cis-vaccenil. Ambos, éster ou seu produto derivado, parecem atuar como antiafrodisíacos. Ludwig *et al.* (1993) admitem que a EST-6 em *D. melanogaster* é uma enzima polifuncional, amplamente não-específica, que pode estar envolvida em vários processos fisiológicos, utilizando uma variedade de substâncias, as quais podem ser diferentes em vários tecidos e órgãos.

A análise dos padrões individuais nas duas espécies, realizadas no presente trabalho, mostrou uma combinação muito variada das bandas nesses indivíduos. Como já foi dito em Resultados, chamamos padrão individual à combinação das diferentes bandas em cada indivíduo, nas fases analisadas das duas populações de *A. aegypti* e de *A. albopictus*.

Nas larvas de 4º estágio o número de padrões encontrado foi muito elevado, nas duas espécies analisadas, indicando uma combinação casual dessas bandas. Nenhum padrão mostrou-se mais freqüente, o que nos daria uma indicação de maior valor adaptativo.



No que se refere às pupas, dos 38 padrões encontrados em Marília e 33 em São José do Rio Preto, 20 foram comuns as duas populações, 18 exclusivos de Marília e 13 foram exclusivos de São José do Rio Preto. Entre os padrões comuns, o resultante da combinação das bandas 1, 12 e 16 foi o mais freqüente nas duas populações, sugerindo tratar-se de esterases importantes nessa fase (18,57% em Marília e 16,67 % em São José do Rio Preto).

A maioria das combinações, comuns ou não, apresentou baixas freqüências, sugerindo tratar-se de combinações casuais. Há algumas combinações cujas freqüências oscilam ao redor de 10% mas a maioria é bem inferior a esse valor. No geral esses valores, para cada combinação, são aproximadamente iguais nas duas populações.

O mesmo ocorre em *A. albopictus*, com elevado número de padrões (119) nas pupas, mas sendo o mais freqüente encontrado em apenas quatro indivíduos.

Nos adultos de *A. aegypti*, o número de padrões detectados em Marília também foi maior do que em São José do Rio Preto (28 padrões nas fêmeas e 29 nos machos da primeira localidade e 16 na fêmeas e 14 nos machos da segunda localidade). Nos adultos de *A. albopictus* foram encontrados 27 padrões nas fêmeas e 38 nos machos. Essa diferença no número de padrões talvez possa ser decorrente da seleção natural mais forte no ambiente natural do que no laboratório. Isto talvez também possa explicar o número menor de bandas em São José do Rio Preto.

Do total de padrões, porém, em Marília 19 são comuns aos dois sexos e em São José do Rio Preto, apenas 7. Dentre os 19 padrões comuns aos dois sexos da população de Marília, 14 são exclusivos dessa população, sendo que o mais freqüente foi encontrado em 12% da amostra. Dos 7 padrões encontrados em São José do Rio Preto, apenas 2 são exclusivos desta população.

Cinco padrões são comuns às duas populações. Dentre esses padrões alguns foram encontrados em freqüências altas, como os formados pelas bandas 1, 14, 15 e 16, que foi encontrado em 16% das fêmeas e 18% dos machos da população de Marília e 8% e 5%, em fêmeas e machos de São José do Rio Preto, respectivamente, e 1, 13 e 14 que foi encontrado em 13% das fêmeas e 5% dos machos da população de Marília e 13% e 10%, em fêmeas e machos de São José do Rio Preto, respectivamente. No primeiro padrão acima citado, a freqüência é maior na população de Marília e no segundo, na de São José do Rio Preto. A banda



14 está presente nos dois padrões indicando sua importância nesse estágio do desenvolvimento. Um outro padrão freqüente nos dois sexos das duas populações, reforçando essa presença constante da banda 14, é o formado pelas bandas 1 e 14 que foi encontrado em 6% das fêmeas e 16% dos machos de Marília e 3 e 7 % das fêmeas e machos de São José do Rio Preto.

Quanto aos padrões exclusivos de um ou outro sexo, nas duas populações, suas freqüências são baixas, não indicando diferenças evidentes quanto ao valor adaptativo.

Dentre os 27 padrões encontrados nas fêmeas *A. albopictus*, 12 são exclusivos deste sexo, sendo que apenas um foi encontrado em uma freqüência um pouco mais elevada (5,88%). Os outros ocorreram em freqüências entre 1 e 3%. Dos 38 padrões encontrados nos machos, 23 são exclusivos deste sexo, todos com freqüências baixas (entre 1 e 3%). Quinze padrões são comuns aos dois sexos, estando entre estes as freqüências mais elevadas, como por exemplo, o padrão formado pela banda 3 que esteve presente em 13% das fêmeas e 16% dos machos, e o padrão formado pelas bandas 3 e 5 (13% das fêmeas e 8% dos machos) e pelas bandas 2 e 3 (8% das fêmeas e 8% dos machos). Notar a presença constante da banda 3 nos padrões mais comuns, indicando a importância da mesma.

Na tentativa de caracterizar melhor as bandas esterásicas, foram utilizados, no presente trabalho, seis inibidores conhecidos por sua ação sobre essas enzimas: fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF),² sulfato de eserina,³ ácido-iodoacético,⁴ fluoreto de sódio (NaF) e o β -mercaptoetanol, com o objetivo de obter informações sobre a estrutura das esterases de *A. aegypti* e de *A. albopictus*.

As esterases têm sido classificadas de acordo com a sensibilidade a diferentes inibidores. A classificação mais amplamente utilizada, é a de Holmes & Masters (1967), que baseia-se primariamente na sensibilidade a três grupos de inibidores: reagentes sulfidrílicos (tipicamente o ácido p-cloromercuribenzoato pCMB), organofosforados e sulfato de eserina.

De acordo com Oakeshott *et al.* (1993), quatro classes de enzimas são discriminadas com o uso desses compostos. As acetilesterases que não são inibidas por nenhum dos inibidores e geralmente preferem substratos alifáticos, derivados do ácido acético, as arilesterases que são inibidas apenas por reagentes sulfidrílicos e geralmente preferem substratos aromáticos, as carboxilesterases que são inibidas apenas por organofosforados e preferem ésteres alifáticos, geralmente de cadeias mais longas do que ácido acético e as colinesterases que são inibidas



por organofosforados e sulfato de eserina e preferem substratos eletricamente carregados (como os ésteres de colina).

Nossos resultados indicam que nenhuma das esterases detectadas nas duas espécies podem ser classificadas como acetilesterases, pois todas foram inibidas por uma ou outra das drogas.

O β -mercaptoetanol, na concentração de 10 mM, apresentou um efeito inespecífico, pois todas as bandas foram completamente inibidas. Essas observações indicam que o β -mercaptoetanol, na concentração utilizada, desnaturou completamente essas enzimas. Estes resultados, aliados à ausência de inibição apresentada pelo ácido iodoacético, indicam que nenhuma das esterases dessas espécies pode ser classificada como arilesterase. Nossos resultados estão de acordo com os de Ruiz (1995) que também obteve inibição total das esterases de *Haematobia irritans*, utilizando o β -mercaptoetanol na mesma concentração do presente trabalho. Segundo aquela autora, este composto, porém, não apresentou nenhum efeito numa concentração 10 vezes menor. Esses dados combinados ao uso de reagentes sulfidrílicos levaram Ruiz (1995) a concluir que *H. irritans* não apresenta esterases com características de arilesterases. Segundo Kuznetsov (1995), o β -mercaptoetanol também suprime totalmente a atividade de todas as bandas esterásicas de gansos do gênero *Anser*. Alguns autores (por exemplo, Mouches *et al.*, 1987) utilizam este composto para desnaturação de proteínas.

Em *A. aegypti* as bandas de 1 a 7, 18 e 20 foram levemente inibidas pela eserina e fortemente pelo malathion. Essas características indicam que essas bandas podem ser incluídas na família das carboxilesterases. Não foram encontradas bandas com essas características em *A. albopictus*.

Muitos trabalhos têm demonstrado que a atividade das carboxilesterases é maior nas linhagens resistentes quando comparadas com linhagens sensíveis a organofosforados e carbamatos em muitos organismos. Em *Culex pipiens* e *C. quinquefasciatus*, a resistência a organofosforados é devida ao aumento da desintoxicação, devido à superprodução de duas esterases, denominadas A e B. Essas esterases são classificadas como carboxilesterases (Ketterman *et al.*, 1992 e Karunaratne *et al.*, 1993). Whyard *et al.* (1994) analisando amostras de *C. tarsalis* mostrou que a resistência ao malathion é devida primariamente a quantidades aumentadas de uma carboxilesterase (MCE), em todos os estádios do desenvolvimento. Níveis elevados de esterases da mesma classe, considerada responsável pela resistência, também foram encontrados em



Musca domestica por Kao *et al.* (1984, 1985) e em *Myzus persicae* por Devonshire & Sawicki (1979), Devonshire *et al.* (1986) e Field *et al.* (1993).

No presente trabalho, as bandas 12 e 14 de *A. aegypti* são totalmente inibidas pela eserina e fortemente inibidas pelo malathion. Com o mesmo padrão de inibição, encontramos as bandas 1 a 6 e 17 de *A. albopictus*. Essas características sugerem uma ligação com as colinesterases, ou mais especificamente com as acetilcolinesterases.

