

Fádua Rosana Coelho Rits

Padrão de Esterases em *Megaselia Scalaris*



1910000774



Fádua Rosana Coelho Rits

PADRÃO DE ESTERASES EM *Megaselia scalaris*

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.



774/98

São José do Rio Preto
São Paulo
1997

3

Orientador: Prof. Dr. Carlos Roberto Ceron



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



***“Não existe um problema que não ofereça uma
dádiva para você.***

***Você procura os problemas porque precisa das
dádivas por eles oferecidas.”***

Richard Bach



Ao Alex e ao Bruno, por tudo que representam para mim,



AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho só foi possível graças à colaboração direta ou indireta de muitas pessoas. Manifestamos nossa gratidão a todas elas e de forma particular:

ao Prof. Dr. **Carlos Roberto Ceron**, pela dedicação profissional, pela orientação e avaliação criteriosa de cada etapa deste trabalho,

aos Profs. **Ana Maria Bonetti**, **Hermione Elly Melara de Campos Bicudo**, **Muracy Bello** e **Rubens Monti**, 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 Reitoria e Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, em especial a coordenação do PICD/FUEL e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro,

à Direção das Faculdades Integradas Riopretense - FIRP e à Direção da Fundação Educacional de Votuporanga, pelo incentivo e disposição das condições materiais,

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

aos funcionários do Departamento de Química e Geociências, **João Rodrigues dos Santos** e **Jorge Freytag Buchid**, pelo auxílio técnico-laboratorial, **Rita Beatriz de Seixas Mazzonato** pela disposição, em especial a **Eliani Nobuco Ikeguchi Ohira** pela colaboração e incentivos constantes,

aos funcionários do Departamento de Biologia **Laura N. A. Pinheiro**, **Simone C. Fernandes**, **Olga B. Pelicer**, **Sebastião Dias Barbosa**, **Paulo A. Mazieiro**, pela amizade apoio e colaboração nestes anos de convívio,

às bibliotecárias, pela presteza no serviço de comutação bibliográfica,

aos funcionários da Seção de Pós-graduação, pela gentileza e atenção quando solicitados,

às funcionárias do Núcleo Central de Informática das Faculdades Integradas Riopretense, especialmente a **Valéria Ap. R. Ravazi** e **Simone Cristina Rodrigues** pela gentileza e cuidado na impressão deste trabalho,

a Prof. Dra. **Sirlei Branco** e **Eliana Rosa de Palma Fernandez**, pela amizade, estímulos e sugestões sempre pertinentes,

à Sra. **Soraia Fernandes Rodrigues Soares**, pelo capricho na confecção dos esquemas,

ao Prof. **Marcelo Ferreira Lourenço**, pela amizade, apoio e ajuda na análise estatística e confecção dos gráficos,

a todos os amigos do curso de Pós-Graduação, pela amizade e ótimo convívio,

às amigas e companheiras de Pós-graduação Prof. Dra. **Alba R. de Abreu Lima-Catelani**, Prof. Dra. **Ana Maria Alves de Oliveira** e Prof. **Ana Silvía Lapenta** pelas alegrias, conselhos, apoio, incentivos e carinho,

aos meus pais **Luís** e **Nair** pelo amor e educação,

ao **Alex**, pela paciência, pelo amor e apoio em todos os momentos,

ao **Bruno**, que consegue dizer tudo em um sorriso,

Enfim ao Pai por tudo.

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO	01
II. MATERIAL E MÉTODOS	
II.1 - Linhagens	31
II.2 - Obtenção das Amostras	
II.2.1 - Adultos.	31
II.2.2 - Larvas, pupas e casulos.....	32
II.3 - Tempo de Desenvolvimento.....	33
II.4 - Cruzamentos	
II.4.1 - Cruzamentos em massa	35
II.4.2 - Cruzamentos por casal.....	35
II.5 - Análise Eletroforética	
II.5.1 - Preparo dos géis	35
II.5.2 - Preparo das amostras e condições da eletroforese.....	37
II.6 - Tratamento dos géis para identificação das esterases.....	37
II.7 - Teste com inibidores	38
II.8 - Secagem dos géis.....	38
II.9 - Dosagem de proteínas.....	39
II.10 - Análise estatística.....	39

III. RESULTADOS

III.1 - Dados sobre a biologia de <i>Megaselia scalaris</i>	40
III.2 - Padrão de esterases nos adultos	44
III.3 - Estudo comparativo do padrão de esterases no desenvolvimento.....	70
III.4 - Esterases nos casulos vazios	74
III.5 - Padrão de esterases em cruzamentos por casal	80
IV - DISCUSSÃO.....	91
V - RESUMO E CONCLUSÕES	107
VI - SUMMARY AND CONCLUSIONS	109
VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	111

I. INTRODUÇÃO

É impossível identificar, pela genética clássica, se um gene existe e, muito menos, estudar suas propriedades, a menos que alelos alternativos naquele loco possam ser indentificados fenotipicamente. A maioria dos locos gênicos codificam proteínas ou enzimas. Assim, o estudo dessas macromoléculas possibilita identificar, do total presente em uma amostra tomada ao acaso, qual fração é geneticamente variável, estimando-se a frequência de locos polimórficos.

Polimorfismo pode ser definido como a ocorrência simultânea de formas fenotípicas múltiplas de uma característica, dentro ou entre populações, atribuída a alelos diferentes de um único gene ou a homólogos de um único cromossomo (Suzuki *et al.*, 1981 apud Acquaah, 1992).

O estudo para se distinguir os polimorfismos de proteínas e enzimas, dependeu do desenvolvimento de meios para a separação e caracterização de moléculas de proteínas ou enzimas, similares entre si. Um dos primeiros estudos sobre o polimorfismo protéico e enzimático, em dípteros, foi realizado por Hubby & Lewontin (1966) e Lewontin & Hubby (1966) que estimaram em 30% a proporção de locos polimórficos em populações naturais de *Drosophila pseudoobscura*, utilizando a separação por eletroforese em gel. Esta é a técnica mais comum para se distinguir diferentes formas de uma isoenzima. Os extratos a serem analisados são colocados em um gel poroso, através do qual um potencial elétrico é aplicado. Se a composição de aminoácidos de uma enzima varia e, se as variantes possuem cargas elétricas diferentes, as enzimas irão diferir em carga líquida e se moverão em velocidades diferentes, separando-se no gel. Suas posições podem ser visualizadas por colorações 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. Diferentes genótipos são, assim, identificados pelas variações de posição das bandas enzimáticas no gel.

Nos últimos 30 anos, a variabilidade genética, observada ao nível das enzimas, tem sido amplamente investigada em uma infinidade de organismos. Markert e Moller (1959) foram os primeiros a introduzir a palavra isoenzima (ou isozima) para descrever o fenômeno da existência de formas moleculares múltiplas de uma mesma enzima, sem enfatizar, entretanto, as causas genéticas deste fenômeno.

Posteriormente, quando se reconheceu a natureza dessas formas alternativas, tornou-se possível definir isoenzimas em termos de sua origem genética. Assim, de acordo com as recomendações da Comissão de Nomenclatura Bioquímica da International Union of Pure and Applied Chemistry and International



Union of Biochemistry, IUPAC-IUB, 1977, isoenzimas são definidas como "formas moleculares múltiplas de uma enzima que ocorrem dentro de uma única espécie como resultado da presença de mais de um gene estrutural". Essa multiplicidade genética pode ser devida à presença de locos gênicos múltiplos ou alelos múltiplos. Também estão incluídas nesta definição genética de isoenzimas, as formas múltiplas de uma enzima que se originam por associação de subunidades protéicas que são, elas próprias, produtos de genes estruturais distintos. Essas formas isoenzimáticas são denominadas de heteropolímeros ou isoenzimas híbridas.

Podemos citar como exemplos de isoenzimas determinadas por locos gênicos múltiplos, as diferentes formas da aspartato aminotransferase e da malato desidrogenase, que possuem localização intracelular citoplasmática ou mitocondrial e que são codificadas por genes estruturais diferentes. Essas isoenzimas, também chamadas de isoenzimas verdadeiras, geralmente apresentam diferenças maiores nas suas propriedades bioquímicas e físico-químicas se comparadas às variantes enzimáticas derivadas de um mesmo loco (Hopkinson, 1974). Possíveis explicações evolutivas para o surgimento desse tipo de isoenzima baseiam-se na duplicação gênica, seguida por mutações independentes nos locos separados, ou de genes originalmente distintos que convergiram através de mutações sucessivas, resultando em enzimas com funções catalíticas semelhantes (Moss, 1982).

Um exemplo clássico de isoenzimas derivadas de alelos múltiplos é o das variantes alélicas (aleloenzimas) da glicose-6-fosfato desidrogenase (G-6-PD), uma enzima que atua no metabolismo da glicose nos eritrócitos. Os estudos genéticos e bioquímicos da G-6-PD, em hemolisados humanos, permitiram reconhecer cerca de 200 variantes genéticas dessa enzima. Em geral, para isoenzimas originadas dessa forma, os alelos são codominantes, sendo que um não domina ou mascara o produto do outro, com o qual está pareado. Assim, enquanto nos indivíduos homozigotos aparece o produto gênico característico de um alelo, nos heterozigotos aparecem os produtos de quantos alelos distintos existirem para este loco.

As isoenzimas originárias da associação de subunidades protéicas, também denominadas de heteropolímeros ou isoenzimas híbridas, consistem de duas ou mais cadeias polipeptídicas unidas por ligações não covalentes. Geneticamente, essas isoenzimas correspondem às formas poliméricas híbridas, formadas pela associação de cadeias polipeptídicas diferentes e codificadas por genes distintos. Há duas possibilidades para o aparecimento desses heteropolímeros: são formados nos indivíduos heterozigotos para um determinado loco que seja responsável pela síntese de uma enzima oligomérica, ou pela união de cadeias polipeptídicas diferentes, originadas de genes estruturais não alélicos.



Podemos citar como exemplo clássico de formação dos heteropolímeros, as formas intermediárias da lactato desidrogenases (LDH). No homem e outras espécies de mamíferos até hoje estudadas, esta enzima é um tetrâmero, codificada por dois genes estruturais distintos, localizados em cromossomos diferentes. No homem, por exemplo, o loco LdhA (ou M= muscle) está localizado no cromossomo 11 e o LdhB (ou H= Heart) no cromossomo 12. Em alguns tecidos, como o fígado ou músculos esqueléticos, o loco LdhA é expresso predominantemente, levando principalmente à produção da forma isoenzimática A₄ (ou M₄) da LDH. Em outros tecidos, como o músculo cardíaco, a expressão diferencial é do loco LdhB o que leva à formação da isoenzima B₄ (ou H₄). Essas são as formas homopoliméricas da LDH. Entretanto, em tecidos como pulmões, baço, rins, etc, os dois locos expressam-se em taxas equivalentes, levando à formação, além das formas homoméricas já citadas, de outras formas isoenzimáticas, respectivamente designadas A₃B, A₂B₂ e AB₃, que correspondem aos heteropolímeros.

→ Como já salientado, os heteropolímeros também podem se originar em indivíduos heterozigotos para um determinado loco que codifique a síntese de uma enzima oligomérica. Podemos citar como exemplo desse tipo de isoenzima, a forma intermediária da esterase-8 em *Drosophila mulleri* (EST-8 SF) observada nas moscas heterozigotas, que corresponde ao dímero formado pela associação de subunidades codificadas pelos alelos EST-8^S e EST-8^F (Ceron, 1988).

O surgimento de "formas moleculares múltiplas das enzimas", também pode ser resultante de modificações pós-traducionais dessas macromoléculas. Incluem-se neste caso as alterações que as enzimas podem sofrer após sua síntese, como a ligação covalente de algum grupo (ex: glicosilação, fosforilação, acetilação), a formação de agregados poliméricos ou ainda a modificação, por proteólise, dos precursores inativos das enzimas (zimogênios). Essas modificações não envolvem uma origem genética e, formalmente, não estão incluídas no conceito inicial de isoenzimas. As formas múltiplas das enzimas, originadas dessas modificações epigenéticas, foram denominadas de isoenzimas secundárias (Harris, 1969).

◦ Entre as enzimas altamente variáveis, incluem-se as esterases (hidrolases de ésteres carboxílicos - EC 3.1.1.1) que representam um grupo heterogêneo de enzimas amplamente distribuídas entre os seres vivos. Estas enzimas hidrolisam preferencialmente ésteres de ácidos carboxílicos. Entretanto, podem atuar sobre outros substratos, como por exemplo, peptídeos e amidas (Walker & Mackness, 1983). Por essa razão, embora a especificidade aos



substratos possa ser limitada *in vivo*, as esterases são capazes de hidrolisar outros substratos *in vitro*, sendo por isso chamadas de esterases não específicas.

① → As esterases têm sido caracterizadas e purificadas em uma grande variedade de organismos. Podemos citar, como exemplos, os trabalhos de Brisabois & Goulett (1993) e Sekar & Hageman (1979) com bactérias, Lee *et al.* (1987) com leveduras, Leibel (1988) com peixes, Higa *et al.* (1989) e Tsuita *et al.* (1988) com ratos, Deimiling & Taylor (1987) e Deimiling & Wassmer (1991) com camundongo, Lith *et al.* (1989) com coelho, Arav & Rimon (1987) com touro, Bradley *et al.* (1994) com porquinho-da-Guiné, além de muitos outros. A variedade de substratos e o fato de que nos experimentos para a detecção dessas enzimas utilizam-se, via de regra, substratos sintéticos, têm limitado o conhecimento do real papel fisiológico desempenhado pela grande maioria das esterases.

② → Estudos sobre a genética, bioquímica e estrutura molecular têm contribuído para estabelecer a caracterização das esterases. Aldrige (1953) classificou essas enzimas em dois grupos, as A-esterases (esterases aromáticas ou arilesterases, E. C. 3.1.1.2) e as B-esterases (esterases alifáticas ou aliesterases). O autor baseou-se na atividade dessas enzimas na presença do organofosforado E 600 (dietil-p-nitrofenil-fosfato ou paraoxon). Segundo ele, as A-esterases hidrolisam preferencialmente os ésteres aromáticos, por exemplo o fenil acetato, não são inibidas por organofosforados, podendo até hidrolisá-los e estão presentes no plasma de vários mamíferos. As B-esterases são inibidas pelos organofosforados e apresentam um resíduo de serina em seus centros ativos, como salientado por Junge (1984). As B-esterases podem ainda ser subdivididas em carboxilesterases e colinesterases com base na inibição destas últimas por sulfato de eserina.

③ → Uma classificação posterior, também baseada no comportamento das esterases em relação a diferentes inibidores e à especificidade aos substratos, dividiu-as em quatro grupos: carboxilesterases, arilesterases, colinesterases e acetilesterases (Heymann, 1980, apud Healy *et al.* 1991).

④ → As carboxilesterases (EC 3.1.1.1) são inibidas por organofosforados, mas não pelo sulfato de eserina. Estas enzimas são amplamente distribuídas na natureza. Atuam catalisando a hidrólise de ésteres de ácidos carboxílicos em ácido e álcool livres. Hidrolisam preferencialmente ésteres aromáticos de cadeia curta (de 3 a 6 carbonos), mas, também agem sobre amidas aromáticas, ésteres aromáticos e tioésteres. Existem muitos estudos sobre esta classe enzimática. As carboxilesterases melhor conhecidas são as que ocorrem no fígado de mamíferos, inclusive do homem (Huang *et al.*, 1994, Morgan *et al.*, 1994). Essas enzimas apresentam uma estrutura trimérica incomum com três subunidades iguais de 60 kd (kilodaltons), possuindo cada subunidade, um centro ativo. (Deimiling *et al.*, 1984)



Seu papel fisiológico ainda é incerto, Heymann, (1980 op. cit) e Junge (1984) atribuíram a esta classe, a função de auxiliar no sistema de desintoxicação do organismo, participando do metabolismo de ésteres ou amidas.

⑤ -> As arilesterases (EC 3.1.1.2) são enzimas inibidas por reagentes sulfidrílicos e cátions metálicos bivalentes, como mercúrio e chumbo. Localizam-se principalmente no plasma de mamíferos, mas seu papel fisiológico é desconhecido. Presume-se que sejam produzidas no fígado devido à sua baixa atividade em pacientes com cirrose ou cachexia. Existem poucas informações a respeito das propriedades moleculares das arilesterases. O peso molecular da enzima humana foi estimado em 240Kd. Sua purificação mostrou que está associada com partículas lipoproteicas de alta densidade do soro, sugerindo que estas enzimas estejam provavelmente envolvidas no metabolismo de lipídios.

⑥ -> As colinesterases são inibidas por organofosforados e pelo sulfato de eserina. Esta última característica permite a separação entre as carboxilesterases e colinesterases. As colinesterases podem ser separadas em acetilcolinesterases (EC 3.1.1.7), encontradas na maioria dos invertebrados e vertebrados, com função controladora da corrente iônica e as pseudocolinesterases (EC 3.1.1.8), encontradas nos vertebrados, algumas plantas e microorganismos.

A acetilcolinesterase (AChE - EC 3.1.1.7) participa da transmissão do impulso nervoso, catalisando a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina. Nos insetos, nos quais o sistema colinérgico é essencial, essa enzima apresenta uma importante função, o que estimulou o uso de inibidores da acetilcolinesterase como inseticidas. Os inibidores mais comuns, os organofosforados e os carbamatos, ligam-se covalentemente ao sítio ativo da enzima e causam a morte do inseto. Os inseticidas organofosforados, por exemplo, atuam ligando-se ao sítio catalítico da acetilcolinesterase, impedindo que esta promova a hidrólise da acetilcolina. O acúmulo deste neurotransmissor na sinapse nervosa interrompe a condução do impulso e o inseto morre com espasmos musculares. Em *Drosophila*, estudos genéticos e moleculares têm mostrado que a acetilcolinesterase é específica do sistema nervoso central e é codificada por um único loco, denominado *Ace*. A acetilcolinesterase (AChE), em *Drosophila* e outros insetos, é composta de uma única forma molecular representada por um dímero glicosilado ligado à membrana por um glicolípido âncora (Fournier *et al.* 1993).

Pseudocolinesterases apresentam atividade significativa na massa cinzenta do cérebro, fígado e músculos. No homem, uma pseudocolinesterase (colinesterase sérica) está relacionada à degradação do anestésico succinilcolina. Deficiência desta enzima impede sua degradação, causando apnéia e paralisia do músculo estriado (Nora & Fraser, 1991).



As acetilesterases (EC 3.1.1.6) não são inibidas por nenhum dos agentes acima citados e atuam sobre substratos alifáticos derivados do ácido acético.

Em insetos, vários estudos relacionados aos aspectos fisiológicos, bioquímicos e moleculares das esterases têm mostrado que estas enzimas estão envolvidas em atividades fisiológicas importantes, englobando a regulação dos níveis de hormônio juvenil (Kort & Granger, 1981; Jones *et al.*, 1981, 1982, 1986 e 1994; Hanzilik & Hammock, 1988; Rauschenbach *et al.*, 1994), a degradação de inseticidas (Motoyama & Dauterman, 1974; Kao *et al.*, 1984, 1985; Mouchés *et al.*, 1986, 1987; Callaghan *et al.*, 1993), processos digestivos (Kapin & Ahmad, 1980; Jones & Brancott, 1986; Timmermans *et al.*, 1994 e Argentine & James, 1995) e reconhecimento de feromônios (Vogt & Riddiford, 1981). Outra função relacionada às esterases nos insetos refere-se ao comportamento reprodutivo, em *Drosophila* (Johnson *et al.*, 1968; Carrasco *et al.*, 1984; Mane *et al.*, 1983; Scott, 1986; Karotam & Oakeshott, 1993).

Os níveis do hormônio juvenil, nos insetos, são regulados pela existência de dois sistemas dinâmicos que controlam sua biossíntese e degradação. A regulação desses níveis é alcançada pelo balanço entre esses processos, embora outros mecanismos, tais como seqüestro e excreção, possam também contribuir. Uma oxidase dependente de NADPH foi descrita por Yu & Terriere (1978) em *Musca domestica* como responsável pela degradação desse hormônio. No entanto, os dois caminhos principais de degradação do JH são a hidrólise do seu grupo metil-éster ou do grupo epóxido, realizados respectivamente por esterases do hormônio juvenil (JHE) ou pela epóxido hidrolase do hormônio juvenil (JHEH).

O hormônio juvenil (JH), sintetizado pela corpora allata a partir de unidades de acetil-coenzima A, desempenha funções importantes na regulação do desenvolvimento dos insetos, tanto nos estágios larvais quanto na fase adulta. Sua função reguladora do desenvolvimento fica melhor caracterizada na transição larva-pupa através da interação com a ecdisona. De acordo com Coundron *et al.* (1981), a degradação do hormônio juvenil, nesta fase, permite a liberação do hormônio protoracicotrópico pelo cérebro, que estimula a produção de ecdisona pela glândula protorácica, dando início à metamorfose. No entanto, o hormônio juvenil está envolvido em vários outros processos como a regulação da produção de ovos (Shapiro *et al.*, 1986 em *Aedes*; Bownes, 1989 em *Drosophila*), desenvolvimento de órgãos gonadotróficos em ambos os sexos (Yamamoto *et al.*, 1988 em *Drosophila*), determinação de casta (Rachinsky & Hartfelder, 1990 em *Apis mellifera*) e diapausa (Denlinger & Tanaka, 1989 em varejeiras; Zera & Teibel, 1989 em *Gryllus rubens*).



O comportamento deste hormônio tem sido exaustivamente estudado em várias espécies de lepidópteros, sendo que, nestes insetos, está envolvido em diferentes etapas do desenvolvimento como embriogênese, crescimento larval, metamorfose e vitelogênese. Muitas variações foram observadas para organismos diferentes em relação aos níveis do hormônio juvenil em ovos recém-colocados. Estudos realizados por Riddiford & Williams (1967) e Riddiford (1970) com *Hyalophora cecropia* e *Antheraea pernyi* evidenciaram que a presença do hormônio juvenil nas primeiras fases do desenvolvimento embrionário não permite o desenvolvimento normal do embrião, bloqueado logo após a formação do folheto germinativo. Alguns autores sugerem a existência de transferências passivas do hormônio juvenil da mãe para o ovo. Este hormônio deve ser então degradado nos primeiros estágios embrionários e novamente produzido pela corpora allata do embrião em estágios posteriores, sendo sua presença muito importante para o desenvolvimento normal da larva.

A função desempenhada pela JHE na metamorfose dos insetos tem sido demonstrada por dois efeitos morfológicos consideráveis. Primeiro, quando a JHE é inibida, títulos elevados de JH mantêm a larva em constante alimentação, resultando em larvas gigantes (Sparcks & Hammock, 1980 apud Touhara, 1995). Segundo, uma injeção de JHE mostrou um efeito anti-JH, resultando num bloqueio dose-dependente e diminuição do período de alimentação em larvas jovens devido aos baixos títulos de JH (Hammock *et al.*, 1990; Philpott & Hammock, 1990 apud Touhara *et al.*, 1995).

Conforme Roe *et al.* (1993), em lepidópteros, a primeira via de catabolismo do JH na hemolinfa é a hidrólise do grupo metil-éster do hormônio para produzir seu derivado ácido. Em outros tecidos, ocorre ainda a hidratação do grupo epóxido localizado entre os carbonos 10 e 11 do JH, produzindo o diol correspondente. Para o autor, nesses insetos, a hidrólise do éster tem maior importância na degradação do hormônio, sendo o corpo gorduroso a fonte de produção da JHE.

Na verdade, há duas classes de esterases capazes de hidrolisar o hormônio juvenil. As carboxilesterases inespecíficas, presentes na hemolinfa e tecidos de larvas e adultos, apresentam baixa afinidade pelas moléculas do hormônio ligado às proteínas, mas são capazes de hidrolisá-lo, em solução. Essas enzimas são inativadas pelo diisopropilfluorofosfato (DFP). A segunda classe é composta pelas esterases específicas para o hormônio juvenil (JHE), que aparecem na hemolinfa no último estágio larval, e são capazes de hidrolisar o JH livre ou conjugado a proteínas. Estas enzimas não apresentam atividade frente ao naftil acetato, são insensíveis ao DFP e inibidas pelo Triton X-100, um detergente não



iônico (MacCaleb *et al.*, 1980; Kort & Granger, 1981; Coundron *et al.*, 1981; Roe *et al.*, 1983; Rotin & Tobe, 1983).

A degradação do hormônio juvenil foi muito bem estudada na hemolinfa de estágios larvais finais de lepidópteros, na qual sua degradação ocorre via esterase do hormônio juvenil. Esses estudos contribuíram para o entendimento de como se inicia a metamorfose nestes organismos. A ocorrência de dois picos de produção da JHE coincidem com o decréscimo dos títulos de JH. Assim, num estudo comparativo entre onze espécies de lepidópteros, foi observado que todas as espécies apresentaram um pico de atividade da JHE, aproximadamente ao tempo em que as larvas paravam de se alimentar e se preparavam para entrar em pupação. Um segundo pico também foi observado durante a fase de pré-pupa tardia na maioria da espécies (Jones *et al.*, 1982).

Jones *et al.* (1986) demonstraram por meio de focalização isoelétrica, a ocorrência de dois picos maiores de atividade da JHE (p.I 5,3 e 5,5), apesar da presença do mais ácido ter sido anteriormente especulada como sendo um artefato ou produto de degradação e, ainda, duas outras isoformas com picos menores de atividade (p.I 5,1 e 5,6). As duas isoformas principais de *Trichoplusia ni* (p.I 5,5 e 5,3) foram chamadas de JHE-A e JHE-B, respectivamente. Estas enzimas são encontradas principalmente como glicoproteínas, no corpo gorduroso, local onde são sintetizadas. Em um trabalho posterior, Jones *et al.* (1993) caracterizaram as duas isoformas principais de JHE de *Trichoplusia ni*. Este estudo identificou pequenas regiões das proteínas as quais possuem sequências potencialmente diferentes ou modificações pós traducionais. Foi determinada a localização de um resíduo de asparagina glicosilada, como também de uma região contendo um epitopo, provavelmente composto por uma sequência linear de resíduos de aminoácidos. Além destas, também foi identificada uma região N-terminal variante entre as duas isoformas.

Venkatesh & Roe (1988, 1989) demonstraram a existência de dois fatores envolvidos na regulação da atividade da JHE na hemolinfa e outros tecidos de *M. sexta* e *T. ni*. O primeiro seria a própria produção do JH e o segundo, um fator inibidor produzido pelo cérebro do inseto. No modelo em questão, o JH, na ausência do fator inibidor do cérebro, induz a biossíntese de JHE pelo corpo gorduroso, que por sua vez, contribui com a JHE para o plasma nos períodos de pré-pupa inicial e tardia. Da mesma forma, durante o período de pupa, a indução da biossíntese da JHE pelo JH é inibida pelo fator inibidor. Em um experimento utilizando-se abdômens isolados, os tecidos dos insetos tornaram-se responsáveis pela produção de JHE, induzida por JH, em períodos do desenvolvimento onde deveriam ser insensíveis à ação do JH. Em *M. sexta* o fator inibidor cerebral atuou



de maneira específica quando um macerado de quatro cérebros foi injetado em larvas, inibindo completamente o pico de atividade da JHE no estágio de pré-pupa inicial. Os experimentos também mostraram que, o JH induziu aumento da JHE na hemolinfa e em outros tecidos, podendo sua ação ser inibida pelo extrato cerebral mesmo em abdômens isolados.

Hayakawa (1992) sugeriu que o fator inibidor do cérebro pode estar relacionado a um peptídeo bloqueador do crescimento (GBP), afirmando que muitas funções dos neuropeptídeos dos insetos ocorrem via hemolinfa, após serem liberados pelo tecido nervoso. O autor demonstrou que o GBP ocorre naturalmente no penúltimo estágio larval de *Pseudaletia separata* (Lepidóptera) e está, aparentemente, junto com o JH, coordenando a regulação de características juvenis.

Touhara *et al.* (1994) estudaram o perfil de desenvolvimento de uma epóxido hidrolase do hormônio juvenil (JHEH), ligada à membrana, e de uma proteína de ligação do hormônio juvenil (JHBP), presente nos ovários de fêmeas adultas e ovos de *Manduca sexta*. Os dados obtidos revelaram a ausência da JHBP em pupas e uma ocorrência significativamente alta em adultos. Entretanto, na hemolinfa a JHBP esteve presente durante os estádios de pupa e adulto. A análise feita por Touhara & Prestwich (1994) sugere que o JH foi protegido da JHEH pela JHBP, que forma um complexo com o JH, denominado JH-JHBP. Em contraste, o derivado ácido do JH se liga pouco à JHBP e é, então, eficientemente metabolizado pela JHEH a diol-ácido do JH.

Touhara *et al.* (1995) fizeram uso de um modelo *in vitro* para estudar a relação existente entre a proteína de ligação do JH (JHBP) e a degradação do JH em estágios críticos do desenvolvimento de lepidópteros. Neste estudo, foram utilizados homogenados recombinantes da JHBP (rJHBP) e da JHE (rJHE) obtidas de células de inseto infectadas por baculovírus. O experimento teve por objetivo investigar os mecanismos pelos quais a JHBP influencia a degradação do JH durante o último estágio larval. Os resultados obtidos sugerem que a JHBP protege o JH de processos hidrolíticos não específicos, permitindo a hidrólise do JH pela JHE, enzima altamente específica e que reconhece o complexo JH-JHBP. A JHBP foi considerada essencial na manutenção e distribuição do JH na hemolinfa na ausência da JHE, mas auxilia sua degradação, liberando rapidamente o JH na presença da JHE.

Foi detectado na hemolinfa do gafanhoto, *Locusta migratoria*, um homólogo do hormônio juvenil, denominado hormônio juvenil III (JH III), o qual apresenta-se geralmente ligado a uma proteína de ligação (BP). A função da BP seria a de transportar o JH III do local de síntese até os tecidos específicos onde vai agir. Além desta, a proteção do hormônio contra a degradação por esterases não



específicas, presentes na hemolinfa, seria uma outra função muito importante desta proteína (Debernard & Couillaud, 1994).