Como foi dito em Introdução, as colinesterases dividem-se em acetilcolinesterases e pseudocolinesterases. As acetilcolinesterases (AChE) terminalizam o impulso nervoso, catalisando a hidrólise de um neurotransmissor: a acetilcolina. É uma enzima chave no sistema nervoso dos insetos, nos quais o sistema colinérgico é essencial (Pralavorio & Fournier, 1992). Esta enzima é muito conservada em invertebrados e vertebrados, do ponto de vista de sua estrutura molecular, como indicado por alguns trabalhos. Sussman *et al.* (1991) relataram a existência de várias formas oligoméricas da acetilcolinesterase em dois gêneros distintos de peixes-elétricos: *Electrophorus* e *Torpedo*, que são estruturalmente homólogas nos nervos e músculos dos vertebrados. Em *Drosophila*, o gene que codifica esta enzima foi clonado e o seqüenciamento dos clones de DNAc correspondentes tornou possível identificar a estrutura deste gene devido à sua grande homologia com o gene que codifica a mesma enzima em *Torpedo californica* (Fournier *et al.*, 1988). Zhu & Clark (1994) purificaram a acetilcolinesterase do besouro *Leptinotarsa decemlineata*. Quando esses autores compararam a seqüência de aminoácidos desta enzima com a da acetilcolinesterase de *D. melanogaster*, verificaram uma alta semelhança entre ambas, quanto aos tipos e às freqüências dos aminoácidos. Em particular, o conteúdo dos aminoácidos ácidos (ácido aspártico e ácido glutâmico) e básicos (arginina, histidina e lisina) foram idênticos entre essas enzimas, indicando também, uma alta homologia entre os genes que codificam para estas acetilcolinesterases.

Nos insetos, somente um gene codifica para a acetilcolinesterase e sua proteína está restrita ao sistema nervoso central. Esta enzima possui uma única forma molecular, com estrutura dimérica de 150 kd, sendo que cada unidade possui 75 kd e, por sua vez, é constituída por dois polipeptídios de 55 e 18 kd. O polipeptídio de 55 kd contém o sítio ativo portador da serina, o glicolipídio-âncora responsável pela ligação à membrana, e a cisteína, envolvida com a dimerização



(Fournier *et al.*, 1992). Em *Drosophila* este gene (*Ace*) está localizado no sítio 87E3 do cromossomo politênico IIIR (Oakeshott *et al.*, 1993).

Em *A. aegypti* a banda 13 também foi totalmente inibida pela eserina, mas diferentemente das outras duas, foi apenas levemente inibida pelo malathion. O mesmo ocorreu com as bandas 8 a 13 de *A. albopictus*. Esses experimentos foram repetidos cinco vezes e sempre encontramos os mesmos resultados.

Os inseticidas organofosforados e carbamatos inibem a AChE quase irreversivelmente. A conformação desses inseticidas é análoga ao substrato natural, a acetilcolina, e se ligam covalentemente ao sítio ativo (Aldrige, 1953), causando a morte do inseto.

Entretanto, o uso intenso de inseticidas por mais de 30 anos tem resultado no aparecimento de várias espécies de insetos resistentes, possuindo AChEs alteradas que são menos sensíveis aos inseticidas (Mutero *et al.*, 1994). Morton & Singh (1982) isolaram uma linhagem de *Drosophila* (MH19) resistente ao malathion, devido a uma mutação no gene da acetilcolinesterase, resultante da troca de uma fenilalanina por uma tirosina na posição 368 (Phe³⁶⁸ → Tir). Essa mutação tem sido encontrada em várias outras linhagens resistentes (Mutero *et al.*, 1994).

Na tentativa de encontrar em *Drosophila melanogaster* outras mutações responsáveis pela resistência, Fournier *et al.* (1993) selecionaram populações de campo originadas de vários países. Treze entre vinte e duas linhagens eram resistentes ao parathion, devido a alterações na AChE e os autores determinaram três novas mutações: Phe¹¹⁵ → Ser, Gly³⁰³ → Ala e Leu¹⁹⁹ → Val. Cada uma dessas mutações leva a padrões diferentes de resistência e várias mutações ocorrem frequentemente no mesmo gene, em moscas mais resistentes.

Mutero *et al.* (1994), utilizando várias linhagens mutantes de *D. melanogaster*, entre as quais a MH19, encontraram além das quatro mutações já citadas por Fournier *et al.* (1993) mais uma mutação a Ileu¹⁹⁹ → Thr. A maioria das linhagens resistentes mostraram combinações de várias mutações, sugerindo que, um alto nível de resistência se origina a partir de várias combinações de pequenas mutações responsáveis por uma resistência mais fraca, e não uma única mutação produzindo alta resistência. Os autores discutem ainda que, a recombinação entre mutações isoladas pré-existentes, também contribui para a combinação de várias mutações em uma mesma proteína. Esta possibilidade de aquisição de resistência por recombinação intracistrônica é interessante, uma vez que permite explicar



algumas características observadas na resistência dos insetos. Exemplos de insetos que são resistentes por mais de um mecanismo, devido a diferentes genes, têm sido encontrados. É comum admitir que a resistência pode resultar de eventos de recombinação entre dois ou mais genes. A extensão dos mecanismos de recombinação de mutações dentro de um único gene pode explicar a frequência de ocorrência de resistência nos insetos. Além disso, a recombinação intracistrônica é um evento mais freqüente do que as mutações em ponto: King & Jukes (1969) estimaram a taxa de substituição de nucleotídeos em cerca de 10^{-8} a 10^{-9} por códon, por geração, enquanto a frequência do *crossing-over* entre duas mutações no loco *Ace* de *D. melanogaster* (loco que codifica para a enzima AChE) está próximo de 10^{-5} . A estrutura altamente dividida (*spliced*) dos genes para AChE nos insetos, favorece grandemente a recombinação (Fournier *et al.*, 1987). Finalmente, a existência de várias mutações em ponto e a ocorrência de recombinação intracistrônica entre as mutações constituem mecanismos para a aquisição de resistência aos inseticidas.

Nossos resultados, mostrando a leve sensibilidade das bandas 13 de *A. aegypti* e 8 a 13 de *A. albopictus*, ao malathion, podem indicar que seriam colinesterases resistentes ao malathion.

O fluoreto de sódio (NaF) inibiu completamente as bandas 18 e 20 de *A. aegypti* e as bandas 15 a 17 de *A. albopictus*, e moderadamente as bandas 8 a 13 e 18 a 20 de *A. albopictus*. Este composto é utilizado como inseticida para o controle de baratas e formigas e, foi demonstrado que também atua como inibidor das pseudocolinesterases (Whittaker, 1984) e de esterases em leucócitos e plaquetas humanas (Dufer *et al.*, 1984). Em insetos, as informações relacionadas com a inibição de esterases por este composto são escassas e segundo Oakeshott *et al.* (1993), nenhuma enzima com características bioquímicas de pseudocolinesterase foi descrita em *Drosophila* ou outros insetos. Contudo, Bitondi & Mestriner (1983) relataram a inibição de três esterases em pupas bem desenvolvidas de *Apis mellifera*, com NaF na concentração de 20 mM, mas esses autores não realizaram uma classificação para estas três enzimas.

Nossos resultados sugerem que talvez o fluoreto de sódio possa ser utilizado como controle para *A. aegypti* e de *A. albopictus* já que inibe enzimas específicas do 4º estágio larval dessas espécies. Entretanto, essa sugestão deve ser vista com cautela, pois mais estudos precisam ser realizados para este fim.



O fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) inibiu completamente as bandas 1 e 2 de *A. aegypti* e quase que completamente as bandas 12 a 14 e 18 dessa mesma espécie e a 17 de *A. albopictus*. O PMSF descrito inicialmente como um inibidor específico de serino-proteases, como a tripsina, foi posteriormente reconhecido como um inibidor de serino-esterases (Sekar & Hageman, 1979). Este fato, segundo Heymann (1980), reforça as evidências de que as esterases estão relacionadas filogeneticamente às serino-proteases, formando a família multigênica das serino-hidrolases. Assim, o PMSF poderia ser considerado um inibidor geral das serino-hidrolases, englobando as serino-proteases e as serino-esterases. Entretanto, Myers *et al.* (1988) baseados em análises moleculares, concluíram que as esterases não podem ser incluídas, juntamente com as serino-proteases, na família multigênica das hidrolases, mas respostas definitivas para explicar a evolução de funções similares, em grupos diferentes de enzimas, requerem mais estudos.

Portanto, os dados obtidos no presente trabalho mostram diferenças quanto às esterases entre as fases do desenvolvimento analisadas, em ambas as espécies de *Aedes*. Diferenças ocorrem também mesmo quando são consideradas as combinações de bandas (padrões individuais), comuns às diferentes fases. A comparação entre as duas populações de *A. aegypti*, uma delas coletada nos criadouros resultantes da ação do homem e a outra criada em laboratório, também mostra diferenças, entre ambas, que se caracterizam por padrões de bandas diferentes e também diferenças quanto às frequências de combinações de bandas comuns às duas populações. A continuidade dos estudos é necessária para uma melhor caracterização das bandas e de seus papéis no desenvolvimento e diferenciação dessas espécies.

V. RESUMO E CONCLUSÕES



O padrão de esterases, foi analisado, em *Aedes aegypti* procedente de Marília e de São José do Rio Preto, SP e em *A. albopictus* procedente de Taubaté, SP. Foram analisadas larvas de 2°, 3° e 4° estádios (L2, L3 e L4), pupas e adultos de ambos os sexos, utilizando a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida.