Hoffmann *et al.* (1994) utilizaram um método *in vitro* para investigar a degradação do JH III no plasma de adultos machos e fêmeas, de grilos da espécie *Gryllus bimaculatus*. A rota primária do metabolismo do JH III, na hemolinfa desses insetos, é a hidrólise éster do JH III pela esterase do JH III. Os resultados obtidos por Hoffmann *et al.* (1994) evidenciaram claramente a presença de enzimas esterásicas na degradação do JH III, na hemolinfa de adultos de *G. bimaculatus*. Mostraram, também, que a atividade dessas enzimas é baixa em indivíduos que sofreram ecdise recentemente e aumenta e sofre variações cíclicas ao longo da vida adulta. Hoffmann e seus colaboradores concluíram que as alterações cíclicas do JH III na hemolinfa de adultos estariam controladas, assim como o JH em outros insetos, por dois sistemas dinâmicos, de síntese, pela corpora allata, e de degradação, efetuada por enzimas esterásicas. Não se tem conhecimento sobre os mecanismos de controle da atividade da JHE III em grilos adultos, os quais poderiam envolver enzimas de ligação (BP) que estariam modulando os títulos do JH III. Entretanto, novas informações devem ser adicionadas a este modelo, requerendo outros estudos nesta área.

Informações obtidas da análise do comportamento da JHE, em dípteros, sugerem algumas diferenças nas propriedades físicas e no modelo de expressão, quando comparadas às informações obtidas para lepidópteros. As JHEs de várias espécies de dípteros não se adaptam ao padrão comum de sensibilidade aos inibidores da JHE, encontrada em outros insetos. Além disso, nos lepidópteros a JHE é observada em níveis altos na hemolinfa, enquanto em dípteros, esta enzima parece estar ausente neste fluído (Wilson & Gilbert, 1978; Klages & Emmerich, 1979).

Os experimentos realizados por Campbell *et al.* (1992) demonstraram a existência das duas enzimas envolvidas na degradação do JH, a esterase do hormônio juvenil (JHE) e a epóxido hidrolase do hormônio juvenil (JHEH) em *Drosophila melanogaster*. A atividade hidrolítica da JHE, nesta espécie, está inversamente correlacionada aos títulos do JH e assemelha-se ao perfil observado em lepidópteros. Foram observados, nesta espécie, dois picos de maior atividade da JHE nos períodos de pré-pupa inicial e final. No entanto, a atividade de degradação do hormônio juvenil, encontrada em larvas e adultos, é predominantemente mitocondrial e microssomal, enquanto que a atividade da JHE presente nas pupas é predominantemente solúvel na hemolinfa.

Em *Drosophila virilis*, a atividade da JHE foi observada no fim do estágio larval, porém, uma alta atividade também foi registrada em pupas



(Rauschenbach *et al.*, 1991). Muitos autores têm correlacionado a capacidade de hidrólise do JH às enzimas anodais presentes em várias espécies de dípteros, incluindo *D. melanogaster* e *D. virilis*. Campbell *et al.* (1992) demonstraram que esta correlação não é verdadeira. Apesar da EST-20 de *D. melanogaster* apresentar propriedades semelhantes à p-esterase de *D. virilis*, ela não possui propriedade hidrolítica para o JH.

Nos grilos da espécie *Gryllus rubens*, ordem Ortóptera, a variação da JHE durante o último estágio, pode desempenhar um papel específico no desenvolvimento de fenótipos diferentes de comprimento de asa. Conforme Zera & Tiebel (1988, 1989), o último estágio do desenvolvimento larval é um período sensível ao hormônio juvenil para a determinação da forma da asa. Para esta espécie existem dois fenótipos de asas, a forma com asas longas (LW), apresenta desenvolvimento completo das asas, músculos funcionais para o voo e capacidade de voar. A outra forma, SW, tem asas reduzidas, músculos rudimentares para voo, não possuindo capacidade para voar, mas é substancialmente mais fértil do que a forma LW. Para os dois fenótipos apresentados, a baixa atividade da JHE durante o último estágio larval é fortemente correlacionada com a formação subsequente de adultos com asa curta. Portanto, nas formas de asa curta SW, a menor degradação do hormônio juvenil pode estar envolvida diretamente com bloqueios parciais do efeito metamórfico da ecdisona no desenvolvimento da asa.

Os resultados obtidos por Zera & Holtmeier (1992) sugeriram que existe uma correspondência entre a atividade da JHE na hemolinfa, a degradação do JH, *in vivo*, e a forma da asa desses insetos. Entretanto, o significado funcional desta correspondência em relação à determinação da forma da asa, ainda não está esclarecido.

Zera *et al.* (1992) identificaram duas isoformas da JHE (p.I 5,1 e 4,2-4,1) no plasma da linhagem SW, mas, somente a mais ácida, foi observada na linhagem LW. Entretanto, o significado funcional destas isoformas diferentes também permanece indefinido. Os resultados obtidos pelos autores, no trabalho acima citado, não estabeleceram evidências entre as diferentes atividades da JHE observadas nas linhagens LW e SW e as características cinéticas ou de estabilidade das isoenzimas estudadas.

Ainda em *Gryllus rubens*, foi comparado o metabolismo do JH, entre adultos com formas de asa diferentes, para determinar se a variação na degradação do hormônio poderia ser responsável pelas diferenças significativas de produtividade, entre as fêmeas dos dois fenótipos (Zera *et al.*, 1993). A hipótese foi refutada pelos autores, os quais esclareceram que, se os títulos de JH diferem entre



as formas, esta diferença deve resultar de algum outro processo e não da degradação diferencial do hormônio.

Com relação aos aspectos moleculares, Hanzilik *et al.* (1989) e Harshman *et al.* (1994) isolaram e clonaram o gene da JHE de *Heliothis virescens* (Lepidóptera), considerada uma praga agrícola. O gene Jhe possui 8Kb com quatro íntrons. A análise genética da variação do polimorfismo dos fragmentos de restrição (RFLP) em cruzamentos interespecíficos e intraespecíficos mostrou que o loco Jhe possui uma única cópia, sendo autossomicamente codificado em *Heliothis*. Harshman *et al.* (1994) sugeriram que uma aplicação prática dos seus resultados seria o desenvolvimento de inseticidas biológicos que tivessem como alvo o mecanismo regulador que envolve a expressão do gene Jhe.

Outro importante aspecto no estudo da fisiologia das esterases nos insetos é o papel dessas enzimas no fenômeno de resistência a inseticidas. Sabe-se que existe uma forte correlação entre a atividade de algumas enzimas, incluindo-se ésterases, e a degradação de inseticidas organofosforados e carbamatos. Na verdade, os ésteres do ácido carbâmico (carbamatos) e do ácido fósfórico (organofosforados) agem nos organismos, principalmente através da inibição de colinesterases. A acetilcolinesterase está localizada na membrana celular de vertebrados e invertebrados. Essa enzima controla a corrente iônica e desempenha um papel essencial no processo de condução do impulso nervoso, tendo ainda função neuromuscular (Wittaker, 1984). O efeito dos organofosforados e carbamatos, os quais inibem a condução do impulso nervoso levando o organismo à morte, pode ser evitado, desde que os mesmos forem degradados e transformados em produtos inócuos pela ação de carboxilesterases, fosfatases ou glutathionas transferases (Matsumura, 1975 apud Sudderuddin & Lim, 1978; Fournier *et al.*, 1992). Este fenômeno biológico, representado pelo aumento, na natureza, de insetos resistentes à inseticidas, tem-se apresentado como um dos grandes problemas para a agropecuária e para a saúde pública. Por outro lado, é um fenômeno ideal para o estudo de diferentes modelos de adaptação de organismos eucariotos a mudanças de toxicidade no meio ambiente.

A resistência a inseticidas pode resultar de três mecanismos diferentes: primeiro, a baixa penetração do mesmo no organismo, segundo, o produto é absorvido mas é eficientemente metabolizado pelos sistemas enzimáticos já citados, ou ainda, o produto é absorvido mas não encontra seu sítio alvo, que foi modificado por mutações em sua seqüência. Os dois últimos mecanismos envolvem uma origem genética relacionada à resistência a inseticidas, observada nos insetos.

Trabalhos com diferentes espécies de insetos foram realizados para elucidar os mecanismos intrínsecos que levam esses organismos a reagir de



maneira diferente às mudanças extrínsecas, ou seja, do ambiente. De modo geral, os resultados obtidos revelam uma forte correlação entre a atividade das enzimas envolvidas em processos de desintoxicação nas linhagens resistentes, quando comparadas com linhagens susceptíveis. Muitos autores têm conseguido mostrar que a existência de amplificações gênicas ou transcrição aumentada de algumas enzimas confere alterações do estado-de-ser-adaptado do organismo. Conforme Mouchés *et al.* (1986, 1987), em mosquitos e em muitas outras espécies de artrópodes, a resistência a organofosforados é conferida pela alta atividade de uma ou várias esterases desintoxicantes. Estas enzimas atuam degradando o produto e prevenindo que o inseticida, em concentrações letais, mate o inseto.

Os trabalhos de Mouchés *et al.* (1986) e Field *et al.* (1988) mostraram que a amplificação do gene para as esterases é o mecanismo básico da resistência aos organofosforados. Fournier *et al.* (1992) também relataram que a resistência da mosca doméstica a inseticidas é devido a uma superprodução da glutathione transferase.

Pasteur & Sinégre (1975) estudaram o polimorfismo esterásico e a sensibilidade a inseticidas em 12 populações naturais e três linhagens de laboratório de *Culex pipiens pipiens*. Esta espécie possui dois locos para as esterases, Est-1 e Est-2, que codificam para esterases do grupo B (aliesterases) mas não colinesterases. Ambos os locos mostraram-se polimórficos. Para o loco Est-1 não foi encontrada nenhuma correlação entre o polimorfismo das esterases e a resistência ao Dursban (um inseticida organofosforado). Para o loco Est-2, entretanto, foi observada uma forte correlação entre menor sensibilidade ao organofosforado e frequência de um dos alelos deste loco nessas populações ou linhagens.

Outros estudos relacionados aos mosquitos do complexo *Culex* foram realizados por Georgiou & Pasteur (1978) e mostraram dois tipos de esterases (esterases A e B) capazes de atuar desintoxicando o organismo e conferindo resistência ao inseticida. Estas esterases possuem diferentes mobilidades eletroforéticas, dependendo da espécie e, em alguns casos, da origem geográfica do mosquito. Outros estudos demonstraram que pelo menos três formas, para cada um desses tipos de esterases, podiam ser reconhecidas por eletroforese. A variante A1 foi observada em *C. pipiens* L da França; A2, B1 e B2 em *C. quinquefasciatus* da Califórnia; e A3 e B3 em *C. tarsalis* da Califórnia. As esterases A1 e B1 são codificadas por diferentes locos gênicos diferindo consideravelmente em sua estrutura. A esterase A1 é um dímero de 120 Kd, contendo duas subunidades iguais de 60 Kd, enquanto que a B1 é um monômero de 67 Kd. As esterases A1 e B1 foram purificadas respectivamente, da linhagem S54 de *C. pipiens* e da linhagem Tem-R de *C. quinquefasciatus*. Estas linhagens são homozigotas para enzimas



altamente ativas as quais conferem resistência à inseticidas (Pauster *et al.*, 1981, apud Mouchés *et al.* 1987).

Mouchés *et al.* (1986) clonaram o gene responsável pela síntese da esterase B1, que confere ao mosquito da espécie *C. quinquefasciatus*, resistência a organofosforados. A utilização do DNA clonado como sonda demonstrou que a linhagem resistente ao inseticida possui, pelo menos, 250 cópias a mais do gene que codifica a síntese desta enzima, em comparação com a linhagem sensível.

Mouchés *et al.* (1987) utilizaram métodos imunológicos para quantificar a produção de esterases nas linhagens de *C. quinquefasciatus* e *C. pipiens*, resistentes a inseticidas, e posteriormente compará-las com linhagens sensíveis. Os autores demonstraram que a esterase B1 de *C. quinquefasciatus* resistente foi 500 vezes mais abundante do que a da linhagem sensível, enquanto a esterase A1 de *C. pipiens* apresentou o mesmo comportamento, sendo 70 vezes mais abundante na linhagem resistente do que na linhagem sensível correspondente. Além disso, proteínas imunologicamente relacionadas à esterase B1 foram detectadas em *Aedes aegypti*, *Myzus persicae* e *Musca domestica* enquanto que nenhuma dessas espécies apresentou proteínas relacionadas à esterase A1.

Várias populações naturais e de laboratório de *Culex* foram estudadas por Raymond *et al.* (1989) e demonstraram resistência a organofosforados. As amostras foram analisadas, utilizando-se o gene amplificado como sonda, e os fragmentos genômicos observados foram gerados pela EcoR1. Os resultados mostraram claramente que o fenômeno de amplificação do gene da esterase B1 na linhagem Tem-R, mantida no laboratório por aproximadamente 15 anos, está também presente em populações naturais. Posteriormente, Raymond & Pasteur (1989) observaram que, embora a esterase B1 não se expressasse em alguns dos tecidos ou estádios do desenvolvimento, todos os tipos celulares examinados, incluindo gametas, continham o gene amplificado.

Raymond *et al.* (1993) analisaram a estabilidade de resistência a organofosforados devida à amplificação dos genes que codificam as esterases B1 e B2, em *Culex pipiens*. Os autores utilizaram duas linhagens resistentes: Tem-R, que possui uma amplificação do gene da esterase B2 e ainda, uma linhagem sensível a inseticidas, a S-Lab, a qual não possui amplificação do gene da esterase B. A pressão de seleção foi alterada para as duas primeiras linhagens possibilitando que novas linhagens fossem estabelecidas a partir destas. Para as linhagens estudadas, as quais passaram por diferentes pressões seletivas, os resultados revelaram que os genes amplificados que codificam as esterases B1 e B2 permanecem presentes nos mosquitos por até três anos (cerca de 60 gerações), após ter sido removida, por completo, a pressão seletiva por inseticidas. Esta situação difere muito da



encontrada por Devonshire & Field, 1991 (apud Raymond *et al.*, 1993) em *Myzus persicae*. Nesta, a expressão do gene amplificado para a esterase que confere resistência nesses insetos é perdida após poucas gerações, na ausência de exposição a inseticidas.

Segundo Mouchés *et al.* (1990) a amplificação de cada gene esterásico B ocorreu como um evento único e independente. Estes autores seqüenciaram o gene da esterase B1 e da sua unidade de amplificação (amplicon) que cerca o gene estrutural. A unidade de amplificação possui aproximadamente 30 Kb e contém uma seqüência constante e altamente conservada de 25 Kb, chamada de *core*. Este *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 de CE1, na extremidade 5' e CE2 na extremidade 3') que se encontram repetidas em outras partes do genoma de mosquitos resistentes e também são encontradas no genoma de mosquitos sensíveis, mas, distante do gene esterásico B1. Os autores sugerem que estas seqüências têm função no processo de amplificação.

Conforme Raymond *et al.* (1991), o mecanismo de resistência a organofosforados, em *C. pipiens*, é atribuído à superprodução de esterases codificadas por genes que estão em locos intimamente ligados, nomeados A e B, de acordo com suas preferências ao substrato, sendo que a superprodução de todas as esterases B está relacionada à amplificação do gene B. Entretanto, a ocorrência dessas duas formas enzimáticas e suas variantes eletroforéticas está relacionada a determinadas regiões geográficas, exceto para as esterases A2 e B2 que aparecem sempre juntas em amostras de, pelo menos, três continentes. A distribuição mundial desses genes amplificados, os quais são provavelmente promotores da resistência a inseticidas, foi estudada pelos autores acima citados, com o objetivo de descobrir se esta situação é promovida por elevadas taxas de mutação ou por migração. O gene estrutural da esterase B e suas regiões flangeadoras foram comparados através de análise seqüencial e/ou pela análise do polimorfismo de tamanho dos fragmentos de restrição (RFLP). Foram analisados indivíduos adultos de 9 linhagens de diferentes localidades. Uma comparação entre os mapas de restrição indica que as seqüências do DNA, no gene estrutural, são muito semelhantes entre mosquitos com esterases variantes. No entanto, o número de sítios de restrição, conservados na seqüência das regiões flangeadoras, do gene, é relativamente pequeno,



indicando que devem ter ocorrido vários eventos de mutação, separadamente, nas duas seqüências flanqueadoras, e que estas divergências genéticas devem ser antigas. Em contraste, seqüências flanqueadoras da esterase B2, de diferentes localidades geográficas (África, Ásia, América do Norte), são idênticas. Estes resultados sugerem que os genes amplificados da esterase B2 originaram-se em um evento único inicial e, posteriormente, espalharam-se pelo mundo através de migração.

A resistência a organofosforados também tem sido associada ao aumento da atividade das esterases A2 e B2 na linhagem Pel RR de *Culex quinquefasciatus* obtida em Sri Lanka, conforme Peiris & Hemingway (1990 apud Karunaratne *et al.*, 1993). Kettermann *et al.* (1992) purificaram e caracterizaram a carboxilesterase (EC 3.1.1.1.), da linhagem Pel RR de *C. quinquefasciatus*, envolvida no fenômeno de resistência a inseticidas. Ambas as carboxilesterases isoladas nesta espécie, a A2 e a B2, não apresentaram aumento detectável na quantidade protéica, embora a linhagem tenha sido 30 vezes mais resistente à seleção por inseticidas.

Os trabalhos de Kettermann *et al.* (1992) e de Karunaratne *et al.* (1993), com as enzimas A2 e B2 purificadas, puderam esclarecer que a acilação do inseticida, assim como a relação de afinidade de ligação ao inseticida, representam a principal função destas enzimas que atuam no seqüestro do mesmo. Além desta função, a inativação do inseticida por alteração de sua composição, também é realizada por estas esterases, embora em menor escala.

Callaghan *et al.* (1993) estudaram a relação genética entre dois níveis de produção de esterases, em uma linhagem de *C. pipiens*, da localidade de Lucca, na Itália. Foram encontradas, para esta linhagem, esterases possuindo a mesma mobilidade que A2 e B2, presentes em linhagens resistentes, e ainda outras cinco esterases não descritas. Elas foram denominadas de A3ⁱ, A4ⁱ, A5ⁱ, B4ⁱ, e B5ⁱ, de acordo com suas preferências ao substrato e mobilidades em relação às esterases de referência. Esta linhagem já havia sido estudada anteriormente por Villani & Hemingway (1987) apresentando, na época, alta atividade da esterase B1. Entretanto, Callaghan *et al.* (1993), reexaminaram a coleção de Lucca de 1985 em gel de poliacrilamida e provaram que, além da B1, as esterases A2 e B2 e outras, não registradas, estavam presentes. Os autores relacionaram a presença de A2, e B2, em Lucca, a uma migração recente. No laboratório, através de processos seletivos, foram detectadas três novas esterases A (A3ⁱ, A4ⁱ e A5ⁱ) e 4 novas esterases B (B1ⁱ, B3ⁱ, B4ⁱ, B5ⁱ). Exceto a A5ⁱ e a A4ⁱ, que foram altamente ativas na maioria dos indivíduos, estas esterases não apresentaram superprodução, embora tenham sido registrados para cada uma, índices altos de atividade, em pelo menos



um indivíduo. No campo, onde inseticidas estavam sendo aplicados, somente A1, A2 e B2 foram encontradas em freqüências altas, o que sugere que nem todas as esterases com altos índices de produção estejam envolvidas com a resistência a inseticidas. De acordo com Bonning *et al.* (1991) e Callaghan *et al.* (1993), a substituição A1 por A2 e B2, na população natural de Lucca, sugere que certas eletroformas possuem vantagens seletivas.

Poiré *et al.* (1992) caracterizaram duas eletroformas que foram descritas anteriormente em uma população natural de Montpellier (França) como A4 e B4 e que, posteriormente, também foram descritas na linhagem de Cyprus. A análise do polimorfismo de tamanho dos fragmentos de restrição (RFLP), da região amplificada contendo o gene da esterase B, revelou grandes diferenças entre os mosquitos de Montpellier e de Cyprus, demonstrando portanto que, dois haplotipos distintos de um gene para esterase B, com mobilidades eletroforéticas idênticas, foram amplificados. Entretanto, os autores questionaram a freqüência de aparecimento de amplificações do gene da esterase B e enfatizaram que, em áreas tratadas, a presença de uma esterase com superprodução provavelmente não permaneceria por muito tempo sem ser detectada, pois, devido à seleção, sua freqüência aumentaria rapidamente. Além do mais, a ocorrência conjunta com a esterase A, cujo mecanismo molecular de superprodução ainda não é conhecido, prova que possuem uma estreita relação (A2 com B2, A4 com B4, A5 com B5), sugerindo que amplificações da esterase A ocorreram simultaneamente com a esterase B. Assim, pode-se concluir que novas ocorrências de superprodução das esterases A ou B são eventos raros no complexo *C. pipiens*, sendo a migração o mecanismo mais provável da ocorrência de resistência a inseticidas, em populações tratadas recentemente (Raymond *et al.* 1991).

Em *Lucilia cuprina*, as esterases são as enzimas mais importantes no desenvolvimento de resistência a organofosforados. Whyard *et al.* (1994a) demonstraram que a resistência ao malathion, em linhagens de *Lucilia cuprina* coletadas na Austrália, está correlacionada com a presença da malathion carboxilesterase (MCE), que aparece em uma freqüência 45 a 50 vezes maior, quando comparada a uma linhagem sensível. Esta enzima é capaz de hidrolisar o malathion em derivados menos tóxicos, promovendo uma resistência 100 vezes maior nestas linhagens do que naquelas sensíveis. A MCE foi localizada, predominantemente, no citosol e mitocôndrias das células, com igual distribuição. Neste estudo, baseado na filtração em gel, somente uma MCE de peso molecular de 61 Kd foi purificada. A MCE de *L. cuprina* foi classificada como uma esterase do tipo B (Aldrige, 1953), por ser inibida pelo DFP. O tratamento com o DFP indicou



que a MCE é um monômero com um único sítio catalítico, o qual deve ser um resíduo de serina.

Smyth *et al.* (1994) caracterizaram a atividade específica da MCE entre sete linhagens de *L. cuprina*. Os autores mapearam o cromossomo 4 da mosca e demonstraram a existência de um *cluster* envolvendo no mínimo três e possivelmente quatro genes esterásicos. O *cluster* inclui os genes *Rop1*, *Rmal* e *E9*, o qual está localizado a uma distância de quatro unidades do mapa, do marcador *bu*. O gene que produz uma carboxilesterase intermediária (sensível ao malathion) também está incluído no *cluster*, podendo ser alelo de qualquer um dos três genes. Este alelo foi denominado de *E3* e os dados obtidos indicam que ele deve ser um alelo susceptível do *Rop1*. O *cluster* formado pelo MCE/E3/E9 é aparentemente homólogo a um outro recentemente encontrado em *D. melanogaster*, descrito por Spackman *et al.* (1994).

A enzima EST-23, identificada em *D. melanogaster*, compartilha semelhanças de mobilidade eletroforética, propriedades bioquímicas, localização fisiológica e localização no mapeamento genético com a esterase E3, envolvida na resistência a organofosforados em *L. cuprina*. O gene para esta enzima foi localizado na região citológica do braço direito do cromossomo 3, denominada 84D3. O mapeamento genético, realizado por Spackman *et al.* (1994), demonstrou que existem outros três genes esterásicos localizados nesta região. Além da EST-23, estão presentes a EST-9, uma *ali*-esterase e uma MCE, que hidrolisa organofosforados. Apesar dos estudos evolutivos revelarem a correlação entre Est23/E3 e *Mce*, de *D. melanogaster* e *L. cuprina*, a relação entre os demais membros do *cluster* não é óbvia. Os resultados sugerem que estejam ocorrendo diferenciações de genes individuais dentro do *cluster* ou que dentro de cada *cluster* existam genes adicionais de esterases, ainda não identificados (Spackman *et al.*, 1994).

A resistência ao malathion, devida à rápida hidrólise do inseticida, tem sido observada em outras espécies de insetos, incluindo mosca doméstica (Kao *et al.*, 1985) mariposas (Beeman & Schmidt, 1982), cigarrinhas (Motoyama *et al.*, 1984) e mosquitos (Hemingway, 1985; Zeigler *et al.*, 1987 e Whyard *et al.*, 1994b).

Em várias linhagens de mosca doméstica, o aumento da resistência a inseticidas organofosforados foi atribuído a níveis aumentados de carboxilesterases (Kao *et al.*, 1984). Outros estudos de Kao *et al.* (1985) resultaram no isolamento de duas linhagens resistentes de mosca doméstica. Esses experimentos demonstraram a existência de formas múltiplas de esterases na fração microssomal. Duas dessas enzimas, com p.I 5,1 e 5,3, apresentavam elevada atividade e atuavam sobre vários substratos, sendo inclusive capazes de hidrolisar o malathion.



Whyard *et al.* (1994b) isolaram uma esterase que confere resistência a inseticidas em *Culex tarsalis*, a qual foi também caracterizada como malathion carboxilesterase (MCE). A linhagem resistente foi 150 vezes mais resistente ao malathion do que a linhagem sensível. Entretanto, esta linhagem foi fracamente resistente ao maloxon e ao carbaril, apresentando-se sensível aos outros inseticidas testados. Nesta espécie, a MCE expressa-se durante todo o desenvolvimento, sendo presente em concentrações elevadas nos tecidos dos intestinos das larvas. Os experimentos com o fracionamento subcelular indicaram que a MCE foi localizada primeiramente na mitocôndria dos insetos resistentes e no citoplasma dos insetos sensíveis. Esta enzima foi purificada de homogenados de ambas as linhagens, apresentando um peso de 59Kd. Os resultados obtidos indicaram que os insetos resistentes possuem duas MCEs com p.Is de 6,8 e 6,2, enquanto insetos sensíveis possuem somente uma MCE com p.I 6,8. A MCE, presente somente nas linhagens resistentes, hidrolisou o malathion 18 vezes mais rápido do que a MCE, comum às duas linhagens. Estes resultados sugerem que a resistência ao malathion, em *C. tarsalis*, é devida à presença de esterases qualitativamente diferentes.

Os experimentos realizados por Shamaan *et al.* (1993) demonstraram que, em larvas de *Aedes aegypti*, os níveis de carboxilesterases são baixos indicando que, nesta espécie, a habilidade para degradar o inseticida não foi desenvolvida pelo menos nesta fase do ciclo biológico. Apesar da ocorrência de uma atividade alta da carboxilesterase ter sido descrita na linhagem Kuala Lumpur desta espécie, esta linhagem foi sensível ao malathion, abate, lindane e DDT.

Casabé & Zerba (1981) descreveram o padrão de esterases em *Triatoma infestans*, um dos principais vetores da doença de Chagas no Brasil, determinando a ocorrência de 9 bandas, das quais 4 apresentaram atividade estereolítica na presença de malathion e paraoxon. Somente uma esterase, caracterizada como arilesterase, apresentou atividade frente aos dois inseticidas. Malkenson *et al.* (1984) isolaram e caracterizaram esta arilesterase, especialmente em relação a sua atividade na hidrólise de organofosforados, mostrando que esta enzima desempenha uma função essencial na desintoxicação a inseticidas. Entretanto, não há na literatura trabalhos referentes aos mecanismos genéticos que deram origem à resistência observada nestes insetos.

Para uma espécie de afídeo, *Myzus persicae*, a resistência a inseticidas está relacionada à síntese aumentada de uma esterase denominada E4, a qual hidrolisa e seqüestra os ésteres do inseticida (Devonshire & Moores, 1982; Devonshire, 1977). Devonshire & Sawicki (1979) haviam sugerido que o provável mecanismo regulador da resistência seria a amplificação de genes originados a



partir de duplicações sucessivas do gene estrutural da esterase. Segundo esses autores, as duplicações de genes estruturais são extremamente importantes na evolução, porque permitem a ocorrência de novas mutações, preservando o gene original. Os mesmos autores verificaram que a adaptabilidade dos afídeos ao seu ambiente é grande, sendo capazes de duplicar o gene que codifica a esterase E4 (até 64 cópias deste gene foram verificadas em linhagens resistentes de *M. persicae*), sobrevivendo ao tratamento com inseticidas e anulando a produção excessiva da enzima na ausência destes compostos.

Devonshire *et al.* (1986) estudaram as alterações ao nível de RNA, associadas com o aumento na produção da esterase. Avaliações quantitativas e qualitativas foram realizadas no mRNA que codifica a E4 e a FE4 (uma variante da E4 descrita em Ferrara, Itália). As linhagens resistentes estudadas produziram uma quantidade maior de mRNA, responsável por maior produção de enzimas, sugerindo que um processo de amplificação esteja envolvido.

Field *et al.* (1988) utilizaram clones de cDNA isolados para estudar a base molecular da resistência em *Mizus persicae*. A hibridização de clones de cDNA com DNA genômico através da análise de Southern blot demonstrou que somente alguns fragmentos de restrição, relacionados a esterases, estão amplificados. Os autores sugeriram que as diferenças qualitativas entre os padrões de restrição nos diferentes clones de resistência em afídeos estão correlacionados com a presença ou a ausência de uma translocação específica e com a produção de E4 e FE4. Field *et al.* (1993) trabalharam no mapeamento de restrição e sequenciamento do DNA genômico clonado e mostraram que o gene E4 é codificado por uma seqüência de 4,3 Kb interrompida por seis íntrons. O cDNA da FE4 apresentou 99% de identidade com o E4, sendo a diferença mais importante, a substituição de um único nucleotídeo, resultando na FE4 em um mRNA com uma seqüência extra de 36 nucleotídeos na extremidade 3'.

Prabhakaran & Kamble (1995) caracterizaram e purificaram as três esterases mais ativas (E5, E6 e E7) de linhagens resistentes e susceptíveis das baratas *Blattella germanica* (L.). Os autores observaram que a atividade da esterase E6 foi alta em linhagens resistentes. Experimentos de inibição da atividade esterásica pelo paraoxon, clorifós e propoxur demonstraram que não existem diferenças estruturais, na esterase E6, entre as linhagens. Os resultados sugerem que a resistência a inseticidas, em baratas, é devida à produção aumentada da esterase E6, cuja função deve estar mais ligada à seqüestração de moléculas tóxicas do que à hidrólise destas.

Fournier *et al.* (1992) construíram linhagens transgênicas, utilizando um minigene, formando uma variabilidade de linhagens entre o tipo selvagem e



mutantes *Ace*⁻ (mutantes sem atividade da acetilcolinesterase). Esses autores demonstraram que existe uma forte correlação entre a quantidade da acetilcolinesterase no sistema nervoso central e a sensibilidade à inseticidas.

Um estudo do processo seletivo, de populações naturais originadas de vários países, foi realizado por Pralavorio & Fournier (1992), promovendo o isolamento de 13 linhagens de *D. melanogaster* resistentes ao "paraoxon". Foram realizados estudos *in vitro* com enzimas purificadas para se estabelecer níveis de inibição da acetilcolinesterase por este inseticida. Os experimentos evidenciaram que muitas linhagens resistentes são portadoras de acetilcolinesterases alteradas. Estas linhagens possuem enzimas com altos níveis de resistência específica ou cruzada com outros inseticidas. Entretanto, a resistência a inseticidas pode ser conferida de forma qualitativa através de mutações que alteram o sítio de ligação da enzima. Por exemplo, os canais de sódio são alvos dos piretróides e a acetilcolinesterase funciona como sítio alvo dos organofosforados e carbamatos. Fournier *et al.* (1992) identificaram uma mutação em ponto como responsável pela resistência ao malathion na linhagem MH19 de *Drosophila*, a qual foi isolada por Morton & Singh (1982). Os resultados obtidos pelos autores mostraram que houve a substituição da fenilalanina, na posição 386, pela tirosina, resultando em uma enzima com propriedades catalíticas alteradas.

Estudos mais recentes de Fournier *et al.* (1993) identificaram outras mutações em linhagens resistentes, a troca dos aminoácidos Phe¹¹⁵ por Ser, Ileu¹⁹⁹ por Val, Gly³⁰³ por Ala e Phe³⁶⁸ por Tyr, já citada anteriormente. Cada uma destas mutações levaram a padrões de resistência diferentes, e combinações entre estas mutações produziram enzimas altamente resistentes.

Mutero *et al.* (1994) realizaram a análise seqüencial do gene *Ace* de várias linhagens naturais de *D. melanogaster* resistentes a inseticidas. Esta análise resultou na identificação de cinco mutações em ponto associadas à sensibilidade reduzida a inseticidas. Os autores confirmaram as mutações anteriormente observadas e ainda descreveram uma nova substituição da Ileu¹⁹⁹(Val¹²⁹) por Thr (Treonina). Em alguns casos, várias destas mutações estavam presentes em uma mesma proteína levando a diferentes padrões de resistência. Os autores sugeriram que a recombinação entre alelos pré-existentes, em populações naturais, deve ser o mecanismo pelo qual os insetos rapidamente se adaptam a novas pressões seletivas do ambiente.

Uma outra função, relacionada à atuação de enzimas esterásicas, é a participação destas em processos digestivos. A atividade esterásica foi medida por análise ao espectrofotômetro em homogenados de vários tecidos do quinto estágio larval da mariposa *Lymantria dispar* (L.) por Kapin & Ahmad (1980). A atividade



específica desta enzima foi medida nos seguintes tecidos: intestino médio, tubúlos de Malpighi, cordão nervoso, corpo gorduroso, intestino posterior, intestino anterior, gônadas, músculos, cérebro, tegumento e hemolinfa. A quantidade enzimática observada no intestino médio foi 91,5% da atividade total das esterases, sendo que a maior atividade observada neste local foi de carboxilesterases. Com exceção do cérebro e do cordão nervoso nos quais a acetilcolinesterase (EC 3.1.1.7) mostrou-se altamente ativa, todos os demais tecidos revelaram a carboxilesterase (EC 3.1.1.1) como enzima predominante. Existem ainda evidências de algumas arilesterases (EC 3.1.1.2), particularmente no intestino médio, cordão nervoso e cérebro. Segundo este autor, a elevada atividade de carboxilesterase no intestino estaria correlacionada aos processos ocorridos durante a digestão

Jones & Brancroft (1986) detectaram a presença de esterases em diferentes tecidos de *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 no intestino, e relacionada com a digestão dos alimentos ingeridos pelo inseto.

Argentine & James (1995) encontraram uma esterase específica da glândula salivar de fêmeas e machos adultos de *Aedes aegypti*, a qual denominaram SG-EST. Estes autores mostraram que a SG-EST era secretada na saliva tanto de machos como das fêmeas e sugeriram um possível papel envolvido na alimentação de açúcar nesses insetos. Além da SG-EST, os autores detectaram uma esterase específica da glândula salivar das fêmeas. Nas fêmeas, a atividade esterásica atinge um máximo dois a três dias após a eclosão, ao passo que, nos machos, a atividade esterásica permanece constante, sugerindo um segundo papel da esterase específica da glândula salivar das fêmeas, relacionado à alimentação de sangue.

Além dos estudos em insetos, outro exemplo que relaciona esterases com processos digestivos foi realizado por McGher (1992, apud Kennedy *et al.*, 1993). Neste trabalho, o autor caracterizou uma carboxilesterase não-específica que se expressa somente no intestino de uma espécie de nematoda de vida-livre, o *Caenorhabditis elegans*, a qual estaria provavelmente relacionada às funções digestivas.

Algumas esterases parecem estar envolvidas com processos reprodutivos nos insetos. Um bom exemplo dessa atividade refere-se à esterase-6 de *Drosophila melanogaster* e outras espécies relacionadas. A esterase-6 de *D. melanogaster*, *D. simulans* e *D. mauritiana* é produzida em várias fases da vida e em diversos tecidos, mas o maior pico de expressão acontece no ducto espermático de



machos adultos. (Karotam & Oakeshott, 1993). Esta enzima foi exaustivamente estudada em *D. melanogaster*, relacionada a várias etapas da reprodução (Danford & Beardmore, 1979; Sheehan *et al.*, 1979; Stein *et al.*, 1984). A EST-6 é um componente do fluído seminal de machos adultos de *D. melanogaster*, capaz de hidrolisar o cis-vacênil-acetato (um éster lipídico sintetizado somente pelos machos) em cis-vacênol. Esta reação ocorre no trato reprodutivo das fêmeas e completa-se cerca de seis horas após a cópula (Mane *et al.*, 1983).

Há evidências de que, nos machos, a EST-6 esteja sob o controle do hormônio juvenil (Stein *et al.*, 1984). Foi detectado que esta enzima apresenta-se em níveis baixos nas fases que antecedem a fase adulta, revelando nos machos um rápido aumento de atividade cerca de 36 horas após o nascimento, e estabilizando-se a partir deste ponto. Os níveis de atividade nas fêmeas são cerca de três vezes menores, do que aqueles encontrados nos machos (Sheehan *et al.*, 1979).

Mane *et al.* (1983a) demonstraram que a EST-6 transferida para fêmeas de *D. melanogaster* durante a cópula, promove um grande decréscimo em sua atratividade, dentro das seis horas após o cruzamento. Este decréscimo na atratividade da fêmeas pode estar relacionado a um aumento do valor adaptativo dos machos, pois ocorre desperdício de esperma em fêmeas que copulam mais de uma vez em 24 horas. Há ainda evidências de que, em *D. melanogaster*, além da diferença de atividade entre machos e fêmeas, a presença desta enzima nas pernas e antenas poderia estar envolvida com a degradação de feromônios sexuais, como já observado em lepidópteros (Healy, 1991).

Scott (1986) confirmou a forte influência dessa enzima na receptividade de fêmeas cruzadas; fêmeas EST-6⁺ recruzam com uma frequência significativamente menor nas 6 a 18 horas após o primeiro cruzamento do que fêmeas que não receberam a enzima (fêmeas EST-6⁰). Entretanto, o autor demonstrou que não existe diferença significativa na atratividade de fêmeas cruzadas com machos EST-6⁺ ou EST-6⁰ dentro das primeiras 10 horas após o cruzamento.

Conforme Richmond & Senior (1981), o fluído seminal é transferido para a fêmea nos primeiros três minutos de cópula, sendo que o macho leva de 24 a 48h para recuperar o nível da EST-6. Esta enzima é, após alguns minutos de cópula, transferida para a hemolinfa, onde permanece até quatro dias (Meikle *et al.*, 1990). O trabalho de Scott & Richmond (1987) mostrou que o cis-vacênil acetato só é transferido para as fêmeas após cinco a seis minutos do início da cópula, embora a interrupção da mesma, com apenas três minutos, seja suficiente para induzir um decréscimo na capacidade de atração das fêmeas.



Mane *et al.* (1983a) demonstraram que tanto o vacenol, como o vacenil-acetato, diminuem o número de cruzamentos entre casais com fêmeas virgens, quando estas foram tratadas topicamente. Portanto, o éster ou o álcool (cis-vacenol) são considerados como anti-afrodisíacos, promovendo menores frequências de corte em fêmeas inseminadas, reduzindo assim a probabilidade de novos cruzamentos.

A esterase 6 (EST-6) é uma carboxilesterase (E.C.3.1.1.1) que hidrolisa preferencialmente o α -naftil-acetato; seu loco (Est-6) é polimórfico para dois ou mais alelos na maioria das populações naturais (Wright, 1963). Este autor mostrou, através da mobilidade eletroforética, que a EST-6 ocorre com duas variantes, denominadas EST^S e EST^F, controladas por genes alelos codominantes, localizados na posição 36,8 do cromossomo 3. Os heterozigotos sintetizam ambas as variantes, não sendo formada, entretanto, a forma enzimática híbrida. Mane *et al.* (1983b) purificaram as duas isoformas da EST-6 (6^S e 6^F) a partir de uma linhagem polimórfica de *D. melanogaster*. As enzimas purificadas são glicoproteínas monoméricas com pesos moleculares de 62 Kd, apresentando composição de aminoácidos semelhante.

Oakeshott *et al.* (1987) clonaram o gene Est-6 de *D. melanogaster*, com oligonucleotídeos sintéticos produzidos por seis peptídeos trípticos purificados da proteína esterásica-6. O cDNA foi isolado e hibridizado *in situ* ao sítio da Est-6 no cromossomo 3 na região 69A1. O clone de cDNA da Est-6 foi de 1,85 Kb, sendo que a análise de hibridização com RNA fraccionado eletroforéticamente e usando o cDNA como sonda, revelou duas regiões transcritas de 168 e de 183 Kb. A transcrição da sequência de cDNA revelou uma proteína de 548 resíduos localizada no braço esquerdo do cromossomo 3, região 69A (subseção A1-A5).

Conforme Collet *et al.* (1990), em *D. melanogaster*, o fragmento de DNA revelou na região do gene da Est-6, uma duplicação em "tandem" contendo dois genes funcionalmente diferentes, designados Est-6 e Est-P. A região de 20 Kb ao redor da Est-6/Est-P produz no mínimo seis transcritos de RNAs. De acordo com Friedman *et al.* (1991) e Brady *et al.* (1991 apud Procunier *et al.*, 1991), em *Drosophila*, a natureza colinear dos mapas físicos e genéticos que estabelecem como regra que uma banda é representada por um gene, está sendo alterada, pois, genes estão sendo associados com bandas e interbandas.

O mapeamento físico preciso, da região, foi realizado por Procunier *et al.* (1991) através de uma técnica para hibridização *in situ* com alto poder de resolução (protocolo de Friedman *et al.*, 1991 apud Procunier *et al.*, 1991). Estes autores confirmaram a existência de uma duplicação do loco Est-6, já anteriormente denominado de Est-P. Os exons destes locos mostraram cerca de 66% a 57% de



homologia de suas seqüências de nucleotídeos, sendo que a sonda utilizada para a Est-6 também detecta a Est-P. Os autores demonstraram que a localização precisa do gene Est-6 é dentro da subseção A1-A3 do braço esquerdo do cromossomo 3.

Outras espécies de *Drosophila* também apresentam esterases exclusivas de machos ou fêmeas. Como exemplo podemos citar a *Drosophila aldrichi*, que apresenta a esterase-F, uma α -esterase presente no sistema reprodutor masculino (Johnson *et al.*, 1968; Kambyselis *et al.*, 1968). Em *D. dunni* foi determinada uma esterase, também denominada F, com as mesmas características acima (Carrasco *et al.*, 1984). *D. mulleri* e *D. arizonensis* (atualmente *D. arizonae*) apresentam duas α -esterases específicas dos machos, EST-10 e a EST-12, sendo que *D. arizonensis* possui uma α -esterase, denominada EST-9 presente só nos machos e uma α -esterase que ocorre só nas fêmeas, a EST-7 (Ceron, 1988). Estas enzimas talvez estejam envolvidas em processos reprodutivos, nestas espécies.

Os dados da literatura apresentados nesta revisão mostram que, à exceção das colinesterases, esterases do hormônio juvenil, esterases que conferem resistência aos inseticidas e a esterase-6 de *D. melanogaster* para as quais há sólidas evidências de papéis fisiológicos específicos, a função para a grande maioria das esterases permanece especulativa. Entretanto, estas enzimas têm sido detectadas em todas as fases do desenvolvimento e em muitos tecidos dos insetos, o que demonstra a importância desta classe de enzimas no desenvolvimento normal desses organismos, e reforça a necessidade de novos estudos nesta área.

No presente trabalho utilizou-se como material biológico o díptero, forídeo, *Megaselia scalaris*. A família Phoridae é constituída por 220 gêneros, sendo que, cerca de 1200 espécies pertencem ao gênero *Megaselia*. Este é muito abundante em diversas regiões do mundo, ocupando uma grande variedade de habitats (Robison, 1971). *M. scalaris*, possui distribuição cosmopolita, com exceção de regiões áridas, ocorre em regiões tropicais e subtropicais, principalmente em ambientes modificados pelo homem.

Megaselia scalaris, anteriormente denominada como *Aphiochaeta xantina*, é um díptero pequeno com aparência corcunda. Seu corpo é amarelado, com manchas marrom escuras e olhos pretos. As características morfológicas externas de ovos, larvas, pupas e adultos foram descritas por Grandi (1914), Patton (1922) e Semenza (1953). O ovo é branco com a face superior coberta por pequenos espinhos e a inferior com manchas hexagonais; seu diâmetro longitudinal é de 0,6 mm e o transversal, de 0,2 mm. A larva possui coloração bege clara, é rica em gordura, o que impossibilita a observação dos órgãos internos por transparência. O tamanho máximo das larvas que originam machos e fêmeas é de 5 e 7,0 mm,



respectivamente. As pupas são um pouco menores que as larvas, muito resistentes, não apresentando características especiais, sendo inicialmente bege-claras e escurecendo com o desenvolvimento.

Esta espécie apresenta um acentuado dimorfismo sexual, sendo que a fêmea (4 mm) pode chegar ao dobro do tamanho de um macho (2 mm). Na verdade, existe uma grande variação de tamanho nos dois sexos. Vetorazzi (1987) observou que a biomassa das fêmeas geralmente excede 30% a 40% a biomassa dos machos. Carareto & Mourão (1988) mediram o tamanho de pupas em quatro linhagens geográficas de *M. scalaris*, constatando que o comprimento e a largura das pupas que originam fêmeas foi, em média, maior do que daquelas que originam machos. Entretanto, os autores observaram uma sobreposição nas distribuições do comprimento e largura de pupas dos dois sexos, sugerindo que o tamanho da pupa não é um indicador seguro do sexo. Silva (1991) mostrou que as pupas de machos são 18% menores e 23% mais estreitas do que as de fêmeas. Zanon (1988) também observou uma variação acentuada no tamanho de pupas dos dois sexos.

A morfologia dos aparelhos genitais foi descrita por Patton (1922), Semenza (1953), Haider (1956) e Benner & Curtis (1988). A fêmea apresenta dois ovários, ligados à câmara genital por um oviduto central, o qual é formado a partir de dois ovidutos laterais. A câmara genital recebe dorsalmente os ductos das glândulas acessórias e na face ventral um ducto que recebe o produto de duas espermatecas. O macho apresenta na extremidade do abdomen, uma estrutura denominada fórcepes, homóloga ao clássper, que ajuda a segurar a fêmea durante a cópula. Internamente, ocorre um par de testículos de tamanhos variados, um par de vesículas seminais e duas grossas paragônias.

M. scalaris se desloca de forma incomum, com movimentos rápidos e em saltos, o que representa um padrão único entre os insetos. De acordo com Miller (1979), as moscas se deslocam por movimentos breves e rápidos, regularmente interrompidos por pequenas paradas, onde ficam em completa imobilidade. As fases de deslocamento e parada têm aproximadamente a mesma duração, ocorrendo de cinco a oito vezes por segundo. Durante o deslocamento, a velocidade máxima é cerca de 80 a 112 vezes o comprimento do inseto por segundo, sendo uma das mais altas apresentadas neste taxon. O autor explica que, provavelmente, o padrão de deslocamento poderia servir como estratégia para confundir os predadores, e, nas paradas, o inseto recuperaria o desgaste e poderia analisar melhor o ambiente. Assim, o padrão de deslocamento dos forídeos apresenta função visual e quimiossensorial, produzindo a orientação para o movimento.

Esta espécie é caracterizada por seus hábitos polípagos, desenvolvendo-se sobre materiais em decomposição, de origem animal ou vegetal,



ou ainda sobre fezes humanas ou de animais. Na verdade, os hábitos das espécies desse gênero são muito diversificados, sendo que, uma única espécie pode ser zoófaga, saprófaga ou ainda endoparasita no estágio larval.

O parasitismo causado por larvas de *M. scalaris* pode provocar vários tipos de miíases no homem e nos animais (Patton, 1922), promovendo um grande interesse médico nos estudos sobre esta espécie. Patton (1922), em seu trabalho realizado na Índia, registrou vários casos de miíases no homem e em animais, envolvendo *M. scalaris*, sozinha ou associada, com *Megaselia rufipes* ou *Chrysomya bezziana*. O autor descreve que, por ser *M. scalaris* uma espécie muito comum naquela região, provavelmente a frequência de miíases provocadas por este inseto seja maior do que a registrada. Os casos observados pelo autor incluem miíases cutânea, oftálmica e intestinal. Singh & Rana (1989) apresentaram um caso de miíase urogenital em uma paciente com mielite transversa provocada por larvas de *M. scalaris*. Priyanond *et al.* (1973) apud Tumrasvin (1977) relataram um caso de obstrução uretral em uma mulher, provocada por larvas de *M. scalaris* e *M. rufipes*. Conforme James (1947); Smith *et al.* (1973); Zumpt (1965) apud Komori (1978), larvas da família Phoridae ocasionalmente causam miíase intestinal humana, devido a ingestão de alimentos ou água contaminados com ovos ou larvas das duas espécies anteriormente citadas. No Japão, casos de miíase intestinal, provocada por *M. spiracularis* foram registrados pelos autores Ogawa *et al.* (1959); Kano *et al.* (1962) apud Komori *et al.* (1978).

Komori *et al.* (1978) descreveu um caso de miíase pulmonar por *M. spiracularis*, que foi inicialmente diagnosticado como tuberculose. Após a cirurgia, verificou-se que os nódulos pulmonares eram massas de larvas desse forídeo.

Apesar de existirem vários casos de miíases por *M. scalaris* descritos na literatura, este assunto foi retomado por Tumrasvin *et al.* (1977). Os autores realizaram experimentos onde ratos brancos foram expostos a larvas deste forídeo, oralmente, na genitália e intraperitonalmente, através de injeção. Nenhum caso de miíase artificial foi obtido pelos autores, os quais sugeriram que, os casos de miíases humanas provocadas por este forídeo devem ser acidentais, o que não diminui a importância do fato, desde que a saúde das pessoas infectadas é fortemente prejudicada. De acordo com Pessoa (1981) as miíases externas humanas são semiespecíficas porque as larvas confinam suas atividades ao tecido necrosado. No entanto, podem disseminar a infecção, acentuando a necrose do tecido sobre o qual vivem.

Megaselia scalaris possui ainda importância para a saúde pública pois, por desenvolver-se em fezes é considerada como vetor de vários tipos de afecções intestinais, tendo sido considerada como transmissora do *Vibrio comma*, agente



etiológico da cólera nas Filipinas (Bohart & Gressit, 1951; El-Miniawi, 1965 apud Prawirodisastro & Benjamin (1979).

Existe também um interesse econômico no estudo desta espécie. Conforme Walter & Wene (1951), *M. scalaris* tornou-se praga para a lavoura de milho do Texas, Estados Unidos, pois suas larvas parasitam espigas verdes, provocando prejuízos. Robinson (1971) relatou a ocorrência desta espécie em brotos de abacaxi. Zanon (1991) observou invasões espontâneas e experimentais deste forídeo em colônias de *Apis mellifera*, nas quais suas larvas atacam larvas vivas de *A. mellifera*, e ainda, alimentam-se de mel e polén, provocando o abandono da colméia pelas abelhas. Macieira *et al.* (1983) citam em seu trabalho a observação de Leal (comunicação pessoal) sobre o ataque de larvas de *M. scalaris* a colméias de *Meliponini*. Neste caso, as larvas do forídeo atuam destruindo os órgãos internos e tecidos da abelha hospedeira. Pickel (1928) observou larvas de forídeos em colméias de *Melipona ruficrus* e *Apis mellifera*. O autor observou que as invasões geralmente ocorrem em colméias fracas e que provavelmente as moscas são atraídas pelo cheiro forte do polén fermentado.

Garris (1983) observou larvas de *M. scalaris* infestando colônias de laboratório de duas espécies de carrapatos, *Amblyomma variegatum* e *Anocentor nitens*. As larvas eram encontradas alimentando-se do interior de fêmeas mortas, de ovos, que por isso deixaram de eclodir, e de fungos que se acumularam nas caixas de manutenção das colônias. O autor ressaltou a surpreendente invasão de uma caixa utilizada em experimentos para testes de suscetibilidade a acaricidas tais como permetrina, crotoxyphos e amitraz.

Rocha *et al.* (1984) demonstraram através de experimentos que *M. scalaris* entravam nos recipientes onde houvesse fêmeas engorgitadas do carrapato *Boophilus microplus*. As invasões ocorreram em condições de campo ou de laboratório, mostrando que fêmeas vivas ou mortas de *B. microplus* atraíam as moscas. Os autores observaram que a umidade influencia diretamente o ciclo evolutivo das duas espécies envolvidas, e concluíram que a infestação de populações de carrapatos por larvas de *M. scalaris* tornava-se mais grave quando a umidade do ar ultrapassava 30%, com a invasão de fêmeas partenóginas, que tinham sua cutícula perfurada pelas larvas que se desenvolviam até imagos.

Dentre as espécies de forídeos, *M. scalaris* é provavelmente conhecida por entomologistas do mundo todo. Conforme Robinson (1975), adultos e larvas deste forídeo invadem freqüentemente colônias de insetos de laboratório. As larvas infestam o alimento, insetos mortos dentro da colônia ou detritos que se acumulam nos recipientes de manutenção e criação. Os adultos são, às vezes, observados nos recipientes ou voando no laboratório. O autor descreveu a infestação de *M. scalaris*



em colônias experimentais de baratas, especialmente quando há superpopulação e excesso de resíduos, como insetos mortos e fezes, nos recipientes. O autor sugere que estas infestações podem ser controladas sem o uso de inseticidas, mantendo as colônias em locais limpos e arejados. Entretanto, a ampla distribuição e os hábitos alimentares diversificados, apresentados por este forídeo, tornam praticamente impossível sua eliminação dos laboratórios.

Disney (1976) relatou ter coletado ovos de caramujos de jardim infestados por *M. ciliata*. Devido à existência de outros registros de espécies deste gênero com mesmo hábito alimentar, o autor sugere que, talvez, a associação desses forídeos com ovos de caramujos, seja característico do subgênero *Aphiochaeta* (gênero *Megaselia*).

Existem na literatura vários trabalhos sobre *Megaselia halterata*, por ser esta espécie conhecida como a pior praga da cultura de cogumelos (Richardson *et al.* 1977; Richardson & Hesling, 1977, 1978; Binns *et al.*, 1979; White, 1981). As larvas se alimentam do micélio, diminuindo a produtividade, quando a densidade excede a 100 larvas por 30g de micélio. Além disso, os adultos espalham doenças que atacam os cogumelos, por exemplo esporos de *Verticillium fungicola* (White 1981a). O combate a invasões, por tratamento com inseticidas, foi estudado por White (1979) que testou a permetrina e o methoprene. Os resultados obtidos pelo autor mostraram que o methopreno é mais ativo que a permetrina, no entanto os insetos são pouco susceptíveis. White (1981) encontrou resultados positivos no controle de *M. halterata* com aplicações de diclorvos realizadas, periodicamente, com um pulverizador automático. Devido às dificuldades do controle desse forídeo com inseticidas, alguns estudos alternativos, com controle biológico, têm sido desenvolvidos. O *Howardul husseyi*, um nematoda endoparasita deste forídeo capaz de causar esterilidade nas fêmeas, parece ser um promissor agente de controle (Richardson & Chanter, 1979; 1981).

Os trabalhos sobre a biologia e ecologia de *M. scalaris* (El-Miniawi & Moustafa, 1965; Prawirodisastro & Benjamin, 1979; Trumble & Pienkowski, 1979; Benner & Ostermyer, 1980; Macieira *et al.*, 1983), tratam de vários aspectos do ciclo de vida deste inseto tais como duração das fases do ciclo biológico, longevidade dos imagos, razão de sexo, comportamento sexual, período de fertilidade e número de ovos postos por fêmea; entretanto, os resultados gerais, mostram-se controversos ressaltando a necessidade de novos estudos.

A duração das fases do desenvolvimento foi estudada por muitos autores em temperaturas que variaram de 14,5 a 35,2°C (Zanon, 1982; Trumble & Pienkowsy, 1979). Vetorazzi (1993) apresentou um quadro de comparação dos resultados obtidos por vários autores, para a duração das fases do ciclo biológico e



para a longevidade dos imagos. Conforme revisão feita pela autora, a temperatura é um importante fator na diferenciação da duração de cada fase, mas não o único a influenciar o tempo de desenvolvimento, devendo-se considerar também os efeitos da umidade.

Conforme Mainx (1964), *M. scalaris* é um organismo interessante para estudos genéticos, por apresentar um tipo diferente de determinação do sexo. A determinação do sexo masculino depende da presença de um segmento cromossômico portador de genes epistáticos, que pode ligar-se, por translocação, à extremidade de qualquer um dos três cromossomos presentes nesta espécie. Esta subunidade cromossômica foi denominada de "sex-realizer".

O presente trabalho tem como objetivo o estudo do padrão de esterases de várias fases do desenvolvimento de *M. scalaris*, utilizando a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida. A verificação da existência de variações no padrão de esterases no decorrer do desenvolvimento deste inseto, poderia indicar a presença de mecanismos reguladores que agem em fases específicas do desenvolvimento e diferenciação. Espera-se com este trabalho contribuir para melhorar o conhecimento da biologia desta espécie, que além de possuir um interesse médico e econômico, também revelou-se muito interessante para o estudo genético, tendo em vista os diferentes padrões de herança observados para as esterases, relacionados talvez ao padrão incomum de determinação sexual apresentado por este inseto. Além disso, o estudo das esterases mostra-nos o polimorfismo individual e interlinhagens, que é a medida direta da variabilidade genética das populações estudadas desta espécie. Este é o primeiro trabalho relacionado ao estudo das esterases em *Megaselia scalaris*.



II. MATERIAL E MÉTODOS

II.1. Linhagens

Neste trabalho foram utilizadas quatro linhagens de *Megaselia scalaris*. A Tabela 1 apresenta a denominação e a procedência nas linhagens.

Tabela 1. Linhagens de *Megaselia scalaris* e suas procedências.

Linhagens	Procedência
CG	Campo Grande - RJ
CP	Campinas - SP
RP	São José do Rio Preto - SP
PAR	Paranaíba - MS

As linhagens CG e CP têm sido mantidas no Departamento de Biologia do Instituto de Biociências e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, UNESP, há mais de 10 anos e foram cedidas pela Profa. Dra. Cláudia M. A. Carareto. As linhagens PAR e RP foram introduzidas no laboratório pela autora deste trabalho. A linhagem PAR foi estabelecida a partir de moscas coletadas sobre fezes de bovinos, em estábulos da Fazenda União das Índias, a 60 Km de Paranaíba - MS, em fevereiro de 1993. A linhagem RP foi fundada a partir de moscas coletadas em iscas contendo leite fermentado e ração para gatos, em agosto de 1994, nesta cidade.

Populações estoques destas linhagens foram mantidas em garrafas de vidro de 250 ml, contendo meio de fubá-araruta (Mourão, 1987), em câmara de temperatura a 25°C, com repiques a cada duas semanas.

II.2. Obtenção das amostras

II.2.1. Adultos

Machos e fêmeas foram coletados através do seguinte procedimento: moscas do estoque foram mantidas, para cruzamentos em massa e postura, em frascos de 250 ml de capacidade contendo meio de fubá-araruta, por cinco dias e em seguida, transferidos. Os frascos contendo a progênie desses cruzamentos em massa foram reservados para a coleta dos imagos. Assim que estes emergiam dos



casulos, eram coletados, anestesiados com éter, separados por sexo e mantidos, em grupos de 10 a 15 indivíduos, em tubos de vidro contendo meio de banana-ágar, onde eram deixados até atingirem cinco dias de idade, quando então, eram utilizados para a análises eletroforéticas. O meio de banana-ágar foi utilizado, neste procedimento, por ser mais homogêneo e consistente, o que impedia a morte acidental das moscas. Moscas não utilizadas de imediato para as eletroforeses foram congeladas a -20°C e mantidas por até 90 dias antes de serem analisadas.

II.2.2. Larvas, pupas e casulos

Larvas de 1° e 2° estágio foram coletadas em placas de petri com meio de fubá-araruta adaptadas a caixas de acrílico (conforme descrito no item II.3). As larvas foram transferidas para uma placa escavada contendo solução fisiológica para insetos (Demerec & Kaufmann, 1945) lavadas por três vezes, centrifugadas a $800 \times g$ por dois minutos em tubos eppendorf e então, congeladas a -20°C , até a realização das eletroforeses.

Nos experimentos de comparação do padrão de esterases ao longo do desenvolvimento, procurou-se manter a mesma concentração de proteína para cada estágio analisado (aproximadamente $150 \mu\text{g}$ de proteína por amostra). Portanto, a quantidade de larvas utilizadas para compor as amostras foi diferente para cada estágio analisado. Para larvas de 1° estágio, cada amostra era constituída de 100 larvas; para o 2° estágio foram coletadas 40 larvas. Larvas de 3° estágio, eram coletadas entre aquelas que já tinham abandonado o meio de cultura e vagavam pela parede das garrafas. As pupas também foram coletadas diretamente na parede das garrafas, após terem sido umidecidas com um pincel embebido em solução fisiológica de insetos. Após a coleta, as larvas de 3° estágio e as pupas foram lavadas também em solução fisiológica, enxugadas em papel absorvente e, em seguida, congeladas individualmente a -20°C em tubos eppendorf, para posterior análise.