Em *A. aegypti*, foram encontradas 22 bandas com atividade esterase na população de Marília e 19 bandas na população de São José do Rio Preto e, em *A. albopictus*, 20 bandas. Este número de bandas é maior do que o descrito na literatura para as duas espécies.

Apesar de *A. aegypti* e de *A. albopictus* serem espécies muito próximas, a metodologia utilizada não permitiu estabelecer correspondência entre suas esterases.

Foi encontrado um número maior de bandas nas fases larvais das duas espécies, havendo uma redução de suas freqüências da fase de larva para a de pupa e da fase de pupa para a de adulto de 50% e 30%, respectivamente, nas amostras de *A. aegypti* de Marília de 40% e 20%, na de São José do Rio Preto de 26% e 14% na de *A. albopictus*.

Dentre as 22 bandas de *A. aegypti*, cinco (17 a 21) são β -esterases e 18 (1 a 16, 22 e 23) α -esterases. Em *A. albopictus*, 17 (1 a 14, 18 a 20) são α -esterases e três (15 a 17) são β -esterases. As β -esterases localizam-se exclusivamente na região menos anódica do gel e são mais freqüentes em larvas e pupas. As α -esterases distribuem-se nas regiões mais anódica, intermediária e menos anódica e estão presentes em todas as fases do desenvolvimento.

Nas duas espécies, foram encontradas bandas altamente freqüentes e que ocorrem ao longo de todo o desenvolvimento, provavelmente relacionadas a funções biológicas básicas. É o caso das bandas α -esterásicas 1, 13, e 14 de *A. aegypti* e 3 e 5 de *A. albopictus*. Destaca-se a banda 1 de *A. aegypti* que aparece em 100% dos indivíduos e em todas as fases analisadas, das duas populações. Na literatura, encontramos algum paralelismo de comportamento da banda 1 com a EST-6, que é relacionada com o desenvolvimento.

V. RESUMO E CONCLUSÕES

Foram detectadas esterases fase-específicas, como as bandas α , 3 a 5, de *A. aegypti*, com freqüências elevadas nas duas populações, e as bandas 8 e 9 cujas freqüências são menores na população de Marília do que na de São José do



O padrão de esterases, foi analisado, em *Aedes aegypti* procedente de Marília e de São José do Rio Preto, SP e em *A. albopictus* procedente de Taubaté, SP. Foram analisadas larvas de 2º, 3º e 4º estádios (L2, L3 e L4), pupas e adultos de ambos os sexos, utilizando a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida.

Em *A. aegypti*, foram encontradas 22 bandas com atividade esterásica na população de Marília e 19 bandas na população de São José do Rio Preto e, em *A. albopictus*, 20 bandas. Este número de bandas é maior do que o descrito na literatura para as duas espécies.

Apesar de *A. aegypti* e de *A. albopictus* serem espécies muito próximas, a metodologia utilizada não permitiu estabelecer correspondência entre suas esterases.

Foi encontrado um número maior de bandas nas fases larvais das duas espécies, havendo uma redução de suas frequências da fase de larva para a de pupa e da fase de pupa para a de adulto de 50% e 30%, respectivamente, nas amostras de *A. aegypti* de Marília, de 40% e 20% na de São José do Rio Preto e de 26% e 14% na de *A. albopictus*.

Dentre as 23 bandas de *A. aegypti*, cinco (17 a 21) são β -esterases e 18 (1 a 16, 22 e 23), α -esterases. Em *A. albopictus*, 17 (1 a 14, 18 a 20) são α -esterases e três (15 a 17) são β -esterases. As β -esterases localizam-se exclusivamente na região menos anódica do gel e são mais freqüentes em larvas e pupas. As α -esterases distribuem-se nas regiões mais anódica, intermediária e menos anódica e estão presentes em todas as fases do desenvolvimento.

Nas duas espécies, foram encontradas bandas altamente freqüentes e que ocorrem ao longo de todo o desenvolvimento, provavelmente relacionadas a funções biológicas básicas. É o caso das bandas α -esterásicas 1, 13, e 14 de *A. aegypti* e 3 e 5 de *A. albopictus*. Destaca-se a banda 1 de *A. aegypti* que apareceu em 100% dos indivíduos e em todas as fases analisadas, das duas populações. Na literatura, encontramos algum paralelismo de comportamento da banda 1 com a EST-6, que é relacionada com o desenvolvimento de resistência a inseticidas.

Foram detectadas esterases fase-específicas, como as bandas α , 3 a 5, de *A. aegypti*, com frequências elevadas nas duas populações, e as bandas 6 e 9 cujas frequências são menores na população de Marília do que na de São José do



Rio Preto, e, em *A. albopictus*, as bandas 14, 18 e 20, com frequência baixa, sendo todas características da fase de larva. As bandas 15 e 17 são exclusivas dos adultos de *A. aegypti* de Marília, ocorrendo nos dois sexos. Essas diferenças demonstraram a existência de variação da síntese de esterases ao longo do desenvolvimento, nas duas espécies. Na fase de pupa, também foram encontradas bandas de ocorrência exclusiva, porém, dada sua baixa frequência, é incerta a sua especificidade.

Quanto a esterases sexo-específicas, descritas em vários organismos, no presente trabalho foi encontrada apenas uma banda que, na fase adulta, está restrita aos machos de *A. aegypti* de Marília. Pela frequência apresentada esta banda pode ser, supostamente, classificada como macho-específica.

Com referência aos padrões individuais, que resultam da combinação de bandas, nas larvas de 4º estágio, seu número foi muito elevado, nas duas espécies, sem destaque de frequência, sugerindo uma combinação casual das bandas.

No que se refere às pupas de *A. aegypti*, dos 38 padrões encontrados na amostra de Marília e 34 na de São José do Rio Preto, 20 foram comuns às duas populações. Entre os padrões comuns, o resultante da combinação das bandas 1, 12 e 16 foi o mais freqüente em ambas, sugerindo tratar-se de combinação importante de esterases, nessa fase. A maioria das combinações, comuns ou não, apresentou baixas frequências. O mesmo ocorreu em *A. albopictus*, com elevado número de padrões nas pupas (119), tendo sido, o mais freqüente, encontrado em apenas quatro indivíduos.

Nos adultos de *A. aegypti*, o número de padrões detectados na população de Marília também foi maior do que na de São José do Rio Preto (28 padrões nas fêmeas e 29 nos machos da primeira localidade e 16 nas fêmeas e 14 nos machos da segunda). Nos adultos de *A. albopictus* foram encontrados 27 padrões nas fêmeas e 38 nos machos. Essa diferença no número de padrões, das três populações, talvez possa ser decorrente da seleção mais forte no ambiente externo do que no laboratório.

Do total de padrões dos adultos, na população de Marília, 19 foram comuns aos dois sexos e na de São José do Rio Preto, apenas 7. Dentre os 19, 14 foram exclusivos dessa população. Dos 7 padrões encontrados em *A. aegypti* de São José do Rio Preto, apenas 2 foram exclusivos desta população. Em função da frequência, porém, pode constituir diferença entre as duas populações o padrão



constituído pelas bandas 1, 13, 14, 15 e 16 observado na população de Marília e o constituído pelas bandas 1, 7, 12 e 13 na de São José do Rio Preto. Dentre os padrões comuns às duas populações, alguns foram encontrados em frequências altas, como o formado pelas bandas 1, 14, 15 e 16.

Dentre os 27 padrões encontrados nas fêmeas de *A. albopictus*, 12 foram exclusivos deste sexo, sendo que apenas um foi encontrado em frequência um pouco mais elevada (5,88%). Dos 38 padrões encontrados nos machos, 23 foram exclusivos deste sexo, todos com frequência reduzida (entre 1 e 3%). Quinze padrões foram comuns aos dois sexos, estando entre estes, os de frequências mais elevadas, como por exemplo, o padrão formado, exclusivamente, pela banda 3 que esteve presente em 13% das fêmeas e 16% dos machos.

Foram utilizados inibidores, com o objetivo de classificar as esterases de *A. aegypti* e de *A. albopictus* conforme sua natureza bioquímica. Os resultados indicam que nenhuma das esterases detectadas nas duas espécies pode ser classificada como acetilesterase ou arilesterase.

O padrão de inibição apresentado pelas bandas 1 a 7, 18 e 20 de *A. aegypti* indicam que essas enzimas sejam carboxilesterases. Muitos trabalhos têm demonstrado que a atividade das carboxilesterases é maior nas linhagens resistentes quando comparadas com linhagens sensíveis a organofosforados e carbamatos, em muitos organismos. Isto reforça a idéia de relacionamento entre a banda 1, descrita neste trabalho e a EST-6, já mencionada.

As bandas 12 e 14 de *A. aegypti* e as bandas 1 a 6 e 17 de *A. albopictus* possuem comportamento característico de colinesterases. Esta última espécie, diferentemente de *A. aegypti*, apresentou todas as bandas esterásicas analisadas com características de colinesterases.

A banda 13 de *A. aegypti* e as bandas 8 a 13 de *A. albopictus* apresentaram características de colinesterases, embora tenham sido apenas levemente inibidas pelo malathion. Esses resultados parecem indicar que seriam colinesterases resistentes ao malathion.

O fluoreto de sódio inibiu mais especificamente as bandas larvais, sugerindo que talvez possa ser utilizado como controle para *A. aegypti* e de *A. albopictus*.