Os casulos vazios também foram obtidos na parede das garrafas. Após a eclosão das moscas os casulos eram previamente descolados com auxílio de um pincel embebido em solução fisiológica, lavados para eliminação de possíveis ácaros, secos em papel absorvente, e congelados a -20°C em grupos de 5 ou 10 casulos por tubo eppendorf.



II.3. Tempo de desenvolvimento

A coleta de indivíduos nas diversas fases do desenvolvimento analisadas neste trabalho foi precedida por um estudo do tempo de duração de cada fase do desenvolvimento de *Megaselia scalaris*, realizado em caixas de população, para as linhagens CG e PAR, conforme descrito em Bicudo & Richardson (1978) . Essas caixas são de acrílico, com pés de 3 cm de altura e dimensões de 16x16x16 cm. Apresentam duas aberturas em sua base, nas quais adaptam-se placas de Petri com meio de cultura, para alimentação e ovoposição. Há também uma abertura lateral, para a introdução das moscas, que é fechada com uma rolha contendo um orifício na sua parte central, vedado com algodão para arejamento. As caixas apresentam ainda, na sua parte superior, uma tampa que pode ser removida para limpeza.

No presente trabalho, as caixas de população foram preparadas com 200 casais para as linhagens CG e PAR. Os machos e fêmeas virgens foram mantidos separados até três dias de idade, antes de serem introduzidos nas caixas. Após um período inicial de 24 horas, as placas de petri com meio de fubá-araruta passaram a ser trocadas, várias vezes, em intervalos de duas horas. O desenvolvimento foi acompanhado, nessas placas, através de seis observações diárias com auxílio de lupa. O reconhecimento das fases larvais foi baseado nas trocas de mudas, no tamanho e aspecto do aparelho bucal ou aparecimento de cutícula com espículos laterais, nas larvas de 3º estágio final. A fase de pupa foi acompanhada até o aparecimento dos imagos, transferindo-se as pupas brancas para tubos sem meio. Todas as observações foram realizadas dentro da câmara de temperatura a 25°C.

Assim, foram determinados os seguintes períodos para as várias fases do desenvolvimento de *Megaselia scalaris*, calculados a partir do tempo médio obtido para cada fase, nas duas linhagens:

- Período embrionário: compreendido entre a ovoposição por duas horas e a emergência das primeiras larvas. Corresponde a 20,8 horas.
- L1 (larvas de 1º estágio): apresentam grande movimentação sobre o meio. Nesta fase não são observados os espiráculos, apresenta duração média de 27,7 horas. Para a eletroforese foram coletadas larvas de 1º estágio com aproximadamente 34 horas de desenvolvimento, a partir do período de ovoposição.
- L2 (larvas de 2º estágio): as larvas já sofreram a primeira muda, apresentando também movimentação sobre o meio. No final deste período, que apresenta duração de 37,5 horas, os espiráculos posteriores são visíveis, com uma cor amarelada. Nos experimentos de eletroforese, foram utilizadas amostras de larvas de 2º estágio com aproximadamente 70 horas, a partir da ovoposição.



- L3 (larvas de 3º estágio): Este período do desenvolvimento teve duração de aproximadamente 100 horas, e foi subdividido em duas fases:
- L3a (larvas de 3º estágio inicial): organismos que já sofreram a segunda muda, são muito agéis, encontram-se imersos no meio formando galerias. Apresentam espiráculos posteriores bem amarelados e possuem aproximadamente 130 horas de desenvolvimento.
- L3b (larvas de terceiro estágio tardio): organismos ainda móveis mas não muito agéis, que já saíram do meio e localizam-se nas paredes ou na tampa da placa de Petri. Muitos apresentam a formação de uma cutícula rígida com espículas laterais. Nos experimentos de eletroforese utilizamos larvas de 3º estágio tardio, com aproximadamente 170 horas, a partir do período de ovoposição.
- P (pupas): Período que apresentou a maior dispersão entre os indivíduos, apresentando em média 304,4 horas de duração. Nesta fase do desenvolvimento, devido ao acentuado polimorfismo sexual desta espécie, fizemos uma separação entre pupas grandes e pequenas, as quais geralmente originaram fêmeas e machos, respectivamente. A duração do período de pupas pequenas foi de 281,7 horas e para as pupas grandes de 327,2 horas. Além disso, o período de pupa foi subdividido em duas fases para facilitar o acompanhamento das modificações ao longo do desenvolvimento:
- Pa (pupas amarelas): organismos com aproximadamente 250 horas, imóveis, presos à parede da placa. Apresentam cutícula externa de cor amarela-palha. Foram utilizadas, para análise eletroforética, pupas amarelas grandes e pequenas.
- Pp (pupas pretas): organismos com cerca de 410 horas de cor marrom-escuro, pode-se observar o corpo do imago já formado, através da cutícula que nesta fase é mais transparente. Foram utilizadas, para análise, pupas pretas grandes e pequenas. Nessa fase pode-se, às vezes, confirmar o sexo da mosca pela transparência do casulo.
- Imagos (adultos): abrangendo machos e fêmeas desde recém-eclodidos, apresentando asas fechadas, até aqueles que já atingiram a forma adulta definitiva. Para a análise dos padrões de esterases em adultos foram utilizados organismos com cinco dias de idade.



II.4. Cruzamentos

II.4.1. Cruzamentos em massa

Cruzamentos em massa foram realizados em garrafas de 250 ml, contendo meio de fubá-araruta, para as quatro linhagens estudadas, visando a obtenção de fêmeas e machos, como descrito no item II.2.1. Cruzamentos em massa interlinhagens foram realizados nas mesmas condições experimentais, com o objetivo de se verificar a viabilidade dos mesmos. Esses cruzamentos foram mantidos até a terceira geração e depois descartados. Cruzamentos em massa também foram realizados para as linhagens CG e PAR em caixas de população, para obtenção de larvas em estádios definidos do desenvolvimento, como descrito no item II.3.

II.4.2. Cruzamentos por casal

Cruzamentos por casal, intra e interlinhagens, foram realizados em tubos contendo meio de banana-ágar. Os cruzamentos interlinhagens envolveram machos e fêmeas da linhagem RP cruzados com moscas das demais linhagens. Para maior segurança, todos os cruzamentos por casal foram montados colocando-se num mesmo tubo uma pupa preta grande (fêmea) e uma pequena (macho), já que encontra-se descrito na literatura que as fêmeas desta espécie copulam imediatamente após a eclosão (Mainx, 1964)

Tanto nos intra como nos intercruzamentos a porcentagem de "acerto" foi superior a 70%. Destes, mais de 50% originaram progênie. Os casais e descendentes desses cruzamentos foram congelados ao atingirem cinco dias de vida e, posteriormente, analisados por eletroforese.

II.5. Análise Eletroforética

II.5.1. Preparo dos géis

Para a análise eletroforética foram utilizados géis de poliacrilamida. Este tipo de gel consiste na formação de uma "malha" tridimensional entre o monômero acrilamida e seu co-monômero de ligação cruzada, a N, N' metilenobisacrilamida (BIS), por uma reação de polimerização, auxiliada por



catalisadores. Geralmente são utilizados como catalisadores o persulfato de amônio e o TEMED (N, N, N', N' tetrametilenodiamina).

As soluções estoques e tampões empregados neste trabalho para o preparo dos géis foram adaptadas dos trabalhos de Davis (1964) e Laemmli (1970), sendo as seguintes:

- a. Solução A: (acrilamida/bisacrilamida) preparada com 30 g de acrilamida e 0,8 g de bisacrilamida dissolvidas em água destilada para um volume final de 100 ml. Essa solução foi filtrada em papel de filtro e mantida em frasco escuro na geladeira.
- b. Solução A': (acrilamida/bisacrilamida modificada) preparada com 15g de acrilamida e 0,8 g de bisacrilamida dissolvidas em água destilada para um volume final de 50 ml, com os mesmos requisitos da anterior.
- c. Tampão do gel de separação (4x concentrado): Tris 1,5 M ajustado a pH 8,8 com HCl 6 M. Deve ser mantido em frasco escuro, na geladeira.
- d. Tampão do gel de empilhamento (4x concentrado): Tris 0,5 M ajustado a pH 6,8 com HCl 6M . Mantido em frasco escuro, na geladeira.
- e. Solução de persulfato de amônio a 2%, recém preparada. Alternativamente, esta solução pode ser mantida no freezer e descongelada na hora do uso. O persulfato de amônio em pó deve ser armazenado em dessecador para evitar a sua hidratação.
- f. TEMED (N, N, N, N, tetrametilenodiamina) com aproximadamente 99% de pureza, deve ser o último componente adicionado à solução, dando início à polimerização.

Neste trabalho foram utilizados géis, com 1 mm de espessura, polimerizados em placas de vidro, num sistema descontínuo de pH e tampões. O gel de separação, a 10% de concentração, foi preparado em tampão Tris-HCl 0,37 M, pH 8,8. As placas foram mantidas na posição vertical, ao abrigo da luz, por 30 minutos, para formação do gel. Sobre este gel confeccionava-se o gel de empilhamento a 4% de concentração, em tampão Tris-HCl 0,125M, pH6,8. Neste último, adaptou-se um pente de acrílico com 15 ou 20 dentes, para a formação dos poços de aplicação das amostras. Após 30 minutos para a polimerização, o pente e o espaçador inferior eram retirados e as placas adaptadas a uma cuba vertical de acrílico, com auxílio de quatro garras. O modelo da cuba de eletroforese 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).



II.5.2 Preparo das amostras e Condições da Eletroforese

As amostras (larvas, pupas, casulos ou moscas adultas) foram maceradas a 0°C, em tampão de amostra (Tris-HCl 0,1 M, pH 6,8, contendo glicerol a 10% e azul de bromofenol 0,001%), com auxílio de um bastão de vidro e, em seguida, centrifugadas a 1000 x g, por 3 minutos. Amostras de larvas de 1° e de 2° estágio foram maceradas em volumes que variaram de 50 a 100 µl do tampão acima, para obter-se uma concentração de proteína de aproximadamente 150µg. As amostras de larvas de 3° estágio, pupas e de moscas adultas foram maceradas individualmente em 25µl a 40µl do tampão para a obtenção da mesma concentração de proteínas. Para os casulos as amostras foram preparadas com 5 ou 10 casulos vazios, que eram macerados em 25 ou 50µl. Em alguns experimentos, os casulos foram macerados no tampão de amostra, contendo Triton X-100 a 1% ou desoxicolato de sódio a 0,1%. Volumes de 10 µl do sobrenadante de cada amostra eram aplicados no gel.

Após a aplicação das amostras, os géis foram submetidos à eletroforese por 3 horas, a uma voltagem constante de 200V a temperatura ambiente, utilizando-se para o preenchimento dos compartimentos superior e inferior da cuba, um tampão Tris-glicina 0,1M, pH 8,3.

II.6. Tratamento dos Géis para a Identificação das Esterases

A identificação da 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). Após a eletroforese, os géis foram pré-encubados por 60 minutos, à temperatura ambiente, em 50 ml de tampão fosfato 0,1 M, pH 6,2. Em seguida, procedia-se à reação de coloração por mais 60 minutos com uma solução recém-preparada e filtrada, contendo 15 mg de beta-naftil acetato, 20 mg de alfa-naftil acetato, 60 mg de Fast Blue RR Salt e 5 ml de n-propanol, dissolvidos em 50 ml de tampão fosfato 0,1M, pH 6,2. As atividades da alfa e beta esterases foram visualizadas nos géis como bandas de coloração pretas ou vermelhas, indicando a hidrólise preferencial do alfa ou do beta naftil acetato, respectivamente. Em alguns experimentos o α e o β -naftil acetato foram substituídos por α e o β -naftil butirato, mantendo-se as demais condições.

Após a coloração, os géis foram tratados com 100 ml de uma solução de descoloração contendo ácido acético, álcool etílico comercial e água na



proporção de 1:2:7, por 24 horas. Os géis foram então conservados em uma solução de ácido acético a 7,5% e glicerol a 10%, até o momento da secagem.

II.7. Teste com Inibidores

Nestes testes foram utilizados os seguintes compostos: sulfato de eserina, prostigmina, malathion, fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF= phenylmethyl sulfonyl fluoride), sulfato de cobre, e p-cloromercuribenzoato (PCMB). As amostras foram maceradas em 40 µl de tampão de amostra e um volume de 8µl de cada amostra, aplicado em quatro géis. Esses géis continham, portanto, as mesmas amostras que foram tratadas com diferentes inibidores, após a eletroforese. A adição dos inibidores, com exceção do sulfato de cobre e do p-cloromercuribenzoato, foi feita durante a pré-incubação e na solução de coloração. Um dos géis foi pré-incubado e corado seguindo-se o procedimento normal, sem qualquer inibidor (controle).

Os experimentos com sulfato de cobre e com o p-mercuribenzoato foram realizados com a adição destes compostos, já na preparação das amostras, e depois na pré-incubação e coloração dos géis. A concentração final do p-mercuribenzoato utilizada foi de 0,1 mM e para o sulfato de cobre, 0,75 mM. O PMSF foi utilizado na concentração de 1 mM, sendo previamente diluído em 1 ml de metanol. Eserina e prostigmina nas concentrações de 1 mM foram dissolvidas diretamente na solução de pré-incubação e na solução corante. O malathion, na concentração de 0,7 mM, foi pré-diluído em 1 ml de acetona e, em seguida, adicionado ao tampão de pré incubação e solução coloração.

II.8. Secagem dos géis

A secagem dos géis foi baseada no método de Ceron *et al.* (1992). Os géis foram retirados da solução conservante e, em seguida, banhados em uma solução de gelatina comercial a 5%, prensados em um bastidor entre duas folhas de papel celofane e deixados a 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 então podem ser recortadas e guardadas para futuras análises.



II.9. Dosagem de proteínas

As dosagens de proteínas foram realizadas segundo o método de Lowry *et al.* (1951), utilizando-se a albumina sérica bovina (fração IV da Sigma) como padrão. As medidas de absorbância foram realizadas a 660 nm, num espectrofotômetro UV-VIS, mod B342 da Micronal.

II.10. Análise estatística

Foram aplicados o teste t de Student para comparação entre médias e o χ^2 para a homogeneidade.



III. RESULTADOS

III. 1. Dados sobre a biologia de *Megaselia scalaris*

A Figura 1 e a Tabela 2 mostram a duração média, em horas, das fases de ovo, larvas (primeiro, segundo e terceiro estádios) e pupas que originaram machos e fêmeas nas linhagens CG e PAR de *Megaselia scalaris*. A Tabela 2 também apresenta as diferenças de duração, em horas, de cada fase do desenvolvimento, entre essas linhagens. Pode-se observar que o período de pupa foi o mais longo e o que apresentou maior variação interlinhagens. Além disso, a duração deste período é menor nas pupas que darão origem a machos do que naquelas que originarão as fêmeas, resultando na diferença no tempo de desenvolvimento entre os dois sexos, conforme indicado na Figura 1.

O tempo de desenvolvimento médio dos imagos machos da linhagem CG foi de 18,8 dias, enquanto nas fêmeas foi de 21,7 dias. Na linhagem PAR, o período ovo-imago foi, em média, de 19,5 dias para machos e 21,4 dias para fêmeas. Deve ser observado que, embora houvesse uma tentativa de sincronização do período de ovoposição (2 horas), ocorreu uma acentuada dispersão individual na duração das fases, principalmente entre as pupas, o que resultou numa variação no período ovo-imago de aproximadamente dois dias, comparando-se os machos entre si. O mesmo ocorreu com as fêmeas de ambas as linhagens.

Além da observação das várias etapas do desenvolvimento das linhagens CG e PAR de *Megaselia scalaris*, amostras de larvas de 1º, 2º e 3º estádios (L1, L2, L3), pupas amarelas (PA), pupas pretas fêmeas (PPF), pupas pretas machos (PPM), fêmeas (F) e machos (M), foram coletadas e utilizadas para a dosagem de proteínas. Para L1 e L2, foram coletadas três amostras independentes, contendo 100 e 40 larvas respectivamente. Para as demais fases, utilizamos seis amostras individuais, todas as amostras foram maceradas e centrifugadas sendo duas repetições do sobrenadante utilizadas para as dosagens. Os resultados obtidos estão sumarizados na Tabela 3. Pode ser observado que a fase de larva de 3º estágio foi a que apresentou o maior conteúdo de proteínas, em ambas as linhagens. Esses dados mostram ainda que o conteúdo em proteínas solúveis das fêmeas de *Megaselia scalaris* é cerca de 2,5 vezes maior do que o observado para machos. Esses resultados foram importantes para assegurar que nos experimentos de análise das esterases de *Megaselia scalaris*, envolvendo várias fases do desenvolvimento, aproximadamente a mesma quantidade de proteína dos sobrenadantes das diferentes amostras analisadas, fosse aplicada no gel ($\pm 150 \mu\text{g}$ de proteína/amostra).



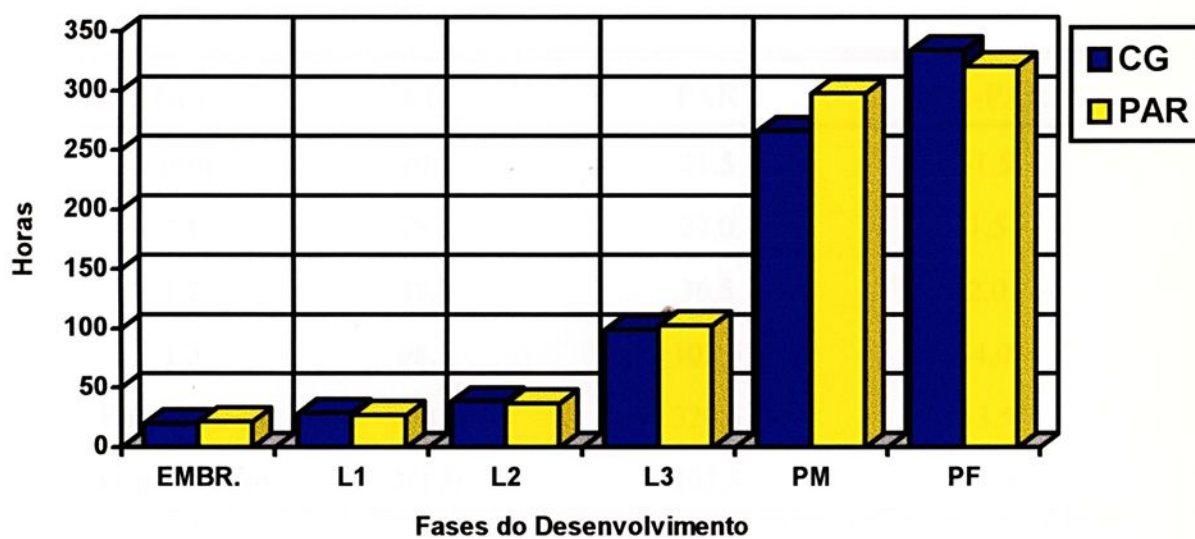


Figura 1. Duração média (em horas) da fase embrionária (EMBR), de larvas (de primeiro, segundo e terceiro estádios (L1, L2, L3) e de pupas que originaram machos (PM) ou fêmeas (PF) das linhagens CG e PAR de *Megaselia scalaris*.

Tabela 2. Duração média (em horas) das fases do período embrionário, larvas 1°, 2° e 3° estádios (L1, L2, L3) e pupas (machos e fêmeas) das linhagens CG e PAR de *Megaselia scalaris*.

Fase	CG	PAR	CG-PAR
Embr.	20,0	21,5	-1,5
L1	28,5	27,0	1,5
L2	38,5	36,5	2,0
L3	98,5	102,5	-4,0
Pupa Fêmea	334,0	320,5	13,5
Pupa Macho	266,0	297,5	-35,1

Tabela 3. Quantidade de proteína ($\mu\text{g}/\text{indivíduo}$), observada em larvas de 1º, 2º e 3º estádios (L1, L2, L3), pupas amarelas (PA), pupas pretas fêmeas e machos (PPF, PPM), e em fêmeas (F) e machos (M), das linhagens CG e PAR de *Megaselia scalaris*.

Fases	Linhagens/[Proteína]	
	CG	PAR
L1	$4,28 \pm 0,13$	$3,56 \pm 0,987$
L2	$10,0 \pm 0,466$	$10,78 \pm 1,119$
L3	$546,97 \pm 89,09$	$482,44 \pm 86,45$
PA	$450,57 \pm 39,87$	$246,32 \pm 42,27$
PPF	$301,06 \pm 32,68$	$245,51 \pm 40,61$
PPM	$159,72 \pm 27,79$	$96,00 \pm 26,51$
F	$255,72 \pm 78,26$	$223,83 \pm 87,87$
M	$87,01 \pm 6,15$	$96,41 \pm 13,21$

III.2. Padrão de Esterases nos Adultos

O padrão de esterases nos adultos de *Megaselia scalaris* foi obtido analisando-se 130 indivíduos, 65 machos e 65 fêmeas, com cinco dias de idade, das linhagens CG, CP, RP e PAR, num total de 520 indivíduos. As fêmeas da linhagem CG apresentaram um total de 33 bandas. Já nas linhagens CP, RP e PAR, esses números corresponderam a 32, 35 e 36 respectivamente. Para os machos observou-se um total de 28 e 29 bandas para as linhagens CG e CP e, 34 bandas para as demais. Nas Figuras 2 e 3 são apresentados, de forma esquemática, os zimogramas de todos os padrões de esterases observados nas fêmeas e nos machos. Nessas figuras levamos em conta todas as bandas existentes nos 65 indivíduos analisados para cada linhagem, dos dois sexos, numerando-as consecutivamente a partir da banda de migração mais rápida.

Nos zimogramas (Figuras 2 e 3), a coluna central corresponde ao padrão mais freqüente de bandas, representado na linhagem CG por uma seta. Uma comparação entre os padrões gerais de cada linhagem, revela que a banda número 1 não foi detectada nas linhagens CP e PAR, tanto em machos como em fêmeas. A banda número 3 foi detectada nas fêmeas da linhagem CG e em fêmeas e machos da linhagem PAR. A banda 6 não foi observada nos machos da linhagem PAR. Já a banda 9 somente foi encontrada nas linhagens CP e RP em ambos os sexos, ao passo que a banda 10 esteve ausente apenas nas fêmeas da linhagem PAR. A banda de número 12 não foi detectada nos machos da linhagem CG, enquanto a banda 13 só apareceu nos machos e fêmeas da linhagem RP. Já a banda 14 foi observada nos machos e fêmeas da linhagem RP e também nos machos da linhagem PAR. A banda 16 esteve ausente apenas nos machos da linhagem PAR, enquanto a banda 17, ocorreu somente em fêmeas da linhagem RP. A banda 19 somente foi detectada em fêmeas, estando presente em todas as linhagens. A banda de número 22, só foi observada na linhagem PAR, em ambos os sexos. A de número 24 foi observada em machos das linhagens RP e PAR e, nas fêmeas da linhagem PAR. A banda 26 apareceu nos machos CG, RP e PAR e nas fêmeas da linhagem PAR. Já a banda 29 somente não foi detectada em machos RP, enquanto que, a banda 30 só apareceu em fêmeas da linhagem PAR. A banda 33 ocorreu nas fêmeas das linhagens CG e CP e, nos machos da linhagem CG. Por outro lado a banda 36, está ausente nos machos e fêmeas da linhagem CG, enquanto a 37 só esteve presente nos machos da linhagem PAR. A presença da banda 40 e 43 só foi registrada em fêmeas e machos da linhagem PAR. A banda de número 44 não foi detectada em machos da linhagem CG. A 45, presente nas fêmeas das quatro linhagens, foi também observada nos machos da linhagem RP.



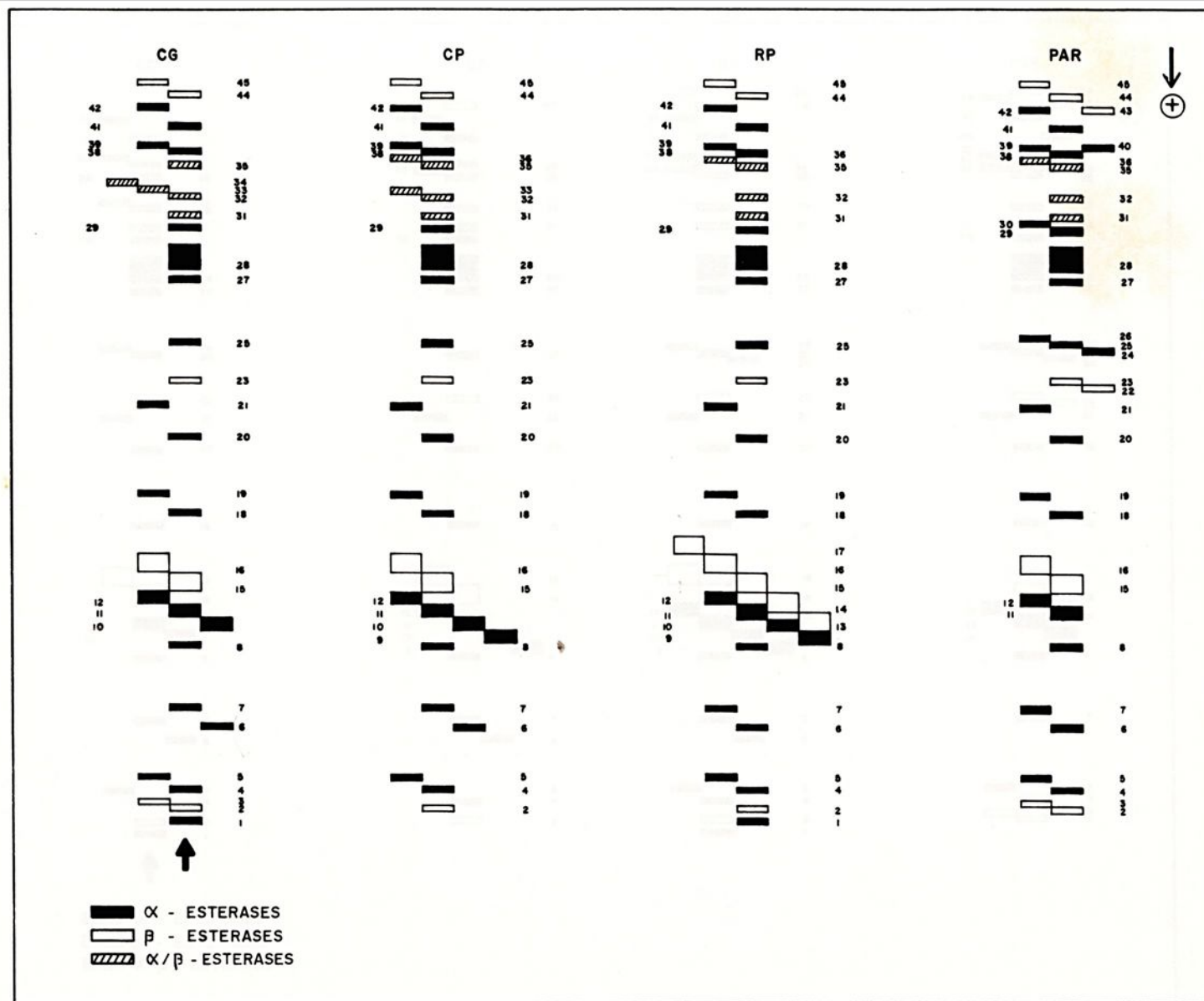


FIGURA 2 . Zimograma representativo das bandas com atividade esterásica em fêmeas com cinco dias de idade, das linhagens CG, CP, RP e PAR de Megascelia scalaris.

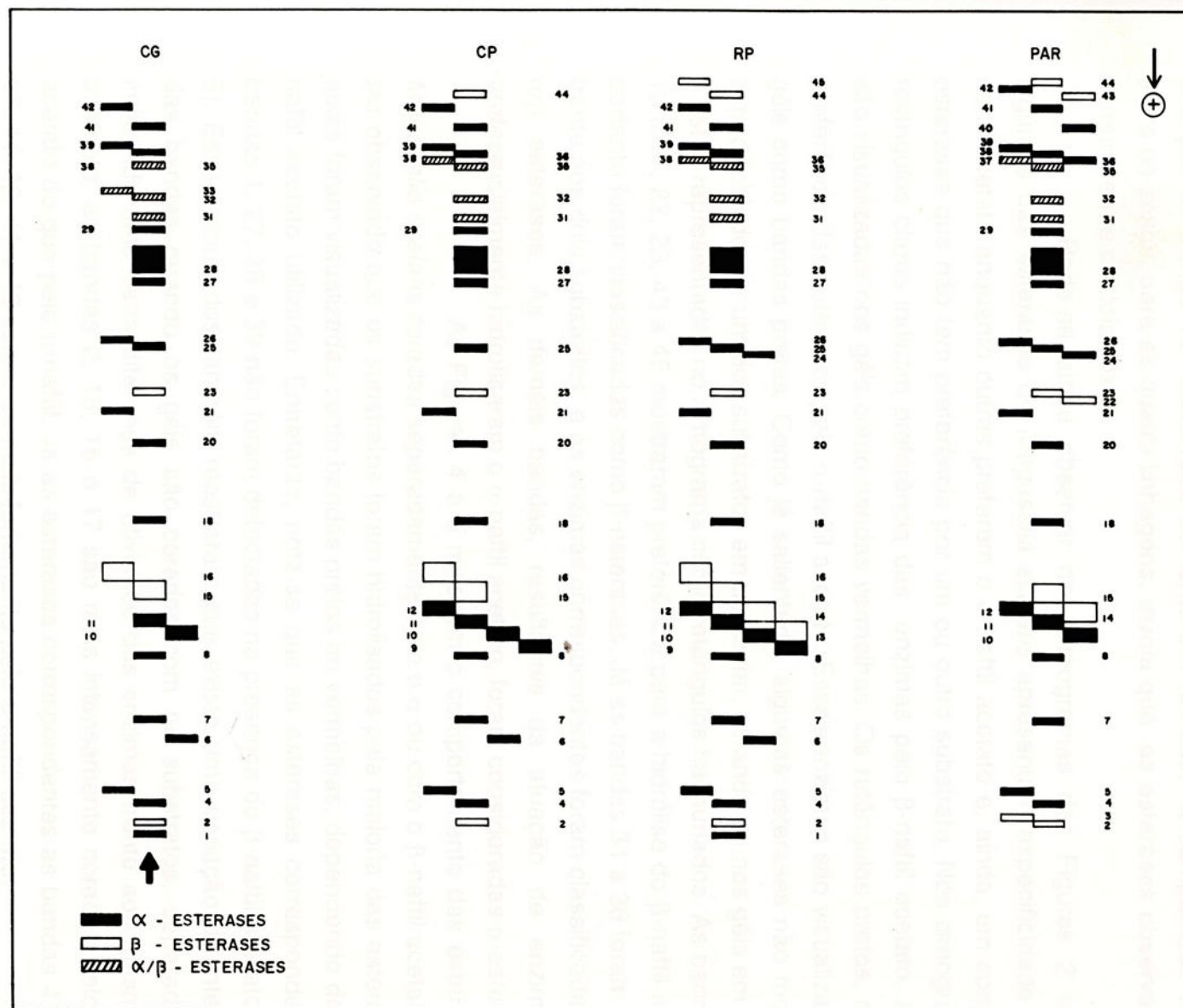


FIGURA 3. Zimograma representativo das bandas com atividade esterásica em machos com cinco dias de idade, das linhagens CG, CP, RP e PAR de *Megascelia scalaris*.