Portanto, os dados obtidos mostraram diferenças, quanto às esterases, entre as fases do desenvolvimento, tanto em *A. aegypti* como em *A. albopictus*. Mostraram também diferenças entre as duas populações de *A. aegypti*, uma



originada de criadouro em laboratório e outra coletada no ambiente urbano. A continuidade dos estudos é necessária para melhor caracterizar as bandas, seu controle genético e seu papel no desenvolvimento e diferenciação.

VI. SUMMARY AND CONCLUSIONS



Esterase pattern was analyzed in *Aedes aegypti* samples from Marília and São José do Rio Preto, SP, and in *A. albopictus* samples from Taubaté, SP. Polyacrylamide gel electrophoresis was used in the study of developmental stages L2, L3 and L4, pupae and adult males and females of both species.

The zymograms obtained showed 22 esterase bands in *A. aegypti* samples from Marília, 19 in those from São José do Rio Preto and 20 in *A. albopictus*. These numbers are greater than those previously found in these species by other authors.

Although *A. aegypti* and *A. albopictus* are considered close species, the methodology used in the present study did not demonstrate correspondence of their esterase bands.

The number of esterase bands was greater in the larval stages of both species. A decrease of 50% in the number of bands from larval to pupal stage and of 30% from pupae to adults was observed in *A. aegypti* from Marília. In São José do Rio Preto populations, this decrease was, respectively 40% and 20%, and 28% and 14% in *A. albopictus*.

Among the 23 bands of *A. aegypti*, five (17 to 21) are β -esterases and 18 (1 to 16, 22 and 23) are α -esterases. In *A. albopictus*, 17 (1 to 14, 18 to 20) are α -esterases and 3 (15 to 17) are β -esterases. The β -esterases were found exclusively in the anodic region of the gel and are more frequent in larvae than in pupae. The α -esterases were found in the more anodic, intermediate and less anodic regions, in every developmental stage.

Highly frequent bands that occurred during all examined developmental stages are probably related to basic biological functions. In the present study, they were found in both species, as for example the α -esterase bands 1, 13 and 14 of *A. aegypti*, and 3 and 5 of *A. albopictus*. Band 1 from *A. aegypti* must be pointed out because it appeared in 100% of individuals in every analyzed stage in both populations. A parallelism between band 1 and band EST-6, described in literature, seems to exist.

VI. SUMMARY AND CONCLUSIONS

Stage-specific esterases were detected, as α bands 3 to 5 from *A. aegypti* that exhibited high frequencies in both populations, and bands 6 and 9 with frequencies lower in Marília than in São José do Rio Preto populations, and bands

Esterase pattern was analyzed in *Aedes aegypti* samples from Marília and São José do Rio Preto, SP, and in *A. albopictus* samples from Taubaté, SP. Polyacrylamide gel electrophoresis was used in the study of developmental stages L2, L3 and L4, pupae and adult males and females of both species.

The zymograms obtained showed 22 esterase bands in *A. aegypti* samples from Marília, 19 in those from São José do Rio Preto and 20 in *A. albopictus*. These numbers are greater than those previously found in these species by other authors.

Although *A. aegypti* and *A. albopictus* are considered close species, the methodology used in the present study did not demonstrate correspondence of their esterase bands.

The number of esterase bands was greater in the larval stages of both species. A decrease of 50% in the number of bands from larval to pupal stage and of 30% from pupae to adults was observed in *A. aegypti* from Marília. In São José do Rio Preto populations, this decrease was, respectively 40% and 20%, and 26% and 14% in *A. albopictus*.

Among the 23 bands of *A. aegypti*, five (17 to 21) are β -esterases and 18 (1 to 16, 22 and 23) are α -esterases. In *A. albopictus*, 17 (1 to 14, 18 to 20) are α -esterases and 3 (15 to 17) are β -esterases. The β -esterases were found exclusively in the anodic region of the gel and are more frequent in larvae than in pupae. The α -esterases were found in the more anodic, intermediate and less anodic regions, in every developmental stage.

Highly frequent bands that occurred during all examined developmental stages are probably related to basic biological functions. In the present study, they were found in both species, as for example the α -esterase bands 1, 13 and 14 of *A. aegypti*, and 3 and 5 of *A. albopictus*. Band 1 from *A. aegypti* must be pointed out because it appeared in 100% of individuals in every analyzed stage in both populations. A paralelism between band 1 and band EST-6, described in literature, seems to exist.

Stage-specific esterases were detected, as α bands 3 to 5 from *A. aegypti*, that exhibited high frequencies in both populations, and bands 6 and 9 with frequencies lower in Marília than in São José do Rio Preto populations, and bands



14, 18 and 20, of *A. albopictus*, with low frequencies. All of these bands are characteristic of larval stages. Bands 15 and 17 are exclusive to *A. aegypti* adults from Marília and occur in both sexes. Such differences show that there is esterase synthesis variation during development in both species. In pupal stage, bands of exclusive occurrence were also found, but their frequencies were low, making their specificity uncertain.

Regarding sex-specific esterases, as described in literature for several organisms, in the present study only one band was found in adult stage, restricted to *A. aegypti* males from Marília, which exhibited high frequency and is assumed to be a male-specific band.

As to individual patterns resulting from band combinations, the 4th instar larvae showed the highest number in both species but with similar and low frequencies, suggesting combinations randomly effected.

Pupal stages of *A. aegypti* showed 38 patterns in Marília and 34 in São José do Rio Preto populations. Twelve patterns are shared by both populations; the pattern constituted by bands 1, 12, and 16 was the most frequent in both populations, which suggests that this is an important combination of esterases in this developmental stage. Most of the combinations, shared or not, showed low frequencies, in *A. aegypti* as well as in *A. albopictus*. The latter species showed a higher number of patterns (119), but the most frequent was found in only four individuals.

In *A. aegypti* adults from Marília, the number of patterns was also higher than in those from São José do Rio Preto (28 patterns in females and 29 in males from the first locality and 16 in females and 14 in males from the second). In *A. albopictus* adults, 27 patterns in females and 38 in males were observed. This difference in number of patterns observed among populations might be due to selection acting more strongly in external environments than in the laboratory.

Of the total patterns found in adults from Marília, 19 were shared by both sexes while in São José do Rio Preto only 7 patterns exhibited this characteristic. Among the 19, 14 were exclusive to Marília, while among the 7 only two were exclusive to São José do Rio Preto samples. However, only the pattern formed by bands 1, 13, 14, 15 and 16 from Marília, and the pattern formed by bands 1, 7, 12 and 13 from São José do Rio Preto showed frequencies high enough to be considered true differences between these populations. Among the patterns shared



by both *A. aegypti* populations, some showed high frequencies, as that formed by bands 1, 14, 15 and 16.

In *A. albopictus*, among the 27 patterns found in females, 12 were exclusive to this sex, but only one showed a slightly higher frequency (5.88%). Among males of this species, 23 of the 38 detected patterns were exclusive to this sex, but all showed very low frequencies (between 1% and 3%). Fifteen patterns were shared by both sexes and exhibited high frequencies, as for example, the pattern formed by band 3 alone, that was present in 13 % of females and 16% of males.

Inhibitors used in an attempt to classify the esterases detected in *A. aegypti* and *A. albopictus*, regarding their biochemical nature, showed that none of the esterases analyzed can be classified as acetylcholinesterase or arylesterase.

The inhibition pattern showed by bands 1 to 7, 18 and 20 of *A. aegypti* indicated that they are carboxylesterases. Several studies in literature involving a variety of organisms have shown that carboxylesterase activity is greater in strains resistant to organophosphates and carbamates than in sensitive strains. The results of the inhibition tests reinforce the idea that band 1 may be related to EST-6, mentioned above.

Bands 12 and 14 of *A. aegypti* and bands 1 to 6 and 17 of *A. albopictus* showed inhibition patterns characteristic of cholinesterase. The analyzed bands of the latter species, differently from *A. aegypti*, are classified as cholinesterase.

Band 13 of *A. aegypti* and bands 8 to 13 of *A. albopictus* showed characteristics of cholinesterases, although they are only slightly inhibited by malathion. These results may indicate that they are cholinesterase resistant to malathion.

Sodium fluoride inhibited more specifically the larval bands, which suggests that this substance could be used in the control of *A. aegypti* and *A. albopictus*.

Therefore, the obtained data for *A. aegypti* and *A. albopictus* showed esterase bands variation during development. They also showed differences between *A. aegypti* samples maintained in laboratory and collected in the nature. Other studies are necessary for a better characterization of the esterase bands detected, their genetic control and their role in development and differentiation.