No conjunto as bandas 2, 4, 5, 7, 8, 11, 15, 18, 20, 21, 23, 25, 27, 28, 31, 32, 35, 38, 39, 41, e 42 foram comuns a todas as linhagens e a ambos os sexos. Com exceção da banda 19 observada somente em fêmeas, a comparação realizada entre os sexos, para as quatro linhagens, revela que as esterases observadas são comuns entre os dois sexos.

Pode-se ainda observar nos zimogramas das Figuras 2 e 3 que algumas das esterases de *Megaselia scalaris* apresentam especificidade pelo β -naftil acetato enquanto outras preferem o α -naftil acetato e, ainda, um conjunto de esterases que não tem preferência por um ou outro substrato. Nos zimogramas os retângulos claros indicam preferência das enzimas pelo β -naftil acetato, as quais são visualizadas nos géis como bandas vermelhas. Os retângulos pretos, denotam preferência das esterases pelo α -naftil acetato. Essas enzimas são visualizadas nos géis como bandas pretas. Como já salientado, algumas esterases não mostraram especificidade por um dos substratos em particular, corando-se nos géis em marrom e estão representadas no zimograma como retângulos hachuriados. As bandas 2, 3, 13 a 17, 22, 23, 43 a 45 mostraram preferência para a hidrólise do β -naftil acetato, e portanto foram classificadas como β -esterases. Já as bandas 31 a 36 foram coradas frente aos dois substratos, e as enzimas correspondentes foram classificadas como α/β esterases. As demais bandas, resultantes da atuação de enzimas que preferencialmente hidrolisaram o α -naftil acetato, foram consideradas α -esterases.

As Figuras 4 e 5 mostram o comportamento das esterases de *Megaselia scalaris* coradas separadamente com o α ou com o β -naftil acetato. Pode ser observado que os substratos foram hidrolisados pela maioria das esterases, as quais foram visualizadas como bandas pretas ou vermelhas, dependendo do tipo do naftil acetato utilizado. Entretanto, nota-se que as esterases correspondentes às bandas 1, 27, 38 e 39 não foram detectadas na presença do β -naftil acetato (Figura 5). Esses resultados também mostraram que existe uma variação de intensidade das bandas quando os géis são corados com os substratos, separadamente, indicando uma certa diferença de atividade das enzimas frente aos mesmos. Por exemplo, as bandas 2, 15, 16 e 17 são mais intensamente coradas pelo β -naftil acetato do que pelo α -naftil. Já as esterases correspondentes as bandas 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 41 e 42 coram-se mais fortemente pelo α -naftil acetato.

Os resultados apresentados nas Figuras 6 e 7 mostram a atividade das esterases de *Megaselia scalaris* utilizando-se o α e o β -naftil butiratos, em comparação com o α e o β -naftil acetatos. Os experimentos foram realizados nas mesmas condições, sendo que as mesmas amostras, de cada linhagem, foram submetidas à coloração com os diferentes substratos na concentração de 20mg/100ml de tampão de coloração. A esterase referente à banda 8 foi a única



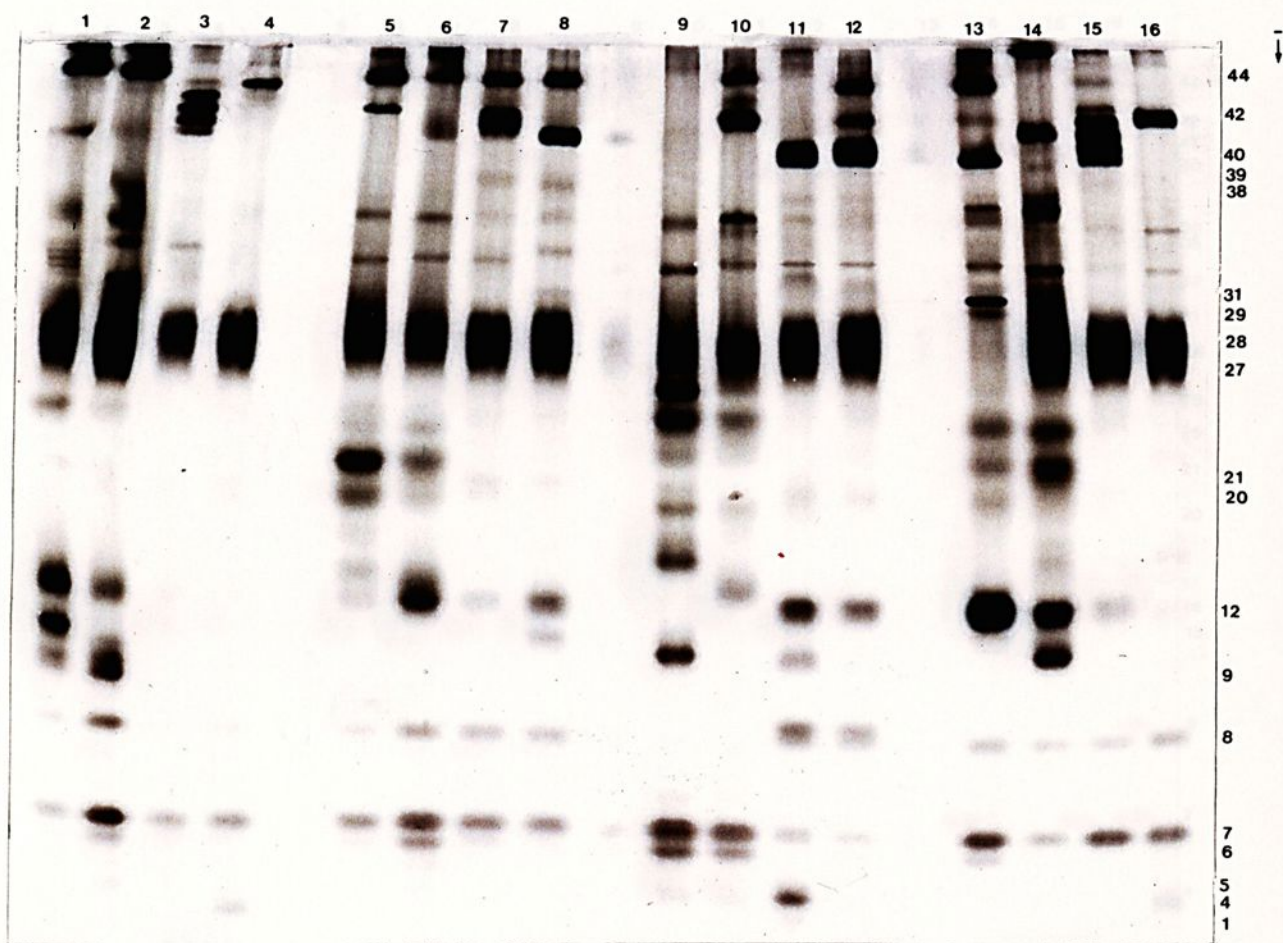


Figura 4. Esterases em fêmeas e machos com cinco dias de idade, das linhagens CG(1-4), CP(5-8), RP(9-12) e PAR (13-16) de *Megaselia scalaris*, em gel submetido à coloração com α -naftil acetato.

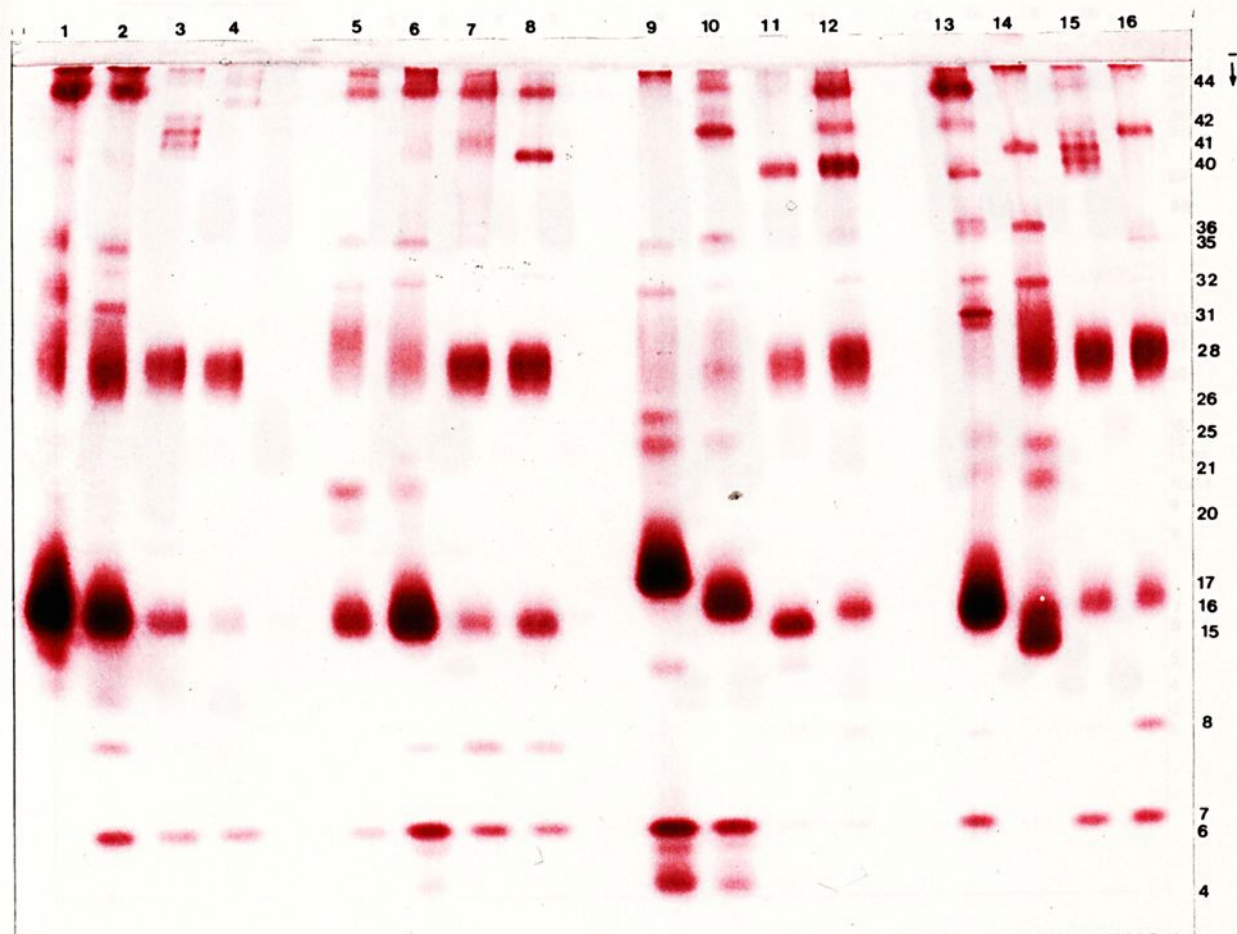


Figura 5. Esterases em fêmeas e machos com cinco dias de idade, das linhagens

Figura 5. Esterases em fêmeas e machos com cinco dias de idade, das linhagens CG(1-4), CP(5-8), RP(9-12) e PAR (13-15) de *Megaselia scalaris*, em gel submetido à coloração com o β -naftil acetato.

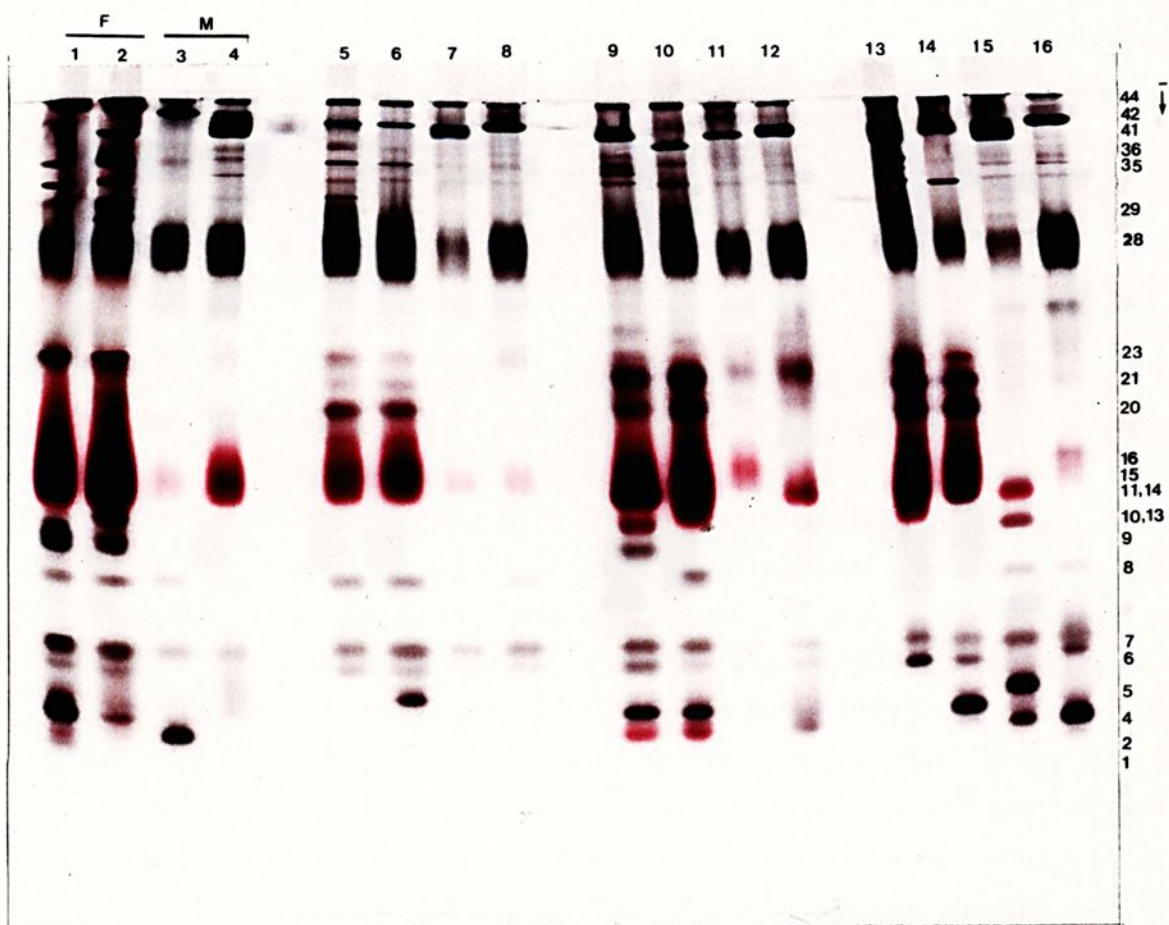


Figura 6. Esterases em fêmeas e machos com cinco dias de idade, das linhagens CG(1-4), CP(5-8), RP(9-12) e PAR (13-16) de *Megaselia scalaris*, em gel submetido à coloração com α e β -naftil acetato.

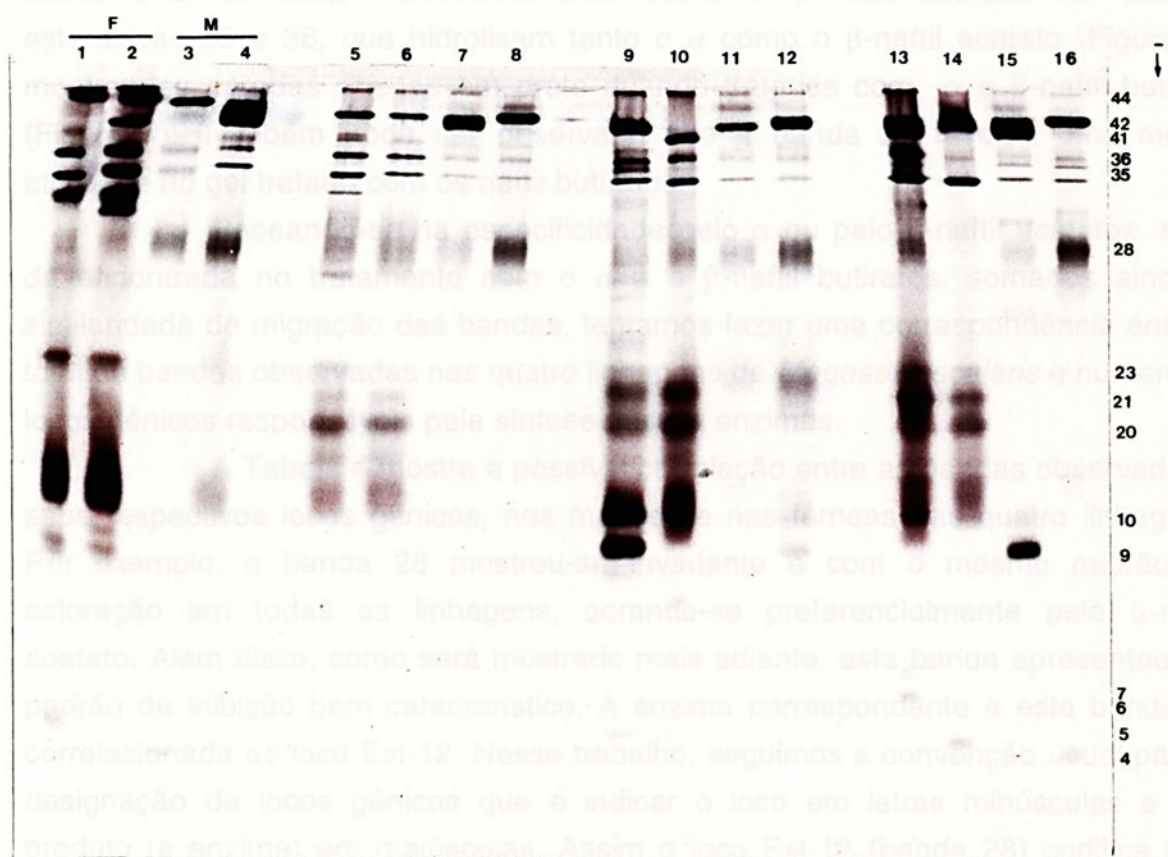


Figura 7. Esterases em fêmeas e machos com cinco dias de idade, das linhagens CG(1-4), CP(5-8), RP(9-12) e PAR (13-16) de *Megaselia scalaris*, em gel submetido à coloração com α -naftil butirato.

enzima que mostrou atividade específica ao α -naftil acetato, não se corando no gel tratado com butirato. Além disso, observa-se, que as enzimas representadas pelas bandas 1, 4, 5, 6, 7 e 28 que são consideradas como α -esterases em géis corados com naftil acetato, mostram uma fraca atividade quando o substrato foi o α -naftil butirato indicando preferência pelo éster de cadeia mais curta. As bandas 2, 13 a 16, e 23 correspondem às esterases que hidrolisam o β -naftil acetato, corando-se em vermelho, não aparecem em géis tratados com o naftil butirato, mostrando que essas enzimas atuam exclusivamente sobre o β naftil-acetato. As bandas esterásicas 35 e 36, que hidrolisam tanto o α como o β -naftil acetato (Figura 6), mostram-se coradas apenas em preto quando tratadas com α e β -naftil butirato (Figura 7). Também pode ser observado que a banda 28 revelou uma menor atividade no gel tratado com os naftil butiratos.

Baseando-se na especificidade pelo α ou pelo β -naftil acetatos, além da encontrada no tratamento com o α e o β -naftil butiratos, somados ainda à similaridade de migração das bandas, tentamos fazer uma correspondência entre o total de bandas observadas nas quatro linhagens de *Megaselia scalaris* e número de locos gênicos responsáveis pela síntese dessas enzimas.

A Tabela 4 mostra a possível correlação entre as bandas observadas e seus respectivos locos gênicos, nos machos e nas fêmeas das quatro linhagens. Por exemplo, a banda 28 mostrou-se invariante e com o mesmo padrão de coloração em todas as linhagens, corando-se preferencialmente pelo α -naftil acetato. Além disso, como será mostrado mais adiante, esta banda apresentou um padrão de inibição bem característico. A enzima correspondente a esta banda foi correlacionada ao loco Est-12. Nesse trabalho, seguimos a convenção usual para a designação de locos gênicos que é indicar o loco em letras minúsculas e seu produto (a enzima) em maiúsculas. Assim o loco Est-12 (banda 28) codifica uma esterase denominada EST-12. Outros locos, indicados na Tabela 4, foram relacionados a várias bandas. Por exemplo, para o loco Est-5 relacionamos as bandas de números 9 a 12, mostrando que vários locos esterásicos em *Megaselia scalaris* são polimórficos, o que será detalhado mais adiante.

As Figuras 8 e 9 mostram o padrão de bandas para esterases nas fêmeas e nos machos das quatro linhagens de *Megaselia scalaris*, supondo-se que essas enzimas sejam codificadas pelos locos gênicos propostos neste trabalho.

Nota-se que as EST-1A, EST-6, EST-9 e EST-19 hidrolisaram preferencialmente o β -naftil acetato, sendo visualizadas no géis como bandas de coloração vermelha. As esterases-1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 17, 18 hidrolizaram preferencialmente o α -naftil acetato, mostrando-se coradas em preto. Já as EST-14, 15 e 16 apresentaram um comportamento duplo frente a esses



Tabela 4. Correlação entre os locos e o número das bandas esterásicas encontradas em machos e fêmeas das linhagens CG, CP, RP e PAR de *Megaselia scalaris*, em géis submetidos a coloração com α e β naftil acetato.

		LINHAGENS/No. DAS BANDAS							
Locos	Especific.	CG		CP		RP		PAR	
		M	F	M	F	M	F	M	F
Est - 1	α	1	1	-	-	1	1	-	-
Est - 1A	β	2	2 e 3	2	2	2	2	2 e 3	2 e 3
Est - 2	α	4 e 5	4 e 5	4 e 5	4 e 5	4 e 5	4 e 5	4 e 5	4 e 5
Est - 3	α	6 e 7	6 e 7	6 e 7	6 e 7	6 e 7	6 e 7	7	6 e 7
Est - 4	α	8	8	8	8	8	8	8	8
Est - 5	α	10 e 11	10 a 12	9 a 12	9 a 12	9 a 12	9 a 12	10 a 12	10 e 11
Est - 6	β	15 e 16	15 e 16	15 e 16	15 e 16	13 a 16	13 a 17	14 e 15	15 e 16
Est - 7	α	18	18 e 19	18	18 e 19	18	18 e 19	18	18 e 19
Est - 8	α	20 e 21	20 e 21	20 e 21	20 e 21	20 e 21	20 e 21	20 e 21	20 e 21
Est - 9	β	23	23	23	23	23	23	22 e 23	22 e 23
Est - 10	α	25 e 26	25	25	25	24 a 26	25	24 a 26	24 a 26
Est - 11	α	27	27	27	27	27	27	27	27
Est - 12	α	28	28	28	28	28	28	28	28
Est - 13	α	29	29	29	29	-	29	29	29 e 30
Est - 14	α/β	31	31	31	31	31	31	31	31
Est - 15	α/β	32 e 33	32 a 34	32	32 e 33	32	32	32	32
Est - 16	α/β	35	35	35 e 36	35 e 36	35 e 36	35 e 36	35 e 36	35 e 36
Est - 17	α	38 e 39	38 e 39	38 e 39	38 e 39	38 e 39	38 e 39	37 a 39	38 e 39
Est - 18	α	41 e 42	41 e 42	41 e 42	41 e 42	41 e 42	41 e 42	40 a 42	40 a 42
Est - 19	β	-	44 e 45	44	44 e 45	44 e 45	44 e 45	43 e 44	43 a 45

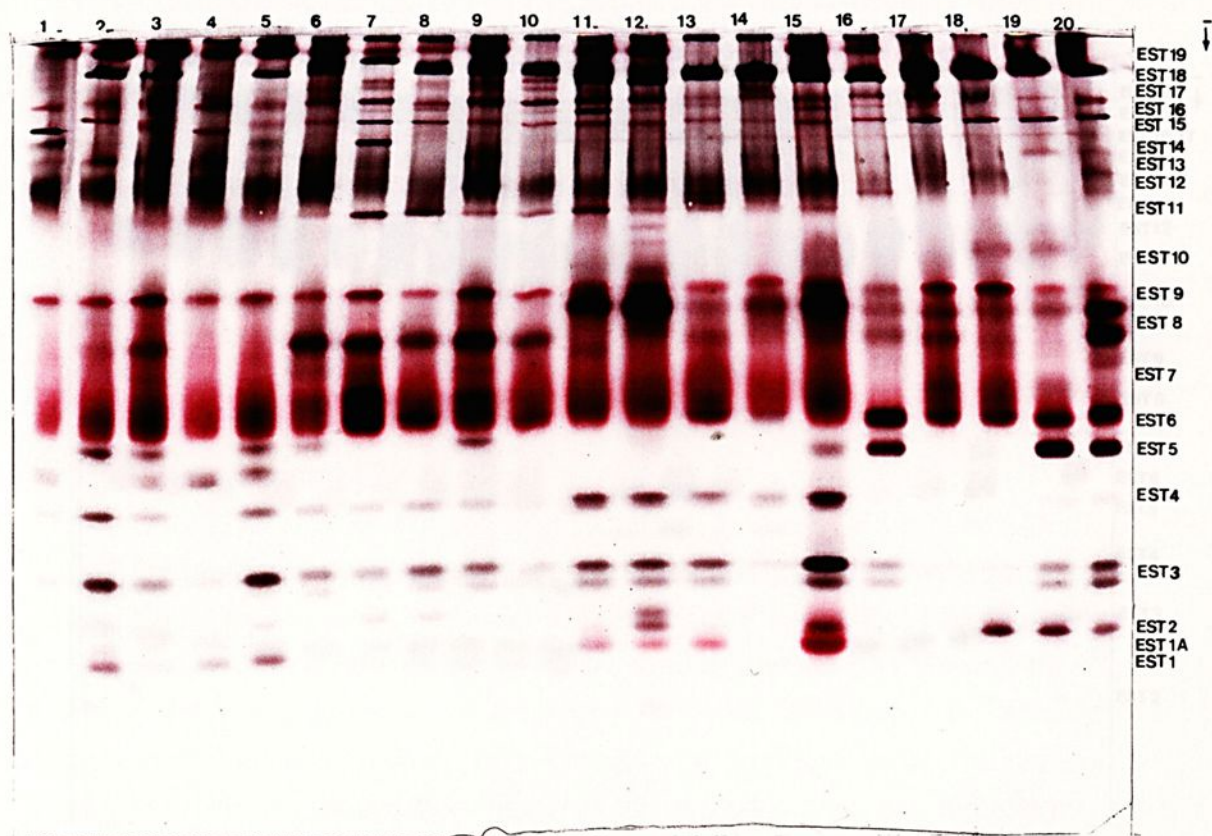


Figura 8. Padrão de esterases e respectivos locos em fêmeas, com cinco dias de idade das linhagens CG (1 a 5), CP (6 a 10), RP (11 a 15) e PAR (16 a 20) de *Megaselia scalaris*, em gel submetido à coloração com α e β naftil acetato.

substratos, aparecendo nos géis com uma tonalidade marrom. Pode-se observar que as esterases EST-5, EST-12 e a EST-18 possuem diferenças no nível de atividade em cada sexo. As esterases codificadas pelo loco Est-5 apresentaram uma atividade marcante nas fêmeas, enquanto a EST-12 mostraram-se mais ativas nos machos (Figuras 8 e 9).

As Tabelas 5, 6, 7, e 8 mostram a porcentagem de ocorrência, frequências alélicas e a porcentagem de heterozigotos para os locos gênicos que codificam as esterases, detectados em machos e fêmeas das linhagens CG, CP, RP e PAR. Foi atribuída a designação 1,0 para o alelo que codifica a banda mais frequente em

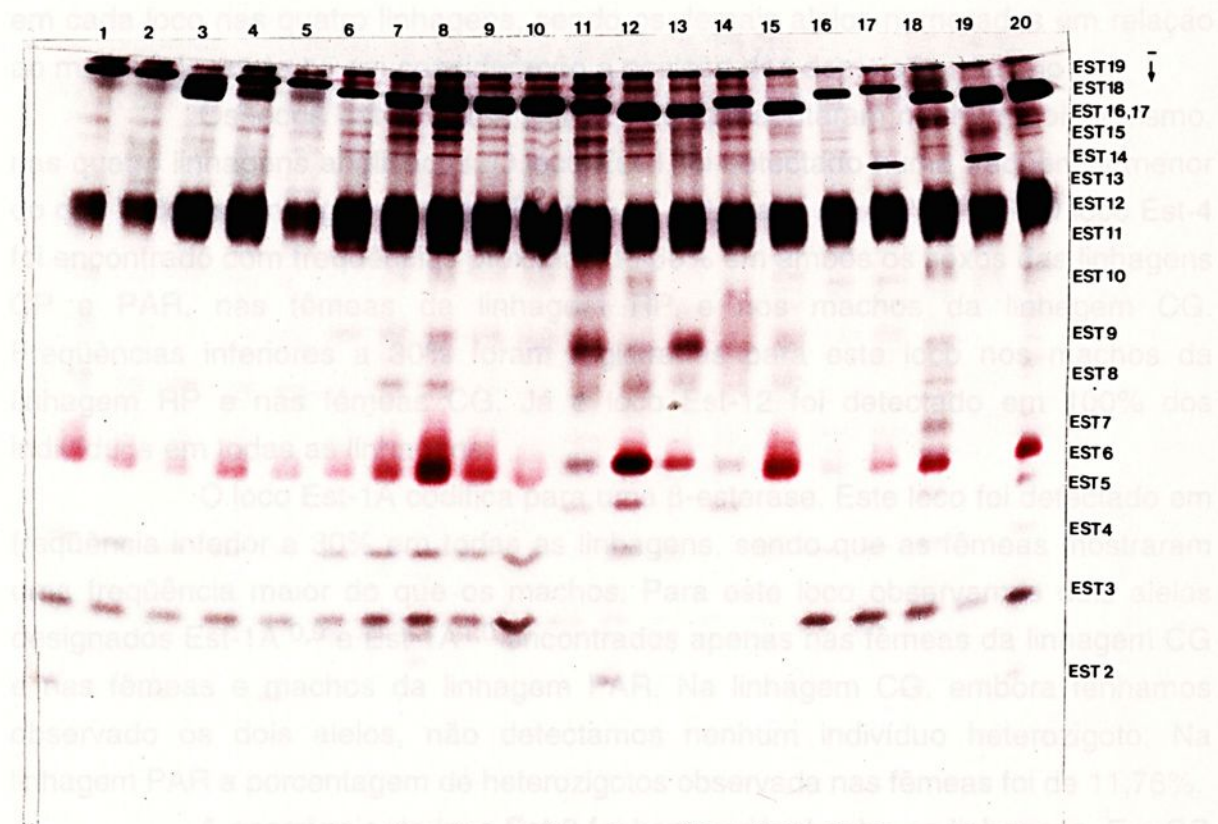


Figura 9. Padrão de esterases e respectivos locos em machos, com cinco dias de idade, das linhagens CG (1 a 5), CP (6 a 10), RP (11 a 15) e PAR (16 a 20), de *Megaselia scalaris*, em gel submetido à coloração com α e β naftil acetato.