- VALDRIGE, W. N. Serum esterases: two types of esterase (A and B) hydrolyzing p-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination. *Biochem. J.*, v. 53, p. 110-117, 1953.
- ALVES, M.C.G.P., GURGEL, S.M., ALMEIDA, M.C.R.R. Plano amostral para cálculo de capacidade larvária de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* no Estado de São Paulo, Brasil. *Rev. Saúde Pública, S. Paulo*, v. 25, p. 251-256, 1991.
- ARAV, R., RIMON, S. Purification and characterization of acetylcholinesterase from bull testes. *Bioch. Biophys. Acta*, v. 916, p. 313-320, 1987.
- ARGENTINE, J.A., JAMES, A.A. Characterization of a salivary gland-specific esterase in the vector mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, v. 25, p. 621-630, 1995.
- AYALA, F.J. Genetic polymorphism: from electrophoresis to DNA sequences. *Experientia*, v. 39, p. 813-823, 1983.
- BAQUER, S., HAYES, C.G., MURPHY, J.R., WATTS, D.M. Vertical transmission of West Nile virus by *Culex* and *Aedes* species mosquitoes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 46, p. 757-762, 1993.
- BARNES, R.D. Os insetos. In: ____ *Zoologia dos Invertebrados*, 4.ed. São Paulo: Roca, 1984, cap. 16, p. 897-930.
- BECKMAN, L., JOHNSON, F.M. Esterase variations in *Drosophila melanogaster*. *Hereditas*, v. 51, p. 212-220, 1964.
- BESANSKY, N.J., FINNERTY, V., COLLINS, F.H. Molecular perspectives on the genetics of mosquitoes. In: SCANDALIOS, J.G., WRIGHT, T.R.F. (Ed.) *Advances in Genetics*. New York: Academic Press, 1992, v. 30, p. 123-164.
- BITONDI, M.M.G., MESTRINER, M.A. Esterase isozymes of *Apis mellifera*: substrate and inhibition characteristics, developmental ontogeny, and electrophoretic variability. *Biochem. Genet.*, v. 221, p. 965-1002, 1983.
- BLACK, W.G.IV, RAI, K.S., TURCO, B.J., ARROYO, D.G. Laboratory study of competition between United States strains of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.*, v. 20, p. 100-107, 1983.
- BONNING, B.C., HEMINGWAY, J., ROMI, R., MAJORI, G. Interaction of insecticide resistance genes in field populations of *Culex pipiens* (Diptera, Culicidae) from

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



- (*) ALDRIGE, W. N. Serum esterases: two types of esterase (A and B) hydrolysing p-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination. *Biochem. J.*, v. 53, p. 110-117, 1953.
- ALVES, M.C.G.P., GURGEL, S.M., ALMEIDA, M.C.R.R. Plano amostral para cálculo de densidade larvária de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* no Estado de São Paulo, Brasil. *Rev. Saúde Pública*, S. Paulo, v. 25, p. 251-256, 1991.
- * ARAV, R., RIMON, S. Purification and characterization of acetylcholinesterase from bull testes. *Bioch. Biophys. Acta*, v. 916, p. 313-320, 1987.
- ARGENTINE, J.A., JAMES, A.A. Characterization of a salivary gland-specific esterase in the vector mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, v. 25, p. 621-630, 1995.
- AYALA, F.J. Genetic polymorphism: from electrophoresis to DNA sequences. *Experientia*, v. 39, p. 813-823, 1983.
- BAQUAR, S., HAYES, C.G., MURPHY, J.R., WATTS, D.M. Vertical transmission of West Nile virus by *Culex* and *Aedes* species mosquitoes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 48, p. 757-762, 1993.
- BARNES, R.D. Os insetos. In: _____. *Zoologia dos invertebrados*. 4.ed. São Paulo: Roca, 1984. cap. 16, p. 897-930.
- * BECKMAN, L., JOHNSON, F.M. Esterase variations in *Drosophila melanogaster*. *Hereditas*, v. 51, p. 212-220, 1964.
- BESANSKY, N.J., FINNERTY, V., COLLINS, F.H. Molecular perspectives on the genetics of mosquitoes. In: SCANDALIOS, J.G., WRIGHT, T.R.F. (Ed.) *Advances in Genetics*. New York: Academic Press, 1992. v. 30, p. 123-184.
- BITONDI, M.M.G., MESTRINER, M.A. Esterase isozymes of *Apis mellifera*: substrate and inhibition characteristics, developmental ontogeny, and electrophoretic variability. *Biochem. Genet.*, v. 221, p. 985-1002, 1983.
- BLACK, W.C.IV, RAI, K.S., TURCO, B.J., ARROYO, D.C. Laboratory study of competition between United States strains of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.*, v. 26, p. 260-271, 1989.
- BONNING, B.C., HEMINGWAY, J., ROMI, R., MAJORI, G. Interaction of insecticide resistance genes in field populations of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) from

Italy in response to changing insecticide selection pressure. **Bull. Entomol. Res.**, v. 1, p. 5-10, 1991.

* BRADY, J.P., RICHMOND, R.C. An evolutionary model for the duplication and divergence of esterase genes in *Drosophila*. **J. Mol. Evol.**, v. 34, p. 506-521, 1992.

* BRADY, J.P., RICHMOND, R.C., OAKESHOTT, J.G. Cloning of the esterase-5 locus from *Drosophila pseudoobscura* and comparison with its homologue in *D. melanogaster*. **Mol. Biol. Evol.**, v. 7, p. 525-546, 1990.

BRETEAU, H. La fièvre jaune en Afrique occidentale française: un aspect de la médecine préventive massize. **Bull. W. H. O.**, v. 11, p. 453-481, 1954.

BRISABOLS, A., GOULLET, P. Isolation and characterization of carboxylesterase E₃ from *Salmonella enterica*. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 75, p. 176-183, 1993.

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

CERON, C. R., SANTOS, J. R., BICUDO, C. R. The use of gelatin to dry cellophane wound slab gels in an embroidering hoop. **Rev. Bras. Genet.**, v. 15, p. 201-203, 1992.

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

CHEN, Y.P., SUDDERUNDDIN, K.I. Toxicological studies of insecticides on *Culex quinquefasciatus* say and *Aedes aegypti* (L). **Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health**, v. 9, p. 378-383, 1978.

CORDEIRO, J.A. Analysis of dependency. Campinas: Instituto de Matemática da Universidade Estadual de Campinas, 1987. (Relatório Técnico, n. 48/87).

* COLLET, C., NIELSEN, K.M., RUSSEL, 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.

DAVIS, B. J. Disc electrophoresis. II: methods and application to serum proteins. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 121, p. 404-427, 1964.

DÉGALLIER, N., ROSA, A. P. A. T, HERVÉ, J.P., ROSA, J. F.S.T., VASCONCELOS, P. F. C., SILVA, C. J. M., BARROS, V. L. R. S., DIAS, L.B., ROSA, E.S.T.,



- RODRIGUES, S.G. A comparative study of yellow fever in Africa and South America. *Ciênc. Cult.*, v. 44, p. 143-151, 1992.
- DEVONSHIRE, A.L., SAWICKI, R.M. Insecticide-resistant *Myzus persicae* as an example of evolution by gene duplication. *Nature*, v. 280, p. 140-141, 1979.
- DEVONSHIRE, A.L., SEARLE, L.M., MOORES, G.D. Quantitative and qualitative variation in the mRNA for carboxylesterases in insecticide-susceptible and resistant *Myzus persicae* (Sulz). *Insect Biochem.*, v. 16, p. 659-665, 1986.
- DINARDO-MIRANDA, L.L. Variabilidade proteica em populações naturais de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae). Ribeirão Preto, 1994. 122p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Genética). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.
- DUFER, J., TRENTESAUX, C., DESPLACES, A. Differential effect of the serine protease inhibitor phenyl methyl sulfonyl fluoride on cytochemically detectable esterases in human leucocytes and platelets. *Scand. J. Haematol.*, v. 32, p. 25-32, 1984.
- FIELD, L.M., WILLIAMSON, M.S., MOORES, G.D., DEVONSHIRE, A.L. Cloning and analysis of the esterase genes conferring insecticide resistance in the peach-potato aphid, *Myzus persicae* (Sulzer). *Biochem. J.*, v. 294, p. 569-574, 1993.
- FIELD, W.M., HITCHEN, J.M, REES, A.T. Esterase activity in strains of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) tolerant and susceptible to the organophosphate insecticide Malathion. *J. Med. Entomol.*, v. 21, p. 412-418, 1984.
- FIELD, W.M., HITCHEN, J.M. Linkage relationships between an esterase locus and group II markers in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.*, v. 18, p. 61-64, 1981.
- FORATTINI, O.P. Gêneros *Aedes* e *Psorophora*. In: _____. *Entomologia médica*. São Paulo: EDUSP, 1965. v. 2, p. 229-496.
- FORATTINI, O.P. Identificação de *Aedes* (Stegomyia) *albopictus* (Skuse) no Brasil. *Rev. Saúde Pública*, v. 20, p. 244-245, 1986.
- FOURNIER, D., BERGE, J.B., CARDOSO, A.M.L., BORDIER, C. Acetylcholinesterase from *Musca domestica* and *Drosophila melanogaster* brain are linked to membranes by a glycopospholipid anchor sensitive to an endogenous phospholipase. *J. Neurochem.*, v. 50, p. 1158-1163, 1988.



- FOURNIER, D., CUANY, A., BRIDE, J.M., BERGE, J.B. Molecular polymorphism of head acetylcholinesterase from adult house flies *Musca domestica*. *J. Neurochem.*, v. 50, p. 1454-1461, 1987.
- FOURNIER, D., MUTERO, A., PRALAVORIO, M., BRIDE, J.M. *Drosophila* acetylcholinesterase: mechanisms of resistance to organophosphates. *Chem. Biol. Interact.*, v. 87, p. 233-238, 1993.
- FOURNIER, D., MUTERO, A., RUNGGER, D. *Drosophila* acetylcholinesterase: expression of a functional precursor in *Xenopus* oocytes. *Eur. J. Biochem.*, v. 203, p. 513-519, 1992.
- FOX, I. Malathion resistance in *Aedes aegypti* of Puerto Rico induced by selection pressure on larvae. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 29, p. 1456-1459, 1980.
- FRANCO, O. História da febre amarela no Brasil. *Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop.*, v. 21, p. 315-512, 1969.
- FREYVOGEL, T.A., HUNTER, R.L., SMITH, E.M. Nonspecific esterases in mosquitos. *J. Histochem. Cytochem.*, v. 16, p. 765-790, 1968.
- GOMES, A.C., FORATTINI, O.P., KAKITANI, I., MARQUES, G.R.A.M., MARQUES, C.C.A., MARUCCI, D., BRITO, M. Microhabitats de *Aedes albopictus* (Skuse) na região do Vale do Paraíba, Estado de São Paulo, Brasil. *Rev. Saúde Pública, S. Paulo*, v. 26, p. 108-118, 1992.
- GRAYBIEL, A. M.; RAGSDALE, C. W. Pseudocholinesterase staining in the primary visul pathway of the macaque monkey. *Nature*, v. 299, p. 439-442, 1982.
- GRIST, N.R. *Aedes albopictus*: the tyre-travelling tiger. *J. Infec.*, v. 27, p. 1-4, 1993.
- GRIST, N.R., BURGESS, N.R.H. *Aedes* and dengue. *Lancet.*, v. 343, n. 8895, p. 477, 1994.
- GUBLER D.J., TRENT, D.W. Emergence of epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health problem in the Americas. *Infect. Agents Dis.*, v. 2, p. 383-393, 1994.
- HANZILICK, T. N., ABDEL-AAL, Y. A. I., HARSHMAN, L. G., HAMMOCK, B. D. Isolation and sequencing of cDNA clones coding for juvenile hormone esterase from *Heliothis virescens*. Evidence for a catalytic mechanism for the serine carboxylesterases different from that of the serine proteases. *J. Biol. Chem.*, v. 264, p. 12419, 1989.



- HANZILICK, T.N., HAMMOCK, B.D. Characterization of juvenile hormone hydrolysis in early larval development of *Tricophusiani*. **Arch. Insect. Bioch. Physiol.**, v. 9, p. 135-156, 1988.
- HARRIS, R.L. Enzyme polymorphisms in man. **Proc. R. Soc. Lond.**, v. 164, p. 298-310, 1966.
- HARRIS, H., HOPKINSON, D.A., EDWARDS, Y.H. Polymorphism and the subunit structure of enzymes: a contribution to the neutralist-selectionist controversy. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 74, p. 698-701, 1977.
- HARSHMAN, L.G., WARD, V.K., BEETHAM, J.K., GRANT, D.F., GRAHAN, L.J., ZRAKET, C.A., HEICKE, D.G., HAMMOCK, B.D. Cloning, characterization, and genetics of the juvenile hormone esterase gene from *Heliothis virescens*. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 24, p. 671-676, 1994.
- HAWLEY, W.A., REITER, P., COPELAND, R.S., PUMPUNI, C.B., CRAIG, G.B.Jr. *Aedes albopictus* in North America: probable introduction in used tires from Northern Asia. **Science**, v. 236, p. 1114-1115, 1987.
- HEALY, M. J., DUMANCIC, M. M., OAKESHOTT, J. G. Biochemical and physiological studies of soluble esterases from *Drosophila melanogaster*. **Biochem. Genet.**, v. 29, p. 365-388, 1991.
- HEYMANN, E. Carboxylesterases and amidases. In:____. **Enzymatic basis of detoxication**. New York: Academic Press, 1980. v. 2, p. 291-323.
- HOBBS, J.H., HUGHES, E.A., EICHOD II, B.H. Replacement of *Aedes aegypti* by *Aedes albopictus* in Mobile, Alabama. **J. Am. Mosq. Control Assoc.**, v. 7, p. 488-489, 1991.
- HOLMES, R.S., MASTERS, C.J. The developmental multiplicity and isoenzyme status of cavian esterases. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 132, p. 379-399, 1967.
- HOPKINSON, D.A. Isozymes. **J. Clin. Pathol.**, v. 24 (suppl.), p. 122-127, 1974.
- HUANG, Y.S., WOODS, L. SULTATOS, L.G. Solubilization and purification of A-esterase from mouse hepatic microsomes. **Biochem. Pharmacol.**, v. 48, p. 1273-1280, 1994.
- * IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature. Nomenclature of multiple forms of enzymes. Recommendations (1976). **J. Biol. Chem.**, v. 252, p. 5939-5941, 1977.



- ✧ JOHNSON, F. M., KANAPI, C. G., RICHARDSON, R. H., WHEELER, M. R., STONE, W. S. XVIII. An operational classification of *Drosophila* esterases for species comparasion. **Univ. Texas Publ.**, v. 6615, p. 517-532, 1966.
- ✧ JOHNSON, F.M., RICHARDSON, R.H., KAMBYSELLIS, M.P. Isozyme variability in species of the genus *Drosophila*. III: qualitative comparison of the esterases of *D. aldrichi* and *D. mulleri*. **Biochem. Genet.**, v. 1, p. 239-247, 1968.
- JONES, B.R., BRANCOFT, H.R. Distribution and probable physiological role of esterases in reproductive, digestive and fat-body tissue of adult cotton boll weevil, *Anthonomus grandis*. **Biochem. Genet.**, v. 24, p. 499-508, 1986.
- JONES, D., JONES, G., RUDNICKA, M., CLICK, A.J., SREEKRISHNA, S. C. High resolution isoelectric focusing of juvenile hormone esterase activity from the hemolymph of *Trichoplusia ni* (Hubner). **Experientia**, v. 42, p. 45-47, 1986.
- JONES, D., JONES, G., WING, K.D., RUDNICKA, M., HAMMOCK, B.D. Juvenile hormone esterases of hepdoptera. I: activity in the hemolymph during the last larval instar of 11 species. **J. Comp. Physiol.**, v. 148, p. 1-10, 1982.
- JONES, J.C. The feeding behaviour of mosquitoes. **Sci. Am.**, v. 238, p. 112-120, 1978.
- ✧ JUNG, W. Carboxylesterases. In: BERGMAYER, H. U. (Ed.) **Methods of enzymatic analysis**. 3.ed. Weinhein: Chemie, 1984. v. 4, p. 2-7.
- ✧ JUNG, W. Human microsomal carboxylesterase. Distribution in several tissues and some preliminary observations on its appearance in serum. **Enzymes Health Dis.**, p. 54-58, 1981.
- ✧ JUNG, W., KLEES, H. Arylesterases. In: BERGMAYER, H. U. (Ed.). **Methods of enzymatic analysis**. 3.ed. Weinhein: Chemie, 1984. v. 4, p. 9-14.
- KAMBYSELLIS, M.P., JOHNSON, F.M., RICHARDSON, R.H. Isozyme variability in species of the genus *Drosophila*. IV: distribution of the esterases in the body tissues of *D. aldrichi* and *D. mulleri*. **Biochem. Genet.**, v. 1, p. 249-265, 1968.
- KAO, L.R., MOTOYAMA, N., DAUTERMAN, W.C. Studies on hydrolases in various house fly strains and their role in malathion resistance. **Pestic. Biochem. Physiol.**, v. 22, p. 86-92, 1984.
- KAO, L.R., MOTOYAMA, N., DAUTERMAN, W.C. The purification and characterization of esterases from insecticide-resistant and susceptible house flies. **Pestic. Biochem. Physiol.**, v. 23, p. 228-239, 1985.



- KAPIN, M.A., AHMAD, S. Esterases in larval tissues of gypsy moth *Lymantria dispar* (L): optimum assay conditions, quantification and characterization. *Insect Biochem.*, v. 10, p. 331-337, 1980.
- KARUNARATNE, S.H.P.P., JAYAWARDENA, K.G.I., HEMINGWAY, J., KETTERMAN, A.J. Characterization of a B-type esterase involved in insecticide resistance from the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *Biochem. J.*, v. 294, p. 575-579, 1993.
- KETTERMAN, A.J., JAYAWARDENA, K.G.I., HEMINGWAY, J. Purification and characterization of a carboxylesterase involved in insecticide resistance from the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *Biochem. J.*, v. 287, p. 355-360, 1992.
- KHOO, H.G.N., WONG, K.P., SIT, K.H., HO, B.C. A fluorimetric assay of general esterase activity in individual larva, pupa and adult mosquito. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, v. 22, n. 3, p. 227-235, 1992.
- KING, J.L., JUKES, T.H. Non-Darwinian Evolution. Most evolutionary change in proteins may be due to neutral mutations and genetic drift. *Science*, v. 164, p. 788-798, 1969.
- KLOWDEN, M.J. Mating and nutritional state affect the reproduction of *Aedes albopictus* mosquitoes. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, v. 9, n. 2, p. 169-173, 1993.
- KLOWDEN, M.J., CHAMBERS, G.M. Reproductive and metabolic differences between *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.*, v. 29, p. 467-471, 1992.
- KORT, C.A.D., GRANGER, N.A. Regulation of the juvenile hormone titer. *Annu. Rev. Entomol.*, v. 26, p. 1-28, 1981.
- KUZNETSOV, S.B. Polymorphism of blood plasma esterases in geese of the *Anser* genus (Aves: Anseriformes). *Biochem. Genet.*, v. 33, p. 183-187, 1995.
- LABATE, J., BORTOLI, A., GAME, A.Y., COOKE, P.H., OAKESHOTT, J.G. The number and distribution of esterase 6 alleles in populations of *Drosophila melanogaster*. *Heredity*, v. 63, p. 203-208, 1989.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LAPENTA, A.S. Padrões de esterases na superespécie *Drosophila serido* e em *D. buzzatii*. São José do Rio Preto, 1992. 123p. Dissertação (Mestrado em