A ocorrência do loco Est-2 foi bem semelhante entre as linhagens. Em CG em 5,33% dos machos e 34% das fêmeas. Detectamos para este loco dois alelos em todas as linhagens. Est-2^{1,0} e Est-2^{0,0}. O alelo Est-2^{1,0} foi encontrado em frequências iguais ou superiores a 50% em todas as linhagens, exceto para os machos CP onde predominou o alelo Est-2^{0,0} numa frequência de 70%. Não foram encontrados heterozigotos nos machos PAR e machos e fêmeas CG. Em RP e CP a porcentagem de heterozigotos ficou abaixo de 20%.

O loco Est-3 foi detectado em elevada proporção em indivíduos dos dois sexos de todas as linhagens exceto para os machos da linhagem PAR onde a

substratos, aparecendo nos géis com uma tonalidade marrom. Pode-se observar que as esterases EST-6, EST-12 e a EST-18 possuem diferenças no nível de atividade em cada sexo. As esterases codificadas pelo loco Est-6 apresentaram uma atividade marcante nas fêmeas, enquanto a EST-12 mostraram-se mais ativas nos machos (Figuras 8 e 9).

As Tabelas 5, 6, 7, e 8 mostram a porcentagem de ocorrência, freqüências alélicas e a porcentagem de heterozigotos para os locos gênicos que codificam as esterases, detectados em machos e fêmeas das linhagens CG, CP, RP e PAR. Foi atribuída a designação 1,0 para o alelo que codifica a banda mais freqüente em cada loco nas quatro linhagens, sendo os demais alelos numerados em relação ao mesmo, levando-se em consideração a posição das demais bandas no gel.

Os locos Est-1, Est-4, Est-12 não apresentaram nenhum polimorfismo, nas quatro linhagens analisadas. O loco Est-1 foi detectado numa freqüência menor do que 20% nas linhagens CG e RP e não foi detectado em CP e PAR. O loco Est-4 foi encontrado com freqüências próximas de 50% em ambos os sexos das linhagens CP e PAR, nas fêmeas da linhagem RP e nos machos da linhagem CG. Freqüências inferiores a 30% foram registradas para este loco nos machos da linhagem RP e nas fêmeas CG. Já o loco Est-12 foi detectado em 100% dos indivíduos em todas as linhagens.

O loco Est-1A codifica para uma β -esterase. Este loco foi detectado em freqüência inferior a 30% em todas as linhagens, sendo que as fêmeas mostraram uma freqüência maior do que os machos. Para este loco observamos dois alelos designados Est-1A^{0,9} e Est-1A^{1,0} encontrados apenas nas fêmeas da linhagem CG e nas fêmeas e machos da linhagem PAR. Na linhagem CG, embora tenhamos observado os dois alelos, não detectamos nenhum indivíduo heterozigoto. Na linhagem PAR a porcentagem de heterozigotos observada nas fêmeas foi de 11,76%.

A ocorrência do loco Est-2 foi bem variável entre as linhagens. Em CG ela foi de 49% nos machos e de 27% nas fêmeas. Em CP este loco foi detectado em 52% dos machos e 41% das fêmeas. Em RP sua freqüência foi a mais baixa, cerca de 14% nos machos e 28% nas fêmeas. Para a linhagem PAR, este loco foi observado em 32% dos machos e 34% das fêmeas. Detectamos para este loco dois alelos em todas as linhagens, Est-2^{1,0} e Est-2^{0,9}. O alelo Est-2^{1,0} foi encontrado em freqüências iguais ou superiores a 50% em todas as linhagens, exceto para os machos CP onde predominou o alelo Est-2^{0,9} numa freqüência de 70%. Não foram encontrados heterozigotos nos machos PAR e machos e fêmeas CG. Em RP e CP a porcentagem de heterozigotos ficou abaixo de 20%.

O loco Est-3 foi detectado em elevada proporção em indivíduos dos dois sexos de todas as linhagens exceto, para os machos da linhagem PAR onde a



Tabela 5. Porcentagem de ocorrência, frequência de alelos e porcentagem de heterozigotos em machos e fêmeas da linhagem **CG** *Megaselia scalaris*.

Esterases	MACHOS							FÊMEAS						
	% de	Alelos (bandas)					% de	% de	Alelos (bandas)					% de
	Ocorr.	0,8	0,9	1,0	1,1	1,2	Heter.	Ocorr.	0,8	0,9	1,0	1,1	1,2	Heter.
EST-1	26,15			1,0				15,38			1,0			
EST-1A	4,62			1,0				27,69		0,083	0,834			
EST-2	49,23		0,313	0,687				27,69		0,333	0,667			
EST-3	84,62			0,909	0,091		18,18	72,31			0,809	0,191		38,29
EST-4	50,77			1,0				24,62			1,0			
EST-5	78,46			0,225	0,775		33,33	84,62		0,018	0,509	0,473		36,36
EST-6	61,54		0,488	0,512			32,50	92,31		0,517	0,483			50,0
EST-7	6,15			1,0				6,15		0,25	0,75			40,0
EST-8	69,23		0,189	0,811			37,77	23,08		0,467	0,533			4,0
EST-9	100,0			1,0				100,0			1,0			
EST-10	38,46		0,06	0,94				20,0			1,0			
EST-11	9,23			1,0				38,46			1,0			
EST-12	100,0			1,0				100,0			1,0			
EST-13	32,31			1,0				60,0			1,0			
EST-14	9,23			1,0				15,38			1,0			
EST-15	100,0		0,169	0,831				95,38	0,04	0,508	0,452			12,90
EST-16	98,46			1,0				98,46			1,0			
EST-17	56,92		0,230	0,730			54,05	21,54		0,428	0,572			40,0
EST-18	98,46		0,766	0,234			34,38	80,0		0,154	0,846			7,69
EST-19	-							41,54		0,481	0,519			

Tabela 6. Porcentagem de ocorrência, frequência de alelos e porcentagem de heterozigotos em machos e fêmeas da linhagem **CP** de *Megaselia scalaris*.

Esterases	MACHOS						FÊMEAS							
	% de Ocorr.	0,8	0,9	1,0	1,1	1,2	% de Heter.	% de Ocorr.	0,8	0,9	1,0	1,1	1,2	% de Heter.
EST-1	0,0							0,0						
EST-1A	7,69			1,0				15,38			1,0			
EST-2	52,31		0,691	0,309			17,65	41,54		0,370	0,630			7,41
EST-3	83,08			0,768	0,232		46,29	98,46			0,555	0,445		76,56
EST-4	38,46			1,0				49,23			1,0			
EST-5	69,23		0,367	0,378	0,222	0,033	51,11	81,53		0,132	0,642	0,217	0,009	28,30
EST-6	20,0		0,154	0,846			15,38	27,69		0,194	0,806			27,78
EST-7	27,69			1,0				43,01		0,5	0,5			7,14
EST-8	80,0		0,183	0,817				96,92		0,167	0,833			11,11
EST-9	92,31			1,0				95,38			1,0			
EST-10	21,54			1,0				3,08			1,0			
EST-11	36,92			1,0				64,62			1,0			
EST-12	100,0			1,0				100,0			1,0			
EST-13	3,08			1,0				10,77			1,0			
EST-14	15,38			1,0				16,92			1,0			
EST-15	100,0			1,0				93,85		0,197	0,803			6,56
EST-16	100,0		0,062	0,938			12,31	100,0		0,4	0,6			21,54
EST-17	69,23		0,111	0,889			22,22	30,77		0,575	0,425			50,0
EST-18	100,0		0,538	0,462			64,22	98,46		0,336	0,664			32,81
EST-19	9,23			1,0				26,15		0,059	0,991			

Tabela 7. Porcentagem de ocorrência, frequência de alelos e porcentagem de heterozigotos em machos e fêmeas da linhagem **RP** de *Megaselia scalaris*.

Esterases	MACHOS						FÊMEAS							
	% de	Alelos (bandas)					% de	% de	Alelos (bandas)					% de
	Ocorr.	0,8	0,9	1,0	1,1	1,2	Heter.	Ocorr.	0,8	0,9	1,0	1,1	1,2	Heter.
EST-1	1,54			1,0				3,08			1,0			
EST-1A	3,08			1,0				18,46			1,0			
EST-2	13,85		0,5	0,5			11,11	27,69		0,083	0,917			5,56
EST-3	72,31			0,926	0,074		14,89	63,08			0,829	0,171		58,53
EST-4	16,92			1,0				47,69			1,0			
EST-5	98,46		0,016	0,805	0,031	0,148	23,44	83,08		0,028	0,741	0,037	0,194	38,98
EST-6	69,23		0,156	0,733	0,089	0,022	26,67	89,23	0,05	0,207	0,638	0,095	0,009	37,93
EST-7	9,23			1,0				35,38		0,435	0,5	0,065		26,08
EST-8	63,08		0,439	0,561			48,78	90,77		0,407	0,551	0,042		49,15
EST-9	16,92			1,0				32,31			1,0			
EST-10	36,92		0,084	0,708	0,208		8,33	35,38		0,217	0,783			17,39
EST-11	7,69			1,0				46,15		0,05	0,95			3,33
EST-12	100,0			1,0				100,00			1,0			
EST-13	0,0							7,69			1,0			
EST-14	3,08			1,0				6,15			1,0			
EST-15	81,54			1,0				93,84			1,0			
EST-16	75,38		0,602	0,398			28,57	89,23		0,5	0,5			32,76
EST-17	69,23		0,244	0,756			13,33	13,84		0,125	0,875			25,0
EST-18	93,85		0,697	0,303			14,75	90,77		0,415	0,535			11,86
EST-19	56,92		0,203	0,797			8,11	38,46		0,36	0,64			32,0

Tabela 8. Porcentagem de ocorrência, frequência de alelos e porcentagem de heterozigotos em machos e fêmeas da linhagem **PAR** de *Megaselia scalaris*.

Esterases	MACHOS						% de Heter.	FÊMEAS						% de Heter.
	% de Ocorr.	0,8	0,9	1,0	1,1	1,2		% de Ocorr.	0,8	0,9	1,0	1,1	1,2	
EST-1	0,0							0,0						
EST-1A	13,85		0,033	0,667				26,15		0,353	0,647			11,76
EST-2	32,31		0,238	0,762			9,52	33,85		0,318	0,682			18,18
EST-3	46,15			1,0				100,0			0,877	0,123		24,62
EST-4	50,77			1,0				53,85			1,0			
EST-5	80,0		0,001	0,903	0,096		15,38	90,77			0,856	0,144		30,51
EST-6	95,38			0,944	0,056		4,84	100,0			0,9	0,1		10,77
EST-7	16,92			1,0				12,31		0,375	0,625			25,0
EST-8	40,0		0,365	0,635			26,92	84,62		0,436	0,564			47,27
EST-9	66,15			0,791	0,09		27,91	96,92			0,817	0,183		17,46
EST-10	96,92		0,04	0,860	0,10		17,46	52,31		0,118	0,764	0,118		13,33
EST-11	4,62			1,0				23,01			1,0			
EST-12	100,0			1,0				100,0			1,0			
EST-13	3,08			1,0				41,54		0,185	0,815			7,41
EST-14	9,23			1,0				10,77			1,0			
EST-15	100,0			1,0				100,0			1,0			
EST-16	50,77		0,318	0,682			21,21	92,31		0,508	0,492			35,0
EST-17	61,54		0,125	0,7	0,175		25,0	23,01		0,267	0,733			26,67
EST-18	100,0		0,492	0,462	0,046		36,92	100,0		0,285	0,654	0,061		23,08
EST-19	13,85		0,222	0,778				60,0		0,333	0,590	0,077		15,38

porcentagem de ocorrência ficou em torno de 50%. Para este loco foram observados dois alelos denominados Est-3^{1,0} e Est-3^{1,1} exceto para os machos da linhagem PAR. O alelo Est-3^{1,0} foi encontrado em frequências em torno de 50%, com uma porcentagem de heterozigotos nas quatro linhagens que, nos machos variou de 14%(RP) a 46%(CP) e nas fêmeas de 24%(PAR) a 76%(CP).

O loco Est-5 mostrou uma porcentagem de ocorrência aproximada ou superior a 70% nas quatro linhagens, nos dois sexos. Para este loco foram detectados quatro alelos, os quais foram denominados com Est-5^{0,9}, Est-5^{1,0}, Est-5^{1,1} e Est-5^{1,2}. Nos machos da linhagem CG observamos apenas os alelos Est-5^{1,0} e Est-5^{1,1}. Para os machos das linhagens CP e RP foram registrados a ocorrência dos quatro alelos para este loco e entre os machos da linhagem PAR foram observados os alelos Est-5^{0,9}, Est-5^{1,0}, e o Est-5^{1,1}. As fêmeas das linhagens CP e RP apresentaram os quatro alelos. Na linhagem CG foram observados três alelos, Est-5^{0,9}, Est-5^{1,0} e Est-5^{1,1} e nas fêmeas PAR os alelos Est-5^{1,0} e Est-5^{1,1}. A porcentagem de heterozigotos para este loco é próxima ou superior a 30%, apresentando-se abaixo deste valor apenas entre os machos RP e PAR.

A ocorrência do loco Est-6 foi alta, superior a 60%, nas linhagens CG, RP e PAR. Na linhagem CP este loco ocorreu em 20% dos machos e 28% das fêmeas. O loco Est-6⁰ foi o que apresentou maior variabilidade no número de alelos, designados Est-6^{0,8}, Est-6^{0,9}, Est-6^{1,0}, Est-6^{1,1} e Est-6^{1,2}, conforme a posição de migração da banda correspondente no gel. Os machos das linhagens CG e CP apresentaram os alelos Est-6^{0,9} e Est-6^{1,0}. Já na linhagem RP foram observados, entre os machos, os alelos Est-6^{0,9}, Est-6^{1,0}, Est-6^{1,1} e Est-6^{1,2} enquanto que nos machos da linhagem PAR ocorreram apenas os alelos Est-6^{1,0} e Est-6^{1,1}. Entre as fêmeas das linhagens CG e CP foram detectados os alelos Est-6^{0,9} e Est-6^{1,0}. Na linhagem PAR foram observados os alelos Est-6^{1,0} e o Est-6^{1,1} e na linhagem RP foi registrada a ocorrência das cinco variantes alélicas encontradas neste loco. A frequência de indivíduos heterozigotos foi mais alta nas fêmeas do que nos machos nas quatro linhagens. Essas frequências apresentaram uma acentuada variação, ficando em torno de 30% nas linhagens CG e RP em ambos os sexos e em fêmeas da linhagem RP. Nos machos CP, encontramos 15% de heterozigotos e na linhagem PAR as frequências foram ainda mais baixas, 5% nos machos e 10% nas fêmeas.

Para o loco Est-7 a ocorrência observada foi menor ou em torno de 15% nos machos das linhagens CG, RP e PAR, para CP esta porcentagem foi de 28%. Entre as fêmeas a ocorrência foi mais alta nas linhagens CP e RP, aproximadamente 40%. Na linhagem CG esta porcentagem foi a mais baixa, 6%, e para fêmeas PAR, 12%. A variação alélica foi observada para o loco Est-7 apenas



entre as fêmeas. Nas linhagens CG, CP e PAR foram observados os alelos EST-7^{0,9} e o EST-7^{1,0}, na linhagem RP foram detectados três alelos Est-7^{0,9}, Est-7^{1,0} e Est-7^{1,1}. A porcentagem de indivíduos portadores de dois alelos variou entre 7 e 40% entre fêmeas dessas linhagens.

O loco Est-8 teve uma ocorrência maior nas fêmeas do que nos machos, exceto na linhagem CG. Essas frequências foram superiores a 60% com exceção das fêmeas CG (23%) e dos machos PAR (40%). Este loco apresentou duas variantes alélicas, designadas Est-8^{0,9} e Est-8^{1,0}, nos dois sexos, para as quatro linhagens, com exceção de linhagem RP, onde nas fêmeas foi observado mais uma variante denominada Est-8^{1,1}. Não foram observados heterozigotos para este loco nos machos da linhagem CP. Entre os machos da linhagem CG, RP e PAR esses valores ficaram em torno de 38, 48 e 27%, respectivamente. As fêmeas das linhagens RP e PAR apresentaram uma porcentagem de heterozigotos próxima de 50%. Já para CG e CP essa porcentagem foi baixa, em torno de 4% para CG e 11% para CP.

O loco Est-9 apresentou uma ocorrência superior a 90% nos dois sexos para as linhagens CG e CP e nas fêmeas PAR. Os machos PAR apresentaram uma ocorrência deste loco de 66%. Em RP, esta porcentagem foi mais baixa, em torno de 32% nas fêmeas e 17% nos machos. O loco Est-9 foi monomórfico nas linhagens CG, CP e RP. No entanto, na linhagem PAR foram observados dois alelos denominados de Est-9^{1,0} e Est-9^{1,1}. Para esta linhagem a porcentagem de indivíduos que apresentaram os dois alelos simultaneamente foi de aproximadamente 17% nas fêmeas e 28% nos machos.

O loco Est-10 teve maior ocorrência na linhagem PAR, onde se apresentou na proporção de 97% nos machos e 52% nas fêmeas. Nos machos CG e em ambos os sexos da linhagem RP sua ocorrência foi de cerca de 35%. Em fêmeas CG e machos CP observou-se uma ocorrência de 20% e, em fêmeas CP esta porcentagem foi mais baixa ainda, cerca de 3%. O loco Est-10 apresentou variação de alelos entre as fêmeas das linhagens RP e PAR. Entre os machos, a variação foi observada nas linhagens CG, RP e PAR. Foram encontrados para este loco três variantes alélicas denominados Est-10^{0,9}, Est-10^{1,0} e Est-10^{1,1}. A ocorrência dos três alelos foi observada apenas em machos e fêmeas da linhagem PAR e em machos da linhagem RP. As fêmeas RP não apresentaram o alelo Est-10^{1,1}, nem os machos da linhagem CG. A proporção de heterozigotos para este loco nas linhagens RP e PAR ficou abaixo de 20%, não sendo detectado nos machos CG.

O loco Est-11 apresentou ocorrência menor do que 10% nos machos CG, RP e PAR e 37% em machos CP. Entre as fêmeas a ocorrência foi de 38% em



CG, 64% em CP, 46% em RP, e 23% em PAR. Variantes alélicas para o loco Est-11, foram observadas apenas entre fêmeas da linhagem RP, as quais apresentaram os alelos Est-11^{0,9} e Est-11^{1,0}, com uma porcentagem de heterozigotos de 3%.

O loco Est-13 não foi detectado em machos RP. Sua frequência foi menor do que 10% nos machos CP e PAR e, cerca de 30% nos machos CG. Nas fêmeas CP e RP a porcentagem de ocorrência ficou em torno de 10%. Já nas fêmeas CG e PAR os valores foram 60% e 42%, respectivamente. Quanto ao polimorfismo deste loco só foi observado em fêmeas PAR as quais apresentaram dois alelos, Est-13^{0,9} e Est-13^{1,0}, com uma porcentagem de heterozigotos de 7%.

O loco Est-15 foi encontrado em frequência superiores a 80% em todas as linhagens. A variação alélica para este loco foi observada nas linhagens CG e CP. As fêmeas CG apresentaram três alelos, Est-15^{0,8}, Est-15^{0,9} e Est-15^{1,0} e as fêmeas CP apenas os alelos Est-15^{0,9} e Est-15^{1,0}. Esses alelos também foram observados entre os machos de ambas linhagens. Heterozigotos para o loco Est-15 foram observados apenas nas fêmeas, com uma porcentagem de 13% em CG e 6% em CP.

O loco Est-16 apresentou elevada ocorrência, próxima ou igual a 100% nas linhagens CG e CP. Nas fêmeas RP e PAR essa ocorrência foi cerca de 90% e nos machos dessas duas últimas linhagens, aproximadamente 75% e 50%, respectivamente. As linhagens CP, RP e PAR apresentaram dois alelos para o loco Est-16, os quais foram denominados de Est-16^{0,9} e Est-16^{1,0}. O alelo Est-16^{1,0} teve distribuição maior ou similar ao alelo Est-16^{0,9}, exceto em machos RP, onde o alelo Est-16^{0,9} predominou. Nas fêmeas a distribuição desses alelos foi semelhante em RP e PAR e na linhagem CP ocorreu uma predominância do alelo 1,0. A proporção de heterozigotos para este loco ficou entre 20 e 35% em ambos os sexos, exceto para os machos CP com 12%.

A ocorrência do loco Est-17 foi maior entre os machos do que entre as fêmeas para as quatro linhagens, variando de 50% a 70%. Nas fêmeas esta ocorrência ficou entre 13% (para RP) e 31% (CP). Para o loco Est-17 foram observados dois alelos que receberam as designações de Est-17^{0,9} e Est-17^{1,0}, observados nos machos e fêmeas das linhagens CG, CP e RP e nas fêmeas PAR. Os machos da linhagem PAR apresentaram mais um alelo, chamado de Est-17^{1,1}. A porcentagem de indivíduos portadores de dois alelos variou entre 25 a 50% entre fêmeas e de 13 a 54% nos machos.

O loco Est-18 apresentou uma ocorrência superior a 90%, exceto para fêmeas CG (80%). O loco Est-18 apresentou dois alelos chamados de Est-18^{0,9} e Est-18^{1,0}, observados em machos e fêmeas das quatro linhagens. Além desses, na



linhagem PAR, machos e fêmeas apresentaram um outro alelo denominado de Est-18^{1,1}. Para os machos, a frequência do alelo Est-18^{0,9} foi maior nas quatro linhagens, sendo que a porcentagem de heterozigotos variou de 14 a 64% . Nas fêmeas o alelo Est-18^{1,0} foi o mais freqüente em todos os casos. A porcentagem de fêmeas heterozigotas para este loco variou entre 7 a 32%.

O loco Est-19 não foi observado nos machos CG. Sua ocorrência foi muito variável, ficando em torno de 10% para os machos CP e PAR até 57% nos machos RP. Nas fêmeas a ocorrência foi cerca de 26% em CP até 60% na linhagem PAR. Fêmeas das linhagens CG, CP e RP apresentaram dois alelos para o loco Est-19, denominados de Est-19^{0,9} e Est-19^{1,0}. Na linhagem PAR, foi observado ainda um outro alelo entre as fêmeas, o Est-19^{1,1}. Para os machos da linhagem CP apenas um alelo o Est-19^{1,0} foi observado e nas linhagens RP e PAR ocorreram os dois alelos Est-19^{0,9} e Est-19^{1,0}. Não foram observados indivíduos heterozigotos em machos e fêmeas CP, fêmeas CG e machos PAR. Na linhagem RP foi observado 8% de heterozigotos nos machos, 32% nas fêmeas e, 15% nas fêmeas PAR.

As Figuras 10 e 11 apresentam a porcentagem de ocorrência das esterases nas quatro linhagens de *Megaselia scalaris*, sem levarmos em conta os vários alelos encontrados nos locos polimórficos. De maneira geral, podemos observar nessas figuras, que não há uma diferença acentuada entre os padrões das fêmeas (Figura 10) e dos machos (Figura 11) dentro de cada linhagem. Os locos mais freqüentemente detectados nas fêmeas foram os mesmos para os machos, exceto para os locos Est-1, Est-9 e Est-19 que se apresentaram em maior frequência nas fêmeas e o loco Est-17 nos machos. Os locos Est-3, 4, 5, 6, 8, 9, 12, 15, 16 e 18 corresponderam aos principais locos nessa espécie e foram detectados em elevada proporção tanto nas fêmeas como nos machos em todas as linhagens.

A Tabela 9 apresenta a significância dos valores de X^2 obtidos na comparação das frequências dos alelos encontrados para os locos esterásicos polimórficos nas quatro linhagens de *Megaselia scalaris*. Os valores de X^2 obtidos foram altamente significativos ($p < 0,001$), quando se comparou a variação alélica de cada esterase nas quatro linhagens, exceto para os alelos do loco Est-2 no machos, com um valor de X^2 não significativo (ns) e para os alelos do loco Est-17 nas fêmeas, cujo valor foi significativo para $p < 0,05$. Os valores do X^2 obtidos da comparação entre os sexos para Est-6 não foram significativos para as quatro linhagens. No entanto, a comparação das frequências dos alelos entre os sexos, para os demais locos, revelou valores não significativos em várias situações ou que, apresentaram significância em níveis variados.



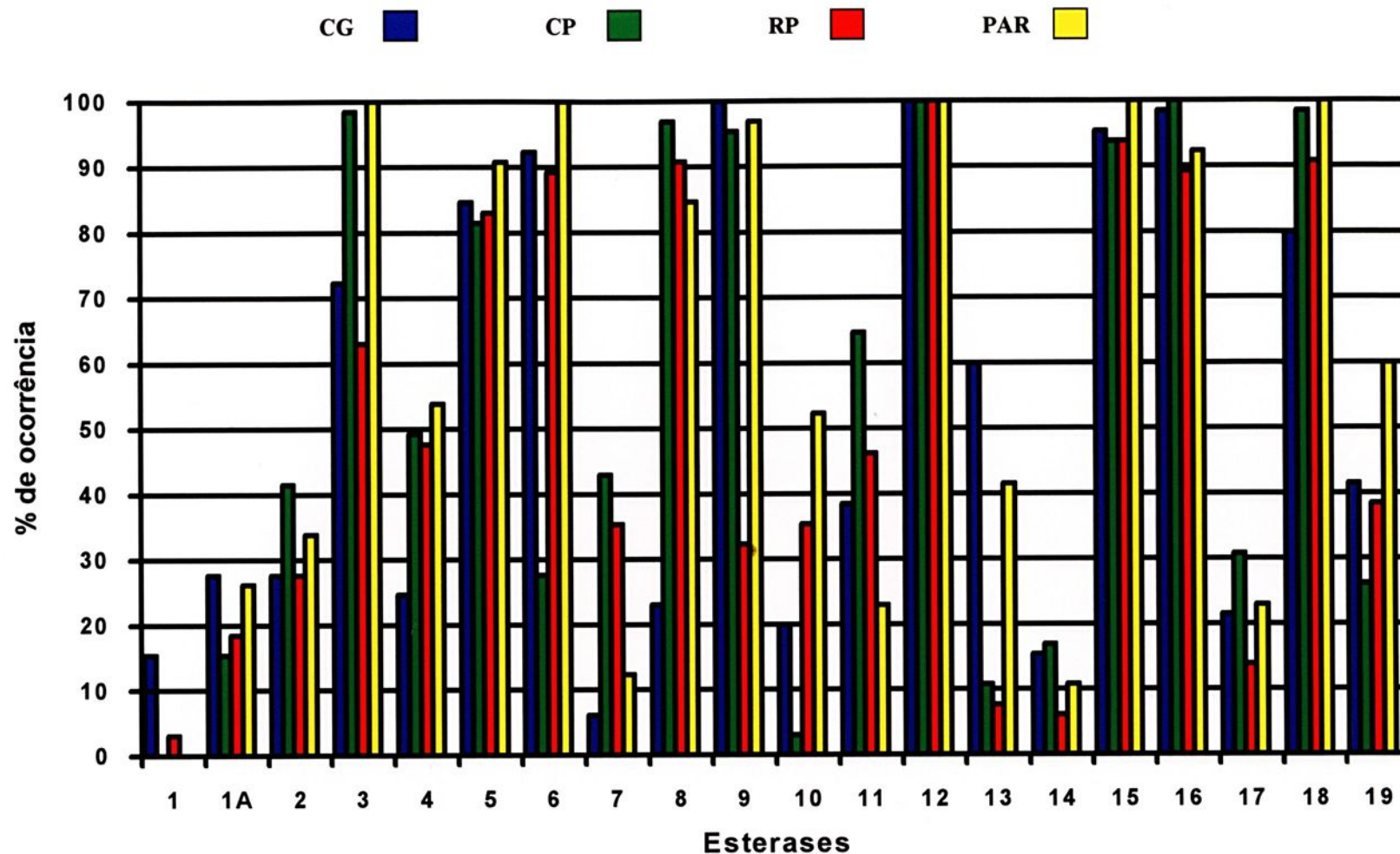


Figura 10. Porcentagem de ocorrência para os locos esterásicos nas fêmeas das linhagens CG, CP, RP e PAR de *Megaselia scalaris*.