- Ciências Biológicas - Genética). Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista. 114, p. 971-982, 1985.
- LAYER, P. G.; SPORNS, O. Spatiotemporal relationship of embryonic cholinesterases with cell proliferation in chicken brain and eye. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 84, p. 284-288, 1987.
- LEWONTIN, R.C., HUBBY, J.L. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. II. Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *D. pseudoobscura*. *Genetics*, v. 54, p. 595-609, 1966.
- LIMA, J.T.F. Risco de urbanização da febre amarela no Brasil. *Cad. Saúde Pública*, v. 1, p. 377-384, 1985.
- LIMA-CATELANI, A.R.A. Estudo cromossômico de *Aedes aegypti* e *Aedes fluviatilis*. São José do Rio Preto, 1991. 104p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Genética). Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista.
- LIMA-CATELANI, A.R.A., BICUDO, H.E.M.C. Chromosome studies in two Brazilian populations of *Aedes aegypti*. *Cytobios*, v. 79, p. 241-251, 1994.
- LOK, C.K. Singapore's dengue haemorrhagic fever control programme: a case study on the successful control of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* using mainly enviromental measures as a port of integrated vector control. Singapore, Ministry of Health of Singapore, 1985.
- LUDWIG, M.Z., TAMARINA, N.A., RICHMOND, R.C. Localization of sequences controlling the spatial, temporal, and sex-specific expression of the esterase 6 locus in *Drosophila melanogaster* adults. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 90, p. 6233-6237, 1993.
- MACKNESS, M.I., WALKER, C.H., ROWLANDS, D.G., PRICE, N.R. Esterase activity in homogenates of three strains of the rust red flour beetle *Tribolium castaneum* (Herbst). *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 74, p. 65-68, 1983.
- MANE, S.D., TEPPER, C.S., RICHMOND, R.C. Studies of esterase 6 in *Drosophila melanogaster*. XIII: purification and characterization of the two major isozymes. *Biochem. Genet.*, v. 21, p. 1019-1039, 1983a.
- MANE, S.D., TOMPKINS, L., RICHMOND, R.C. Male esterase 6 catalyzes the synthesis of a sex pheromone in *Drosophila melanogaster* female. *Science*, v. 222, p. 419-421, 1983b.



- * MANI, G.S, COOK, L.M., MARVDASHTI, R. What can be learnt about selection from gene frequency distribution? *Genetics*, v. 114, p. 971-982, 1986.
- MARKERT, C.L., MOLLER, F. Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenetic, and species specific patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 45, p. 753-763, 1959.
- MARUYAMA, Y., YASUTOMI, K., OGITA, Z.I. Electrophoretic analysis of esterase isozymes in organophosphate-resistant mosquitoes (*Culex pipens*). *Insect Biochem.*, v. 14, p. 181-188, 1984.
- MEIKLE, D.B., SHEEHAN, K.B., PHILLIS, D.M., RICHMOND, R.C. Localization and longevity of seminal-fluid esterase 6 in mated females *Drosophila melanogaster*. *J. Insect Physiol.*, v. 36, p. 93-101, 1990.
- METSELAAR, D., GRAINGER, C.R., OEI, K.G., REYNOLDS, D.G., PUDNEY, M., LEAKE, C.J., TUKEI, P.M., D'OFFAY, R.M., SIMPSON, D.I.H. An outbreak of type 2 dengue fever in the Seychelles, probably transmitted by *Aedes albopictus* (Skuse). *Bull. W. H. O.*, v. 58, p. 937-943, 1980.
- MILLER, B.R., BALLINGER, M.E. *Aedes albopictus* mosquitoes introduced into Brazil: vector competence for yellow fever and dengue viruses. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 82, p. 476-477, 1988.
- * MILLER, S. NOVAK, R. A comparative study of esterases in two strains of Anopheline mosquitoes by isoelectric focusing. *Int. J. Biochem.*, v. 15, p. 1409-1415, 1983.
- MOGI, M., KHAMBOONRUANG, C., CHOOCHOTE, W., SUWANPANIT, P. Ovitrap surveys of dengue vector mosquitoes in Chiang Mai, northern Thailand: seasonal shifts in relative abundance of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. *Med. Vet. Entomol.*, v. 2, p. 319-324, 1988.
- MONATH, T.P. *Aedes albopictus*, an exotic mosquito vector in the United States. *Ann. Intern. Med.*, v. 105, p. 449-451, 1986.
- MONATH, T.P. Yellow fever and dengue-the interactions of virus, vector and host in the re-emergence of epidemic disease. *Virology*, v. 5, p. 133-145, 1994.
- MOORE, C.G., CLINE, B.L., RUIZ-TIBÉN, E., LEE, D., ROMNEY-JOSEPH, H., RIVERA-CORREA, E. *Aedes aegypti* in Puerto Rico: environmental determinants of larval abundance and relation to dengue virus transmission. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 27, p. 1225-1231, 1978.
- MORETTO, A., BERTALAZZI, M., LOTTI, M. The phosphorothioic acid o-o-ethyl-s-propyl-ester exarcebates organophosphate polyneuropathy without inhibition of



- neuropathy target esterase. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, v. 129, p. 133-137, 1994.
- MORGAN, E.W., YAN, B., GREENWAY, D., PETERSEN, D.R., PARKINSON, A. Purification and characterization of two rat liver microsomal carboxylesterases (hydrolase A and B). *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 315, p. 495-512, 1994.
- MORTON, R.A., SINGH, R.S. The association between malathion resistance and acetylcholinesterase in *D. melanogaster*. *Biochem. Genet.*, v. 20, p. 179, 1982.
- MOSS, D.W. *Isoenzymes*. New York: Chapman & Hall, 1982. 204p.
- ✕ MOTOYAMA, M., DAUTERMAN, W.C. The role of non-oxidative metabolism in organophosphorous resistance. *J. Agric. Food Chem.*, v. 22, p. 350-355, 1974.
- MOUCHES, C., MAGNIN, M., BERGE, J.B., SILVESTRI, M., BEYSSAT, V., PASTEUR, N., GEORGHIU, G.P. Overproduction of detoxifying esterases in organophosphate-resistant *Culex* mosquitoes and their presence in other insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 84, p. 2113-2116, 1987.
- MOUCHES, C., PASTEUR, N., BERGE, J.B., OLIVER, H., RAYMOND, M., SAINT VICENT, B.R., SILVESTRI, M., GEORGHIU, G.P. Amplification of an esterase gene is responsible for insecticide-resistance in a California *Culex* mosquito. *Science*, v. 233, p. 778-780, 1986.
- MOUCHES, C., PAUPLIN, Y., AGARWAL, M., LEMIEUX, L., HERZOG, M., ABADON, M., BEYSSAT-ARNAOUTY, V., HYRIEN, O., VICENT, R.D.S., GEORGHIU, G.P., PASTEUR, N. Characterization of amplification core and esterase B1 gene responsible for insecticide resistance in *Culex*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 87, p. 2574-2578, 1990.
- MOURYA, D.T., GOKHALE, M.D., CHAKRABORTI, S., MAHADEV, P.V.M., BANERJEE, K. Insecticide susceptibility status of certain populations of *Aedes aegypti* mosquito from rural areas of Maharashtra state. *Indian J. Med. Res. (A)*, v. 97, p. 87-91, 1993.
- MOURYA, D.T., GOKHALE, M.D., MISHRA, A.C. Biochemical basis of DDT-resistance in *Aedes aegypti* population from a dengue affected area in Shahjahanpur city. *Indian J. Med. Res.*, v. 99, p. 212-215, 1994.
- MUTERO, A., PRALAVORIO, M., BRIDE, J.M., FOURNIER, D. Resistance-associated point mutations in insecticide-insensitive acetylcholinesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 91, p. 5922-5926, 1994.



- MYERS, M., RICHMOND, R.C., OAKESHOTT, J.G. On the origins of esterases. *Mol. Biol. Evol.*, v. 5, p. 113-119, 1988.
- NORA, J.J., FRASER, F.C. Farmacogenética. In: _____. *Genética médica*. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. cap. 24, p. 263-267.
- OAKESHOTT, J.G., van PAPENRECHT, E.A., BOYCE, T.M., HEALY, M.J., RUSSELL, R.J. Evolutionary genetics of *Drosophila* esterases. *Genetica*, v. 90, p. 239-268, 1993.
- OSANAI, C.H., ROSA, A.P.A.T., TANG, A.T., AMARAL, R.S., PASSOS, A.D.C., TAUIL, P.L. Surto de dengue em Boa Vista, Roraima. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v. 25, p. 53-54, 1983. (Nota Prévia).
- PRABHAKARAN, S.K., KAMBLE, S.T. Purification and characterization of an esterase isozyme from insecticide resistant and susceptible strains of german cockroach, *Blattella germanica* (L.). *Insect Biochem. Mol. Biol.*, v. 25, p. 519-524, 1995.
- PRALAVORIO, M., FOURNIER, D. *Drosophila* acetylcholinesterase: characterization of different mutants resistant to insecticides. *Biochem. Genet.*, v. 30, p. 77-83, 1992.
- PRODY, C.A., DREYFUS, P., ZAMIR, R., ZANUT, H., SOREQ, H. De novo amplification within a "silent" human cholinesterase gene in a family subjected to prolonged exposure to organophosphorous insecticides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 86, p. 690-694, 1989.
- RAUSCHENBACH, I.Y., LUKASHINA, N.S., KOROCHKIN, L.I. Role of pupal esterase in the regulation of the hormonal status in two *D. virilis* stocks differing in response to high temperature. *Dev. Genet.*, v. 22, p. 65-80, 1984.
- RAYMOND, M., CALLAGHAM, A., FORT, P., PASTEUR, N. Worldwide migration of amplified insecticide resistance genes in mosquitoes. *Nature* (London), v. 350, p. 151-153, 1991.
- RAYMOND, M., BEYSSAT-ARNAOUTY, V., SIVASUBRAMANIAN, N., MOUCHES, C., GEORGHIOU, G.P., PASTEUR, N. Amplification of various esterase B's responsible for organophosphate resistance in *Culex* mosquitoes. *Biochem. Genet.*, v. 27, p. 417-423, 1989.
- RAYMOND, M., PASTEUR, N. The amplification of B1 esterase gene in the mosquito *Culex pipiens* is present in gametes. *Nucleic Acids Res.*, v. 17, p. 7116, 1989.



- RAYMOND, M., POULIN, E. BOIROUX, V. DUPONT, E., PASTEUR, N. Stability of insecticide resistance due to amplification of esterase genes in *Culex pipiens*. *Heredity*, v. 70, p. 301-307, 1993.
- REYES-VILLANUEVA, F. El-dengue. Bionomía del vector, transmisión y opciones para su control en México. *Ciencia*, v. 41, p. 45-55, 1990.
- RICHARDSON, R.H., SMOUSE, P.E. Patterns of molecular variation. I. Interspecific of electromorphs in the *Drosophila mulleri* complex. *Biochem. Genet.*, v. 14, p. 447-466, 1976.
- 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., SENIOR, A. Esterase 6 of *Drosophila melanogaster*: kinetics of transfer to females, decay in females and male recovery. *J. Insect Physiol.*, v. 27, p. 849-853, 1981.
- ROSEN, L., SHROYER, D.A., TESH, R.B., FREIER, J.E., LIEN, J.C. Transovarial transmission of dengue viruses by mosquitoes: *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 32, p. 1108-1119, 1983.
- ROSEN, L. Further observations on the mechanism of vertical transmission of flaviviruses by *Aedes* mosquitoes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 39, p. 123-126, 1988.
- RUIZ, L.C. Estudo do padrão de esterases em quatro populações de *Haematobia irritans*. São José do Rio Preto, 1995. 107p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Genética). Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. Universidade Estadual Paulista.
- SAUL, S.H., GUPTAVANI, P., CRAIG JR., G.B. Genetic variability at an esterase locus in *Aedes aegypti*. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, v. 69, p. 73-79, 1976.
- SEKAR, V., HAGEMAN, J.H. Specificity of the serine protease inhibitor, phenylmethylsulfonyl fluoride. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 89, p. 474-478, 1979.
- SHEEHAN, K.B., RICHMOND, R.C., COCHRANE, B.J. Studies of esterase 6 in *Drosophila melanogaster*. III. The developmental patterns and tissue distribution. *Insect Biochem.*, v. 9, p. 443-450, 1979.
- SHOWS, T.B. Isozymes. *Curr. Top. Biol. Med. Res.*, v. 2, p. 107-158, 1977.



- SLOSEK, J. *Aedes aegypti* mosquitoes in the Americas: a review of their interactions with the human population. **Soc. Sci. Med.**, v. 23, p. 249-257, 1986.
- SMYTH, K.A., RUSSELL, R.J., OAKESHOTT, J.G. A cluster of at least three esterase genes in *Lucilia cuprina* includes malathion carboxylesterase and two other esterases implicated in resistance to organophosphates. **Biochem. Genet.**, v. 32, p. 437-453, 1994.
- SOEKIMAN, S., MATSUMURA, T., YAMANISHI, H. Multiplication of Chikungunya virus in salivary glands of *Aedes albopictus* (OAHU strain) mosquitoes: an electron microscopic study. **Jpn. J. Med. Sci. Biol.**, v. 39, p. 207-211, 1986.
- SOREQ, H., SEIDMAN, S., DREYFUS, P.A., ZEWIN-SONKIN, D., ZAKUT, H. Expression and tissue-specific assembly of human butyrylcholine esterase in microinjected *Xenopus laevis* oocytes. **J. Biol. Chem.**, v. 264, p. 10608-10613, 1989.
- SPACKMAN, M.E., OAKESHOTT, J.G., SMYTH, K.A., MEDVECZKY, K.M., RUSSELL, R.J. A cluster of esterase genes on chromosome 3R of *Drosophila melanogaster* includes homologues of esterase genes conferring insecticide resistance in *Lucilia cuprina*. **Biochem. Genet.**, v. 32, p. 39-62, 1994.
- STEINER, W. W. M., JOHNSON, W. E. Techniques for electrophoresis of Hawaiian *Drosophila*. **US - IBP. Island Ecosyst. Tech. Rep.**, v. 30, p. 1-21, 1973.
- SUCAN. Superintendência de Campanhas de Saúde Pública. Ministério da Saúde. Resumo dos principais caracteres morfológicos diferenciais do *Aedes aegypti* e do *Aedes albopictus*. Brasília, 1989. 21p.
- SUDDERUDDIN, K.I., LIM, L.F. *In vitro* studies on the effects of several insecticides on non-specific esterases of *Sitophilus oryzae* (L.) and *Palembus dermestoides* (Fairm.). **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 61C, p. 407-410, 1978.
- SUSSMAN, J.L., HAREL, M., FROLOW, F., OEFNER, C., GOLDMAN, A., TOKER, L., SILMAN, I. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine - binding protein. **Science**, v. 253, p. 872-879, 1991.
- TABACHNICK, W.J., POWELL, J.R. A world-wide survey of genetic variation in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. **Genet. Res.**, v. 34, p. 215-229, 1979.
- TADANO, T. Genetic studies on two carboxylesterase loci in *Aedes albopictus*. **J. Am. Mosq. Control Assoc.**, v. 3, p. 137-141, 1987.
- TAUIL, P.L. Carta ao Editor. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 20, p. 133, 1987.

- TAUIL, P.L. O problema do *Aedes aegypti* no Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 19, p. 1-3, 1986.
- TOWNSON, H. Esterase isozymes of individual *Aedes aegypti*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, v. 63, p. 413-418, 1969.
- TOWNSON, H. Esterase polymorphism in *Aedes aegypti*: the genetics and Km values of electrophoretically heterogeneous forms. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, v. 66, p. 255-266, 1972.
- TREBATOSKI, A.M., CRAIG, G.B. Genetics of an esterase in *Aedes aegypti*. *Biochem. Genet.*, v. 3, p. 383-392, 1969.
- TREBATOSKI, A.M., HAYNES, J.F. Comparison of enzymes of twelve species of mosquitoes. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, v. 62, p. 327-335, 1969.
- TURELL, M.J., BEAMAN, J. R., TAMMARIELLO, R.F. Susceptibility of selected strains of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) to Chikungunya Virus. *J. Med. Entomol.*, v. 29, p. 49-53, 1992.
- VANDERLEY, D.M.V., GUTIERREZ, E.B., ANDRADE, J.C.R., SOUZA, L.T.M., TENORIO, R.M.P., MELAMED, E., KATZ, G., CORTÁS, M.C., SILVA, M.V, MOURA, L.C. Manual de vigilância epidemiológica: dengue. São Paulo: Secretaria de Estado da Saúde, 1987. 23p.
- VASCONCELOS, P.F.C., ROSA, E.S.T., ROSA, J. F.S.T., FREITAS, R.B., DÉGALLIER, N., RODRIGUES, S.G., ROSA, A. P. A. T. Epidemia de febre clássica de dengue causada pelo sorotipo 2 em Araguaína, Tocantins, Brasil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v. 35, p. 141-148, 1993.
- WALLIS, G.P., TABACHNICK, W.J., POWELL, J.R. Genetic heterogeneity among Caribbean populations of *Aedes aegypti*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 33, p. 492-498, 1984.
- WESSON, D.M. Susceptibility to organophosphate insecticides in larval *Aedes albopictus*. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, v. 6, p. 258-264, 1990.
- WHITT, G.S. Genetic, developmental and evolutionary aspects of the lactate dehydrogenase isozyme system. *Cell Biochem. Funct.*, v. 2, p. 134-139, 1984.
- WHITTAKER, M. Cholinesterases. In: BERGMAYER, H. U. (Ed.) *Methods of enzymatic analysis*. 3.ed. Weinheim: Chemie, 1984. v. 4, p. 52-74.
- WHYARD, S., DOWNE, A.E.R., WALKER, V.K. Isolation of an esterase conferring insecticide resistance in the mosquito *Culex tarsalis*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, v. 24, p. 819-827, 1994.



YONG, H.S., CHAN, K.L., DHALIWAL, S.S., CHEONG, W.H., CHIANG, G.L., MAK, J.W. Genetics of glucose phosphate isomerase and phosphoglucomutase in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Theor. Appl. Genet.*, v. 59, p. 345-348, 1981.

ZHU, Y.K., CLARK, J.M. Purification and characterization of acetylcholinesterase from the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, v. 24, n. 5, p. 453-461, 1994.