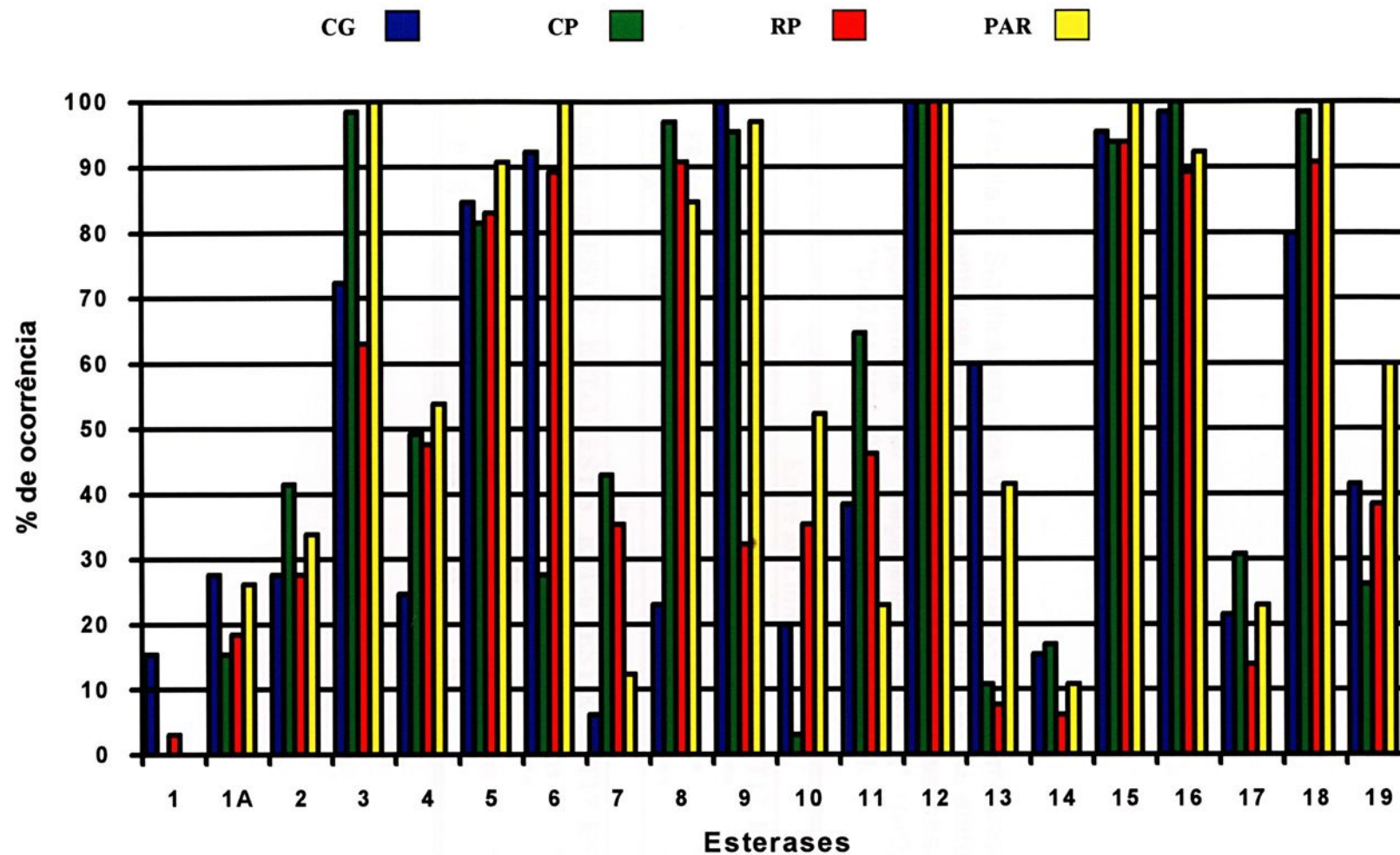


Figura 10. Porcentagem de ocorrência para os locos esterásicos nas fêmeas das linhagens CG, CP, RP e PAR de *Megaselia scalaris*.

Tabela 9. Significância dos valores de X^2 das comparações entre as linhagens, para o mesmo sexo ou, entre os sexos de cada linhagem, para os locos esterásicos polimórficos em *Megaselia scalaris* (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ e ns não significativo).

Entre as Linhagens							
	EST-2	EST-3	EST-5	EST-6	EST-8	EST17	EST-18
Macho	ns	***	***	***	***	***	***
Fêmea	*	***	***	***	***	*	***
Imago	ns	***	***	***	***	***	***
Entre os Sexos							
Linhagem	EST-2	EST-3	EST-5	EST-6	EST-8	EST17	EST-18
CG	ns	*	***	ns	**	ns	***
CP	ns	**	***	ns	***	***	**
RP	***	*	ns	ns	ns	ns	***
PAR	ns	***	ns	ns	ns	*	**



A Tabela 10 refere-se ao comportamento de algumas esterases frente à inibidores. Após a eletroforese, os géis foram pré-incubados e posteriormente corados na presença desses compostos. Paralelamente, géis controle, foram submetidos aos processos usuais de pré-incubação e coloração. Neste trabalho, foram realizados experimentos utilizando-se como inibidores malathion, sulfato de eserina, prostigmina, paracloromercuriobenzoato (PCMB), fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) e sulfato de cobre. Além desses inibidores, também foram realizados experimentos com a permetrina e com o β -mercaptoetanol.

Os dados da Tabela 10 mostram que as esterases-2, 3 e 4 foram completamente inibidas pelo PCMB. A esterase-2 sofreu ainda um efeito parcial pelo tratamento com malathion, enquanto para a esterase-4 este comportamento foi observado em experimentos com o sulfato de cobre. A esterase-5 foi completamente inibida pelo malathion, apresentando uma leve inibição quando tratada com a prostigmina. A esterase 6 foi totalmente inibida pelo PMSF, mostrando um decréscimo parcial de sua atividade na presença do malathion e do PCMB. A análise da esterase-8 revelou uma inibição parcial apenas pelo malathion. Já a esterase-10 foi completamente inibida por este produto. A esterase-12 foi inibida completamente pelo malathion, eserina e prostigmina, apresentando-se levemente inibida pelo PCMB, PMSF e sulfato de cobre. Para as esterases-14 e 16 observou-se inibição total pelo malathion, sendo ainda inibidas de forma quase completa pelo PMSF. Já a esterase 15 sofreu inibição total por estes dois produtos, malathion e PMSF. As esterases-17 e 18 foram completamente inibidas pelo malathion e apresentaram uma inibição leve com o PMSF. A esterase-18 revelou ainda inibições moderadas em tratamentos com a prostigmina, PCMB e sulfato de cobre. A beta esterase-19 foi completamente inibida em géis tratados com malathion e prostigmina, apresentou uma forte inibição em tratamentos com a eserina e PMSF e moderada com o sulfato de cobre. Todas as esterases analisadas foram completamente inibidas pelo β -mercaptoetanol e não sofreram nenhum efeito inibitório em experimentos com permetrina.



Tabela 10. Efeito de inibidores sobre esterases de *Megaselia scalaris*. (-: ausência de inibição; +; ++; +++ e ++++: graus progressivos de inibição, nd: não determinado).

Esterases	Especif.	Inibidores/Concentração					
		Malathion 0,7mM	Eserina 0,1mM	Prostigmina 0,1mM	PCMB 0,1mM	PMSF 1mM	CuSO ₄ 2mM
EST-2	α	++	-	-	++++	-	-
EST-3	α	nd	nd	nd	++++	nd	-
EST-4	α	nd	nd	nd	++++	nd	+++
EST-5	α	++++	-	+	-	-	-
EST-6	β	++	-	-	++	++++	-
EST-8	α	++	-	-	-	-	-
EST-10	α	++++	-	-	-	-	-
EST-12	α	++++	++++	++++	+	+	+
EST-14	α/β	++++	+	-	-	+++	-
EST-15	α/β	++++	-	-	-	++++	-
EST-16	α/β	++++	+	-	-	+++	-
EST-17	α	++++	-	-	-	+	-
EST-18	α	++++	-	+	++	+	+
EST-19	β	++++	+++	++++	-	+++	++

III.3. Estudo Comparativo do Padrão de Esterases no Desenvolvimento

As Figuras 12 e 13 apresentam o padrão das esterases presentes desde larvas de primeiro estágio até imagos com cinco dias de idade. Esses experimentos foram realizados apenas para as linhagens CG e PAR.

Pode-se observar a presença de uma enzima estágio específica presente nas larvas de primeiro e segundo estágios, nas duas linhagens. Esta esterase, indicada pela seta nas Figuras 12 e 13, mostra uma atividade intensa no início do desenvolvimento larval, apresentando-se como uma banda grossa, fortemente corada pelo α -naftil acetato, tanto em larvas de 1° como nas de 2° estágio. A partir desta fase a sua atividade não é mais detectada. A esterase específica para o β -naftil acetato, já detectada no padrão dos adultos e denominada de EST-6, foi visualizada em todo o desenvolvimento, apresentando uma atividade acentuada em todas as fases. As esterases 3 e 4, já descritas para os adultos, aparecem em todas as fases do desenvolvimento da linhagem PAR, mas foram fracamente detectadas nos estágios de larvas e pupas da linhagem CG. No entanto, esta última linhagem mostrou uma enzima comum às larvas de 3° estágio e pupas, que nos adultos migra bem próximo à posição da EST-9, sendo fracamente detectada. Na linhagem PAR esta enzima apresentou uma frequência mais variável nas fases de larvas de 3° estágio, pupas e adultos.

A esterase-12 já descrita para os adultos, parece estar presente e com atividade elevada nas larvas de 1° e 2° estágio. Entretanto esta enzima não foi bem detectada em larvas de 3° estágio. Um outro fato que merece ser destacado é o comportamento da enzima que para os adultos foi denominada como EST-15. Esta esterase mostrou um aumento de sua atividade nos 1° e 2° estágios larvais, chegando a uma atividade máxima nas larvas de 3° estágio, decrescendo nas fases de pupa e nos adultos. As esterases 18 e 19 também apresentaram padrões específicos ao longo do desenvolvimento. A esterase 18 mostrou-se bem visível a partir das pupas amarelas. Já a presença da esterase-19 foi detectada desde larvas de 3° estágio até nos adultos.

A Figura 14 apresenta uma comparação mais detalhada dos padrões de esterases de larvas de 3° estágio, fêmeas e machos da linhagem PAR submetidas ou não ao tratamento com sulfato de eserina e PMSF. Pode ser observado que no 3° estágio larval, a EST-12 apresenta-se em quantidades mínimas, sendo fracamente corada nos géis. Além disso esta enzima é inibida pela eserina (Figura 14-B) e malathion (Figura não apresentada) indicando tratar-se de uma colinesterase. Já a esterase-6, constante em todas as amostras, é inibida pelo PMSF (Figura 14-D), mas não pelo malathion (Figura não apresentada) e eserina (Figura 14-B).



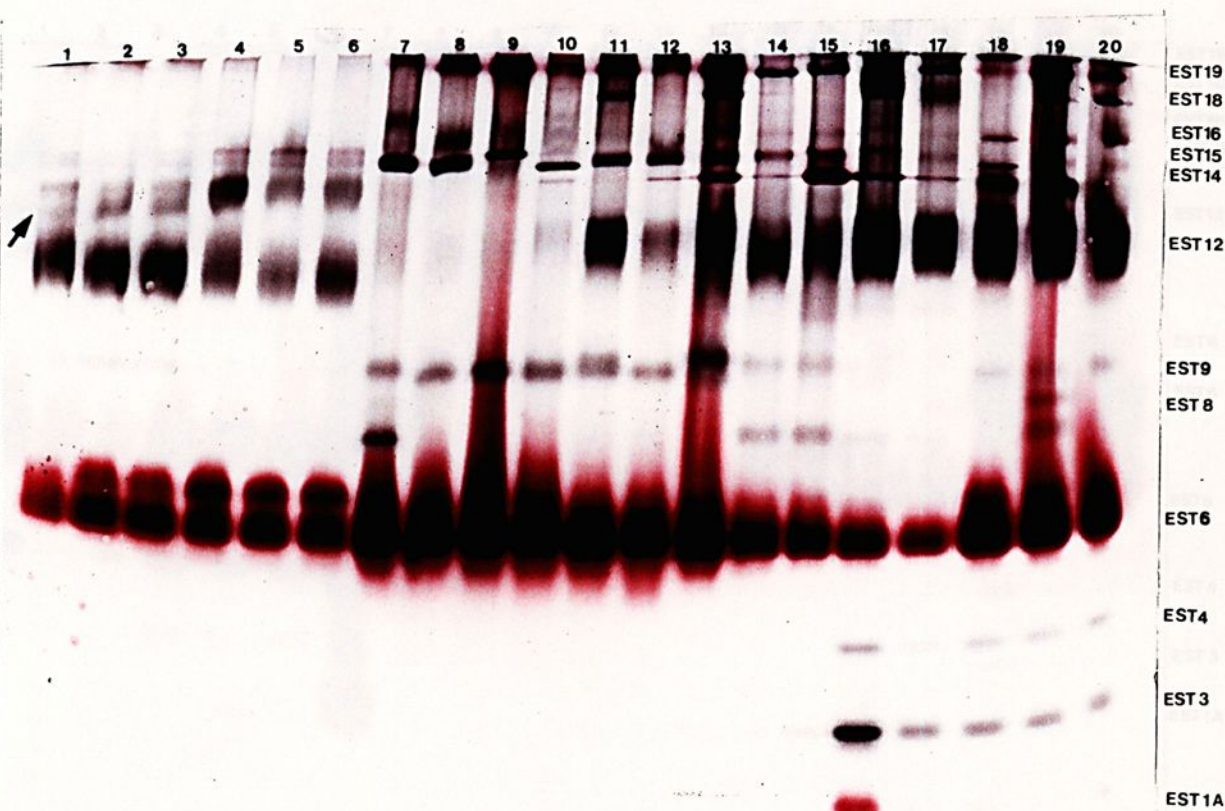


Figura 12. Esterases no desenvolvimento de *Megaselia scalaris*, linhagem CG. Amostras 1-3, larvas de 1º estágio (L1); 4-6 larvas de 2º estágio (L2); 7-9 larvas de 3º estágio (L3); 10-12 pupas amarelas (PA); 13-15 pupas pretas (PP); 16 e 17 machos (M) e 18 a 20 fêmeas (F) com cinco dias de idade, em gel submetido à coloração com α e β naftil acetato. A seta indica banda diferencial.

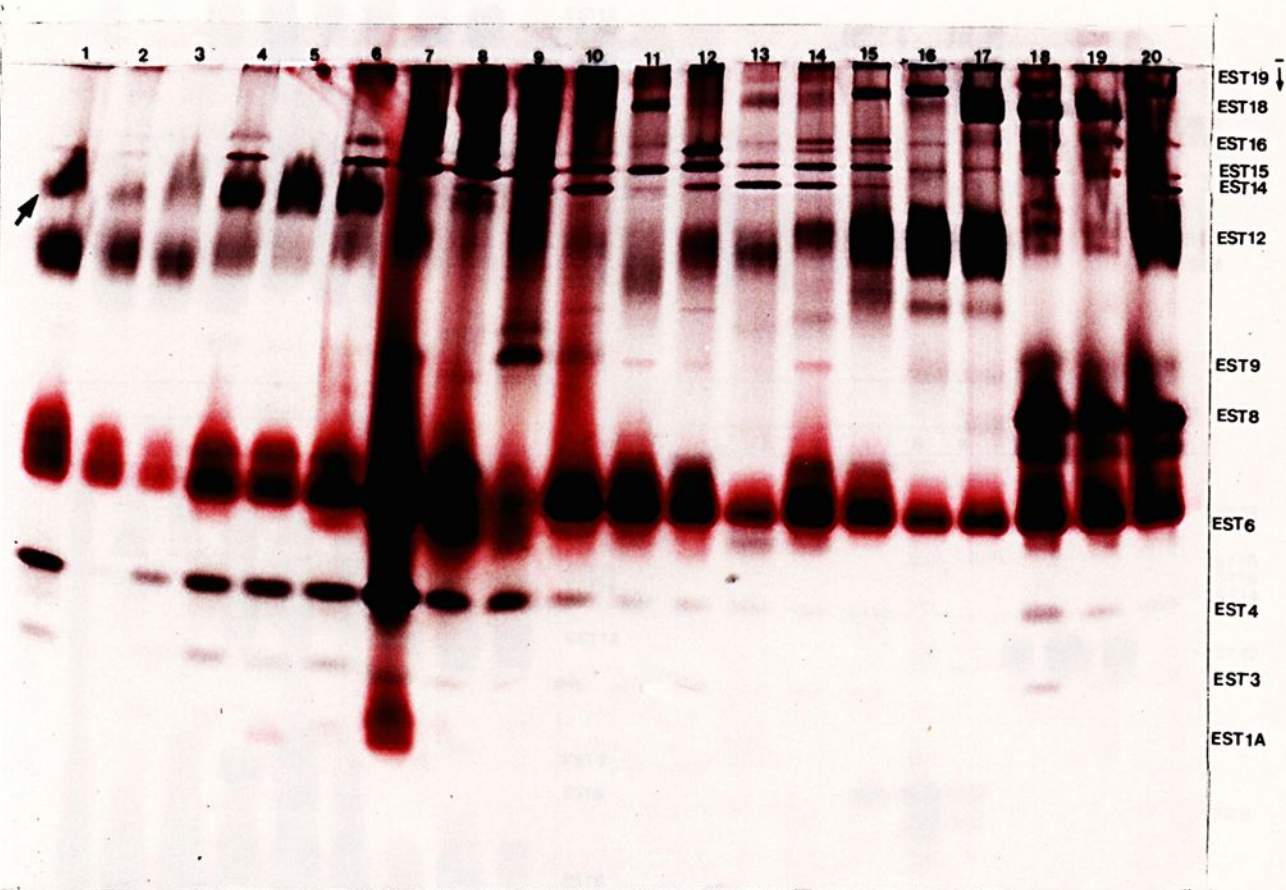


Figura 13. Esterases no desenvolvimento de *Megaselia scalaris*, linhagem PAR. Amostras 1-3, larvas de 1° estágio (L1); 4-6 larvas de 2° estágio (L2); 7-9 larvas de 3° estágio (L3); 10-12 pupas amarelas (PA); 13-15 pupas pretas (PP); 16 e 17 machos (M) e 18 a 20 fêmeas (F) com cinco dias de idade, em gel submetido à coloração com α e β naftil acetato. A seta indica banda diferencial.

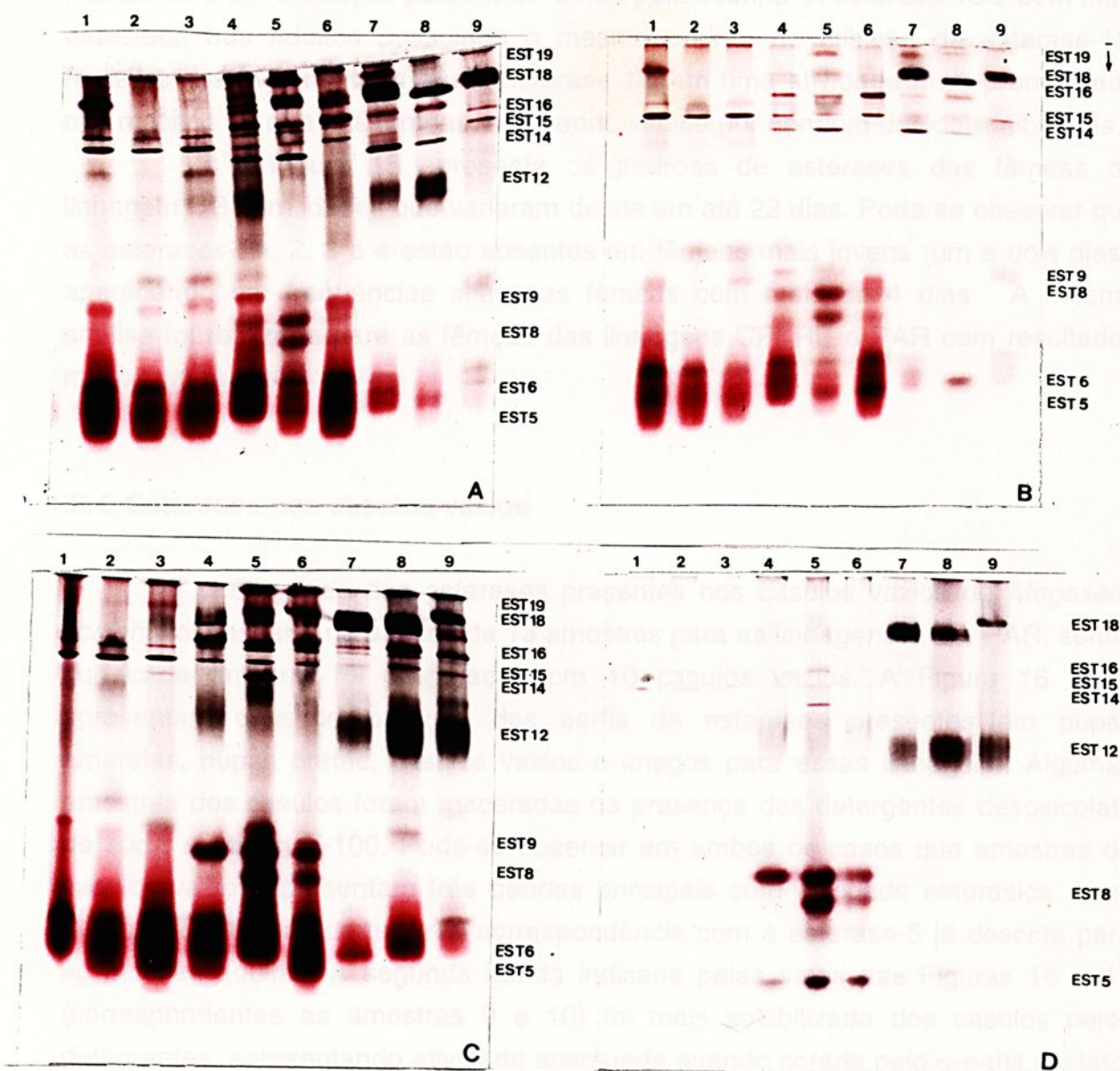


Figura 14. Comparação das principais esterases de larvas do 3º estágio (1-3), fêmeas (4-6) e machos (7-9) da linhagem PAR de *Megalotia scalaris*, submetidas ao tratamento com eserina e PMSF na concentração 1mM. A. controle, B. eserina, C. controle e D. PMSF. Géis submetidos à coloração com α e β naftil acetato.

Nota-se também nesta figura que a esterase-15 tem uma atividade mais acentuada nas larvas e sofre inibição pelo PMSF e não pela eserina. A esterase-16 é bem mais detectada nos adultos possuindo o mesmo padrão de inibição da esterase-15. Pode-se observar também que a esterase-18 tem uma atividade mais pronunciada nos machos do que nas fêmeas, não sendo inibida por nenhum dos dois inibidores.

A Figura 15 apresenta os padrões de esterases das fêmeas da linhagem CG com idades que variaram desde um até 22 dias. Pode-se observar que as esterases-1A, 2, 3 e 4 estão ausentes em fêmeas mais jovens (um e dois dias), aparecendo em frequências altas nas fêmeas com mais de 4 dias. A mesma análise foi realizada para as fêmeas das linhagens CP, RP e PAR com resultados muito semelhantes.

III.4. Esterases nos casulos vazios

O estudo das esterases presentes nos casulos vazios de *Megaselia scalaris* foi baseado na análise de 13 amostras para as linhagens GG e PAR, sendo que cada amostra foi preparada com 10 casulos vazios. A Figura 16 e 17 apresentam uma comparação dos perfis de esterases presentes em pupas amarelas, pupas pretas, casulos vazios e imagos para essas linhagens. Algumas amostras dos casulos foram maceradas na presença dos detergentes desoxicolato de sódio ou triton X-100. Pode-se observar em ambos os casos que amostras de casulos vazios apresentam três bandas principais com atividade esterásica. Uma dessas bandas parece ter uma correspondência com a esterase-5 já descrita para as moscas adultas. A segunda banda indicada pelas setas nas Figuras 16 e 17 (correspondentes as amostras 9 e 10) foi mais solubilizada dos casulos pelos detergentes, apresentando atividade acentuada quando corada pelo α -naftil acetato. Essa banda parece ter uma correspondência com a esterase-10 presente nos adultos, especialmente na linhagem PAR. A análise dos casulos revelou uma atividade acentuada desta enzima, que é uma esterase pouco perceptível na fase adulta ou de pupa, apresentando-se como uma banda estreita e fracamente corada. Já a terceira banda evidenciada nos casulos, parece relacionar-se à esterase-14 dos imagos, apresentando um comportamento de uma $\alpha\beta$ esterase. Esta enzima sofreu uma diminuição de sua atividade quando os casulos foram macerados na presença do triton (amostras 10 das Figuras 16 e 17). Quando amostras dos casulos foram aquecidas a 100° C por cinco minutos, nenhuma dessas bandas foi detectada após a eletroforese (amostra 10 na Figura 16 e amostra 11 na Figura 17).



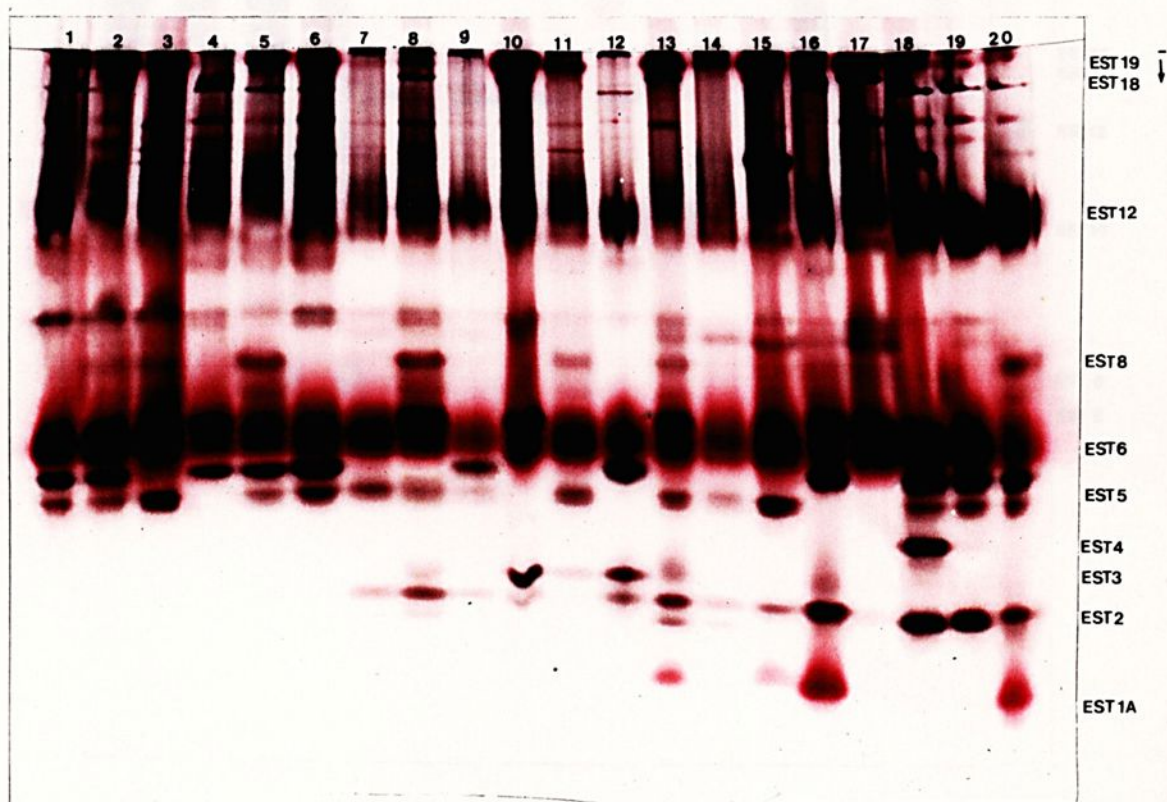


Figura 15. Esterases em fêmeas da linhagem CG de *Megaselia scalaris* com diferentes idades. Amostras 1-3 um dia, 4-6 dois dias, 7-9 quatro dias, 10-12 dez dias, 13-15 quinze dias, 16-17 vinte dias e 18-20 vinte e dois dias. Gel submetido à coloração com α e β naftil acetato.

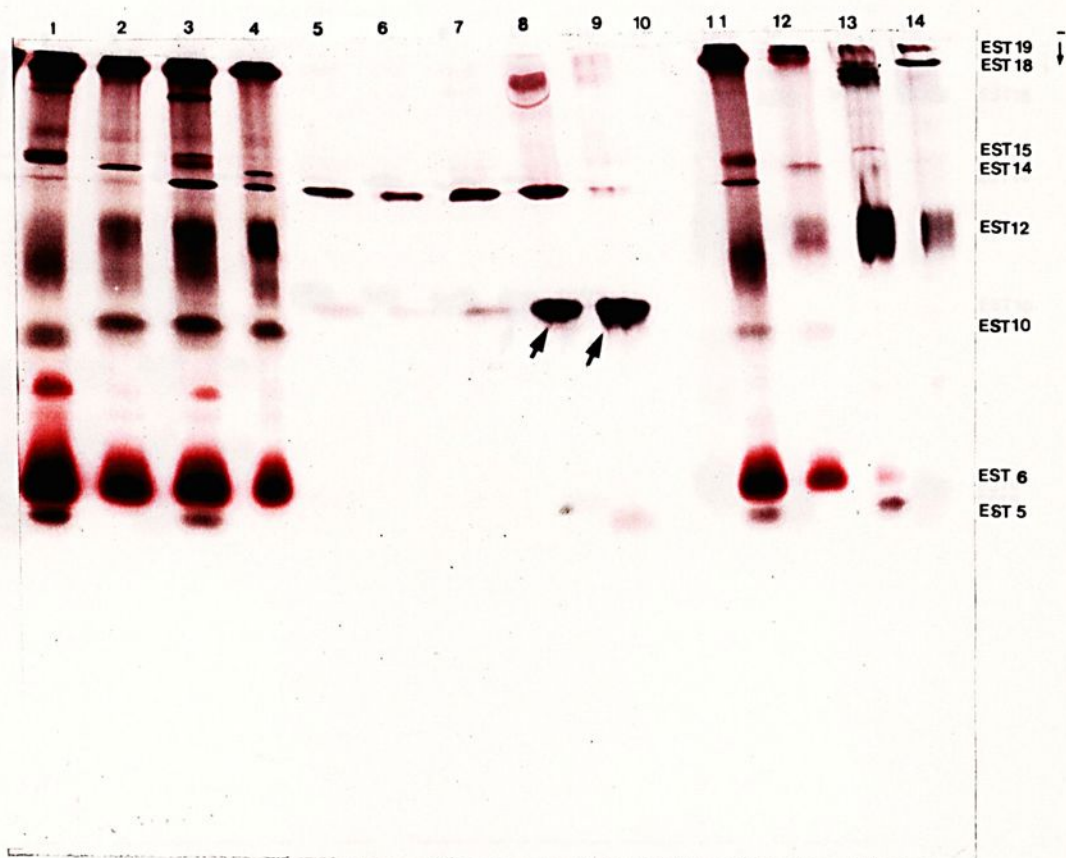


Figura 16. Padrão de esterases em pupa amarela (1), pupas pretas (2 a 4), casulos vazios (5 a 10), machos (11-12) e fêmeas (13-15) da linhagem CG de *Megaselia scalaris*. A amostra 10 dos casulos vazios foi fervida por cinco minutos antes da aplicação no gel, submetido à coloração com α e β naftil acetato. As setas apontam bandas características dos casulos.

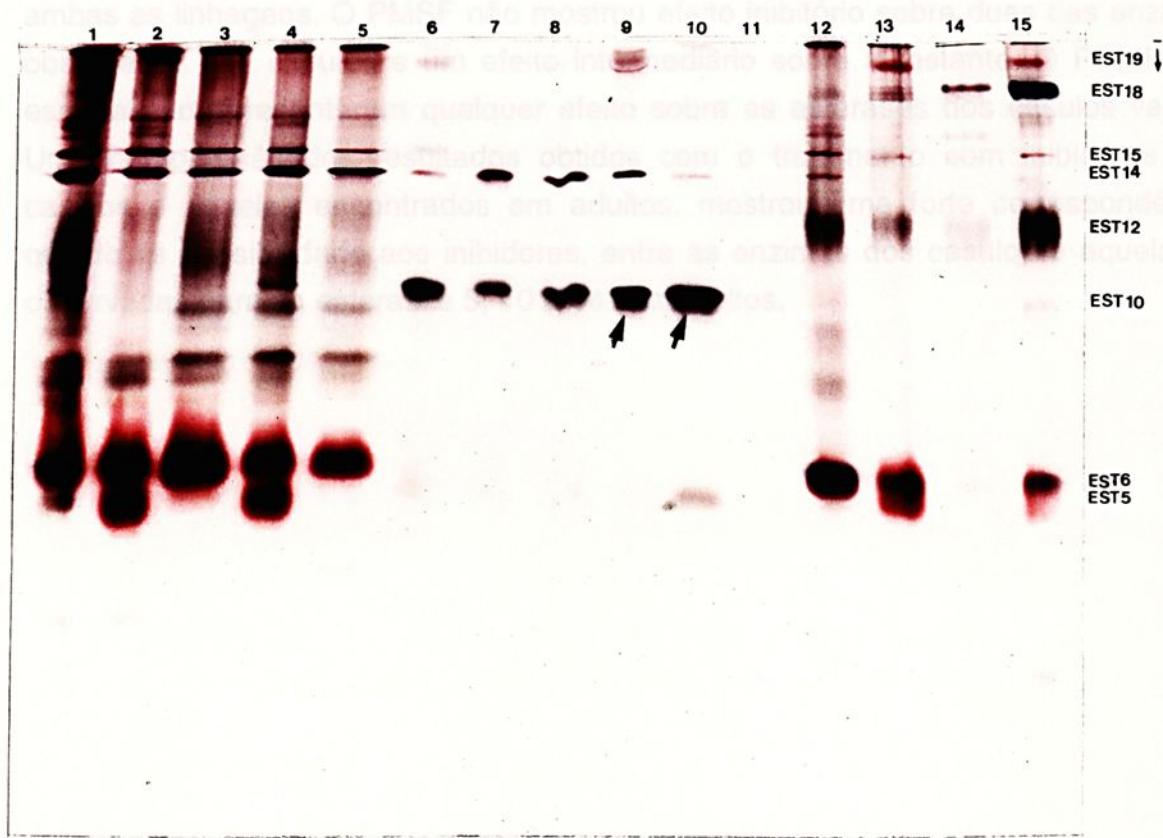


Figura 17. Padrão de esterases em pupa amarela (1), pupas pretas (2 a 4), casulos vazios (5 a 10), machos (11-12) e fêmeas (13-15) da linhagem PAR de *Megaselia scalaris*. A amostra 11 dos casulos vazios foi fervida por cinco minutos antes da aplicação no gel, submetido à coloração com α e β naftil acetato. As setas apontam bandas características dos casulos.

A Tabela 11 apresenta os dados referentes a inibição das principais esterases presentes em casulos vazios das linhagens CG e PAR de *Megaselia scalaris*, comparados aqueles já obtidos para as moscas adultas (Tabela 10). Nesses experimentos os casulos foram macerados na presença de desoxicolato de sódio a 1% e os extratos testados com p-clomercuribenzoato (PCMB), fluoreto de fenilmetilssulfonila (PMSF), malathion e eserina. Os dados obtidos revelam que o malathion promoveu uma forte inibição das esterases solubilizadas dos casulos de ambas as linhagens. O PMSF não mostrou efeito inibitório sobre duas das enzimas observadas nos casulos e um efeito intermediário sobre a restante. O PCMB e a eserina não apresentaram qualquer efeito sobre as esterases dos casulos vazios. Uma comparação dos resultados obtidos com o tratamento com inibidores nos casulos e aqueles encontrados em adultos, mostrou uma forte correspondência quanto a sensibilidade aos inibidores, entre as enzimas dos casulos e aquelas já observadas para as esterases 5, 10 e 14 dos adultos.



Tabela 11. Efeito de inibidores sobre esterases de casulos vazios e comparação destes nas esterases dos adultos, para as linhagens CG e PAR de *Megaselia scalaris*.(-: ausência de inibição; +; ++; +++; ++++: graus progressivos de inibição).

		Inibidores			
Linhagens	Esterases	PCMB 0,1 mM	PMSF 1 mM	Malathion 0,7 mM	Eserina 1 mM
CG	EST-5	-	-	++++	-
	EST-5(cas)	-	-	+++	-
	EST-10	-	-	++++	-
	EST-10(cas)	-	-	+++	-
	EST-14	-	+++	++++	-
	EST14(cas)	-	++	+++	-
PAR	EST-5	-	-	++++	-
	EST-5(cas)	-	-	++++	-
	EST-10	-	-	++++	-
	EST-10(cas)	-	-	+++	-
	EST-14	-	+++	++++	-
	EST14(cas)	-	++	++++	-

III.5. Padrão de esterases em cruzamentos por casal

A análise dos padrões de herança das esterases de *Megaselia scalaris* foi realizada através de cruzamentos por casal intralinhagens. Também foram realizados cruzamentos interlinhagens, envolvendo machos e fêmeas RP cruzados com indivíduos das demais linhagens. Os casais e a progênie desses cruzamentos foram congelados com cinco dias de idade e posteriormente analisados eletroforeticamente.

A Figura 18 apresenta os padrões de esterases de um casal RP e de seus descendentes. Pode-se observar nesta figura que as esterases 3, 12, 15 e 19 apresentam um padrão simples de herança estando sempre presentes como bandas únicas nos pais e descendentes. Para algumas dessas enzimas pode-se prever a existência de alelos nulos, como observado nesta Figura para as esterases- 4, 5, 6 e 11.

Uma outra situação pode ser observada para o loco esterásico 6. As enzimas codificadas por este loco apresentam variações quanto a sua posição no gel, as quais foram interpretadas como originadas de alelos diferentes, o que está de acordo com as tabelas 5, 6, 7 e 8. As esterases codificadas por este loco podem ser visualizadas como bandas únicas, duas bandas ou mesmo não serem detectadas. Uma análise genética dos padrões desse loco permitiu-nos a interpretação das bandas únicas como sendo provenientes de indivíduos homozigotos e do padrão de duas bandas como provenientes dos heterozigotos. Nenhuma banda intermediária foi observada para essas enzimas, sugerindo que as mesmas sejam formadas por uma única cadeia polipeptídica. A presença de duas bandas, é devida a expressão dos dois alelos em codominância, o que pode ser observado nos indivíduos heterozigotos (amostras 4, 7, 8 e 10 da Figura 8). Neste casal não observamos o polimorfismo do loco Est-5, visto que ambos os pais tinham o mesmo alelo.

As Figuras 19-A e 19-B apresentam os padrões de esterases obtidos em cruzamentos interlinhagens. Na Figura 19-A o casal (amostras 1 e 2) refere-se a uma fêmea PAR e um macho RP. As amostras de 3 a 7 representam as fêmeas descendentes deste casal, enquanto as amostras 8 a 11 são dos machos F1. O casal da Figura 19-B refere-se a uma fêmea CG e um macho RP e sua progênie, formada por apenas duas fêmeas. Na Figura 19-A fica bem evidente a diferença de atividade da esterase-6 entre os sexos, sendo que as fêmeas apresentam uma atividade maior do que os machos. O mesmo comportamento ocorre com a esterase-19, presente nas fêmeas e fracamente detectadas nos machos.



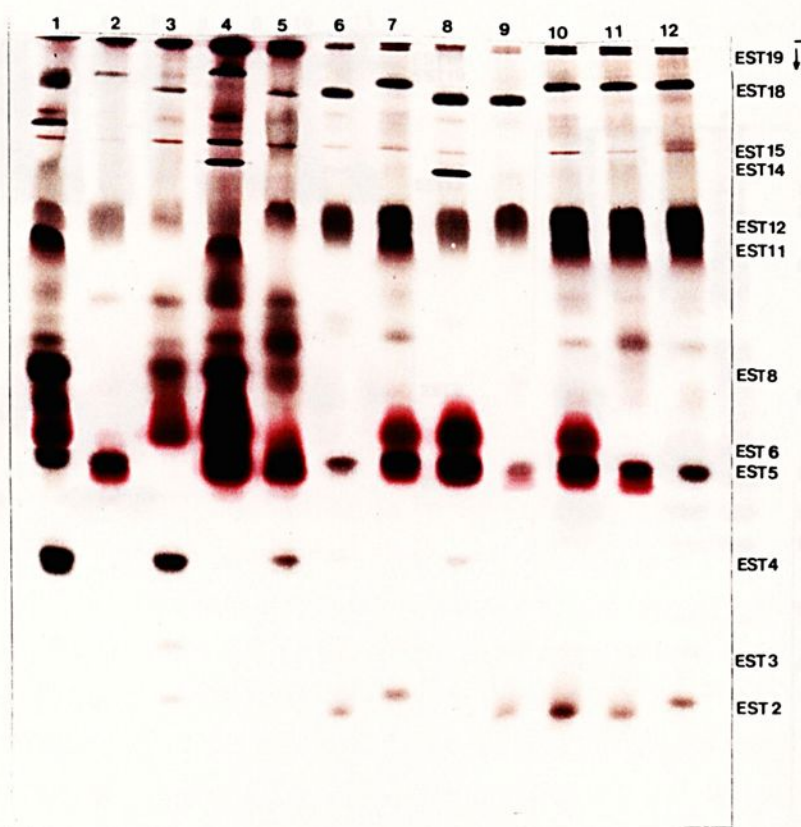


Figura 18. Padrões de esterases obtidos de cruzamentos por casal na linhagem RP de *Megaselia scalaris*. Amostras 1-2, fêmea e macho do casal; 3-5 fêmeas F1 e 6-12 machos F1. Gel submetido à coloração com α e β naftil acetato.

As contrários, a esterase-18 tem uma atividade muito mais pronunciada nos machos do que nas fêmeas, embora os machos tenham um conteúdo proteico bem maior. Na Figura 19-B observa-se o polimorfismo da esterase-5.

A Figura 20-A mostra a análise das esterases de um casal (fêmea CG e macho RP) e de sua progênie, composta por três fêmeas e dois machos. A Figura 20-B refere-se ao casal, fêmea RP e macho CG, sendo sua progênie constituída por três fêmeas e cinco machos. Na Figura 20-A podemos observar o polimorfismo da esterase-5 e a maior atividade da esterase-18 nos machos, como já descrito.

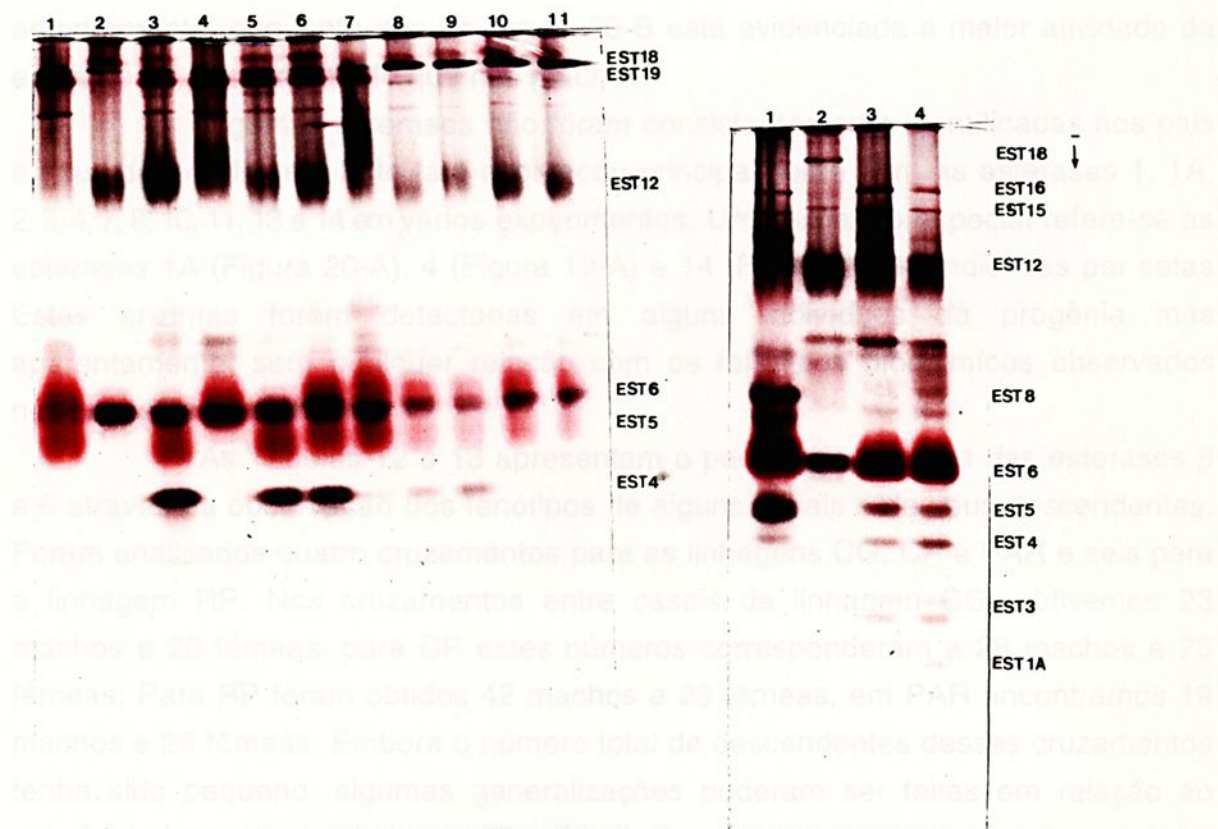


Figura 19-A. Padrões de esterases, em cruzamentos por casal interlinhagens de *Megaselia scalaris*. Amostras 1 e 2, fêmea PAR e macho RP; 3-7 fêmeas F1, 8-11 machos F1.

Figura 19-B. Amostras 1 e 2, fêmea CG e macho RP; amostras 3 e 4 fêmeas F1. Géis submetidos à coloração com α e β naftil acetato.

Ao contrário, a esterase-18 tem uma atividade muito mais pronunciada nos machos do que nas fêmeas, embora os machos tenham um conteúdo protéico bem menor. Na Figura 19-B observa-se o polimorfismo da esterase-5.

A Figura 20-A mostra a análise das esterases de um casal (fêmea CP e macho RP) e de sua progênie, composta por três fêmeas e dois machos. A Figura 20-B refere-se ao casal, fêmea RP e macho CG, sendo sua progênie constituída por três fêmeas e cinco machos. Na Figura 20-A podemos observar o polimorfismo da esterase-5 e a maior atividade da esterase-18 nos machos, como já descrito anteriormente, enquanto que na Figura 20-B está evidenciada a maior atividade da esterase 19 nas fêmeas do que nos machos.

Algumas esterases não foram consistentemente identificadas nos pais e seus descendentes. Este fato aconteceu principalmente para as esterases 1, 1A, 2, 3, 4, 7, 8, 10, 11, 13 e 14 em vários experimentos. Uma situação especial refere-se às esterases 1A (Figura 20-A), 4 (Figura 19-A) e 14 (Figura 20-B), indicadas por setas. Estas enzimas foram detectadas em alguns indivíduos da progênie mas aparentemente, sem qualquer relação com os fenótipos bioquímicos observados nos pais.

As Tabelas 12 e 13 apresentam o padrão de herança das esterases 5 e 6 através da observação dos fenótipos de alguns casais e de seus descendentes. Foram analisados quatro cruzamentos para as linhagens CG, CP e PAR e seis para a linhagem RP. Nos cruzamentos entre casais da linhagem CG, obtivemos 23 machos e 20 fêmeas, para CP estes números corresponderam a 28 machos e 25 fêmeas. Para RP foram obtidos 42 machos e 23 fêmeas, em PAR encontramos 19 machos e 25 fêmeas. Embora o número total de descendentes desses cruzamentos tenha sido pequeno, algumas generalizações puderam ser feitas em relação ao estudo da herança dos locos Est-5 e Est-6. Por exemplo, em cruzamentos onde os pais não apresentaram a EST-5 ou a EST-6, a atividade destas enzimas também não foi detectada em nenhum dos descendentes. Por outro lado, detectamos filhos que não apresentaram a enzima EST-5 ou a EST-6 mas eram descendentes de pais que possuíam atividade para estes locos, esses casais foram considerados como heterozigotos, com um alelo nulo. Um outro aspecto que pode ser ressaltado em relação a esterase-5, é que aparentemente observamos uma correlação entre o fenótipo encontrado nos descendentes machos e o alelo observado no pai. Tal correlação foi observada na maioria dos cruzamentos, com exceção do número 4 de CG, número seis de RP e número quatro de PAR. Em uma análise geral desses cruzamentos observamos que o fenótipo do pai em relação ao loco Est-5 foi observado em 90% dos seus descendentes machos e em aproximadamente 44% de suas filhas. Para a esterase-6 este tipo de correlação não foi evidenciada, sendo



Tabela 12. Análise da herança da esterase-5 (EST-5) observada em cruzamentos por casal para as linhagens CG, CP, RP e PAR de *Megaselia scalaris*.

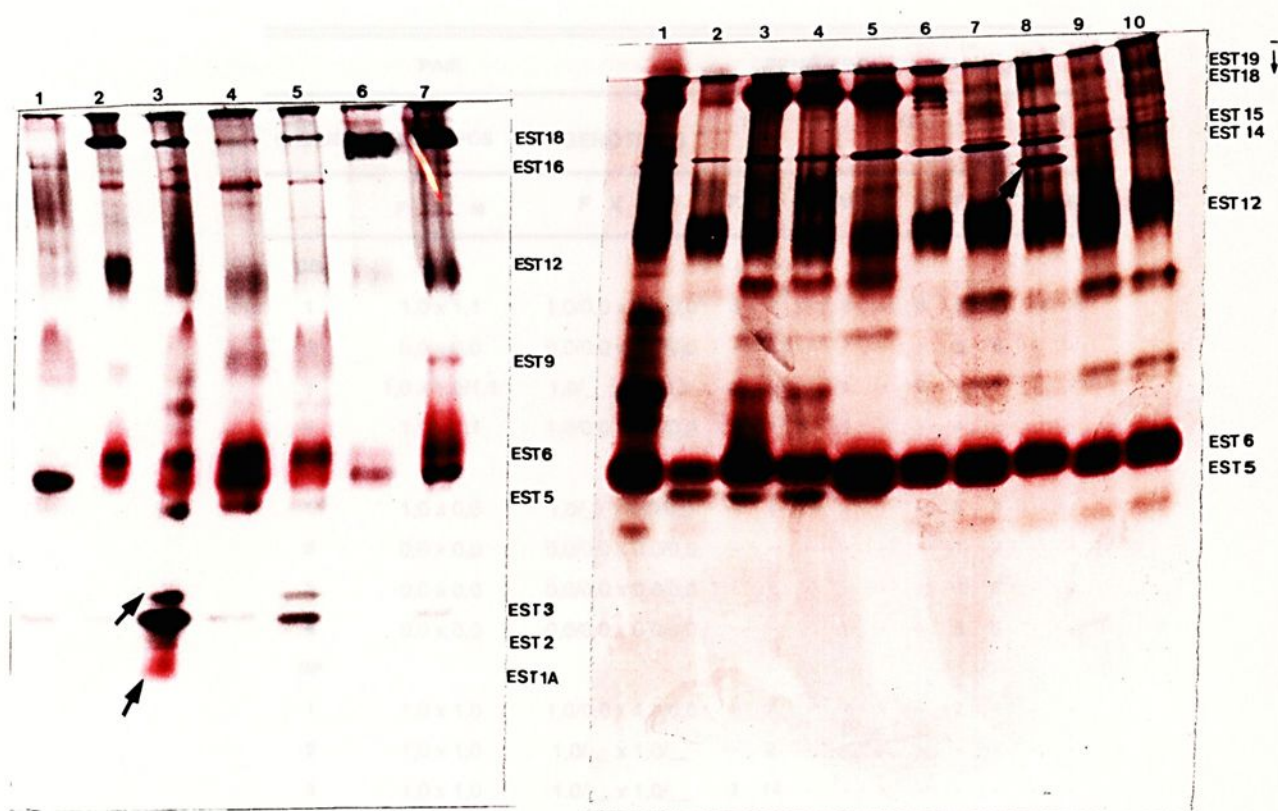


Figura 20-A. Padrões de esterases em cruzamentos por casal interlinhagens de *Megaselia scalaris*. Amostras 1 e 2, fêmea RP e macho CP, 3-5 fêmeas F1, 6 e 7 machos F1.

Figura 20-B. Amostras 1 e 2, fêmea RP e macho CG; 3 a 5 fêmeas F1; 6 a 10 machos F1. Géis submetidos à coloração com α e β naftil acetato.

Tabela 12. Análise da herança da esterase-5 (EST-5) observada em cruzamentos por casal, para as linhagens CG, CP, RP e PAR de *Megaselia scalaris*.

PAIS			FENÓTIPOS DA PROGÊNIE									
CASAIS	FENÓTIPOS	GENÓTIPOS	1,0		1,1		1,0/1,1		0,0		1,2	
	F X M	F X M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M
CG												
1	1,0 x 1,1	1,0/0,0 x 1,1/0,0	3	-	-	9	-	3	3	-	-	-
2	0,0 x 0,0	0,0/0,0 x 0,0/0,0	-	-	-	-	-	-	5	6	-	-
3	1,0 x 1,0/1,1	1,0/___ x 1,0/1,1	4	-	-	1	-	2	-	-	-	-
4	1,0 x 1,1	1,0/0,0 x 1,1/0,0	1	1	-	1	-	-	4	-	-	-
CP												
1	1,0 x 0,0	1,0/___ x 0,0/0,0	4	1	-	-	-	-	5	8	-	-
2	0,0 x 0,0	0,0/0,0 x 0,0/0,0	-	-	-	-	-	-	1	7	-	-
3	0,0 x 0,0	0,0/0,0 x 0,0/0,0	-	-	-	-	-	-	10	6	-	-
4	0,0 x 0,0	0,0/0,0 x 0,0/0,0	-	-	-	-	-	-	5	6	-	-
RP												
1	1,0 x 1,0	1,0/0,0 x 1,0/0,0	1	7	-	-	-	-	2	-	-	-
2	1,0 x 1,0	1,0/___ x 1,0/___	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-
3	1,0 x 1,0	1,0/___ x 1,0/___	3	14	-	-	-	-	-	-	-	-
4	0,0 x 0,0	0,0/0,0 x 0,0/0,0	-	-	-	-	-	-	8	9	-	-
5	0,0 x 0,0	0,0/0,0 x 0,0/0,0	-	-	-	-	-	-	3	3	-	-
6	0,0 x 1,2	1,1/0,0 x 1,2/0,0	-	-	3	-	-	-	-	2	2	5
PAR												
1	1,0/1,1 x 1,0/1,1	1,0/1,1 x 1,0/1,1	4	3	-	-	6	5	-	-	-	-
2	1,0 x 1,0	1,0/___ x 1,0/___	2	6	-	-	-	-	-	-	-	-
3	1,0 x 1,0	1,0/___ x 1,0/___	4	1	-	-	-	-	-	-	-	-
4	0,0 x 1,1	0,0/0,0 x 1,1/0,0	-	-	3	2	-	-	6	2	-	-

Tabela 13. Herança da esterase-6 observada em cruzamentos por casal, para as linhagens CG, CP, RP e PAR de *Megaselia scalaris*.

PAIS							FENÓTIPOS DA PROGENIE															
CASAIIS	FENÓTIPOS			GENÓTIPOS			0,9		1,0		1,1		0,9/1,0		0,9/1,1		1,0/1,1		0/0			
							F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M
CG																						
1	0,9/1,0 X 1,0			0,9/ 1,0 X 1,0/___			-	-	3	9	-	-	3	3	-	-	-	-	-	-		
2	0,9/1,0 X 1,0			0,9/ 1,0 X -1,0/___			-	-	3	6	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-		
3	1,0 X 1,0			1,0/___ X 1,0/___			-	-	4	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
4	1,0 X 1,0			1,0/___ X 1,0/___			-	-	5	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
CP																						
1	1,0 X 1,0			1,0/___ X 1,0/___			-	-	9	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
2	0,9/1,0 X 1,0			0,9/1,0 X 1,0/___			-	-	1	6	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-		
3	0,9/1,0 X 1,0			0,9/1,0 X 1,0/0,0			2	-	3	2	-	-	5	4	-	-	-	-	-	-		
4	0,9/1,0 X 1,0			0,9/1,0 X 1,0/___			-	-	2	6	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-		
RP																						
1	1,0 X 1,1			1,0/ 0,0 X 1,1/ 0,0			-	-	1	-	1	2	-	-	-	-	1	3	-	2		
2	1,0 X 1,0			1,0/___ X 1,0/___			-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
3	0,9/1,1 X 1,0			0,9/ 1,1 X 1,0/___			-	-	1	8	2	1	-	1	-	-	-	4	-	-		
4	0,9 X 1,0			0,9/ 0,0 X 1,0/ 0,0			1	-	1	1	-	-	4	6	-	-	-	-	2	2		
5	0,9 X 1,0			0,9/___ X 1,0/___			2	-	1	2	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-		
6	0,9 X 1,1			0,9/ 0,0 X 1,1/ 0,0			2	-	-	-	-	2	-	-	3	2	-	-	-	3		
PAR																						
1	1,0 X 0,0			1,0/ 0,0 X 0,0/ 0,0			-	-	8	7	-	-	-	-	-	-	-	-	2	1		
2	1,0/1,1 X 1,0			1,0/ 1,1 X 1,0/___			-	-	2	3	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-		
3	0,9/1,0 X 1,0			0,9/1,0 X 1,0/___			-	-	1	1	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-		
4	0,9/1,0 X 0,9/1,0			0,9/ 1,0 X 0,9/1,0			3	2	2	2	-	-	4	-	-	-	-	-	-	-		

que os alelos provenientes do pai para este loco, foram detectados em proporções similares entre machos e fêmeas F1.

Nas Tabelas de números 14 a 19 estão apresentadas a análise das esterases 5 e 6 de casais e sua progênie de cruzamentos interlinhagens, estes cruzamentos foram estabelecidos entre fêmeas CG, CP e PAR e machos RP ou no sentido inverso. A análise da herança da esterase-5 foi baseada no estudo de 29 casais com uma produção de 67 fêmeas e 67 machos. Para a esterase-6 esta análise foi baseada no estudo de 30 casais que produziram 83 fêmeas e 74 machos. No conjunto, esses dados confirmaram a viabilidade dos cruzamentos interlinhagens, anteriormente já observada em cruzamentos em massa. Os dados desta análise demonstraram que o padrão de herança observado para os locos Est-5 e Est-6, em cruzamentos intralinhagem, é semelhante para progênie obtida de pais de linhagens diferentes. Entretanto, a correlação observada nos cruzamentos intralinhagens, entre os fenótipos dos machos F1 e o respectivo fenótipo apresentado pelo pai com relação a esterase-5, não foi confirmada nestes cruzamentos.



Tabela 14. Herança da esterase-5 observada em cruzamentos por casal, entre as linhagens CG e RP de *Megaselia scalaris*.

PAIS			FENÓTIPOS DA PROGENIE													
Cruzamentos F X M	Genótipos	0,9		1,0		1,1		0,0		0,9/1,0		0,9/1,1		1,0/1,1		
		F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	
CG X RP																
C1	1,1 X 0,9/1,1	1,1/___ X 0,9/1,1	-	-	-	-	4	-	-	-	-	-	-	4	-	-
C2	1,1 X 0,9/1,1	1,1/___ X 0,9/1,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-	-
C3	1,1 X 0,9	1,1/___ X 0,9/0,0	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C4	1,1 X 1,0	1,1/___ X 1,0/___	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
C5	0/0 X 0,9/1,1	0,0/0,0 X 0,9/1,1	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C6	0/0 X 1,0	0,0/0,0 X 1,0/___	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C7	0/0 X 1,0	0,0/0,0 X 1,0/0,0	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-
C8	1,0 X 1,0	1,0/___ X 1,0/___	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RP X CG																
C1	0,9 X 1,0/1,1	0,9/___ X 1,0/1,1	-	-	3-	-	-	1	-	-	1	-	-	-	-	-
C2	0,9 /1,2 X 1,0/1,1	0,9/1,2 X 1,0/1,1	-	-	-	-	-	5	-	-	3	-	-	-	-	-
C3	0,9/1,1 X 1,1	0,9/1,1 X 1,1/0,0	2	-	-	-	2	-	-	-	-	-	1	2	-	-
C4	0,9/1,0 X 1,1	0,9/1,0 X 1,1/0,0	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-

Tabela 15. Herança da esterase-6 observada em cruzamentos por casal, entre as linhagens CG e RP de *Megaselia scalaris*.

PAIS			FENÓTIPOS DA PROGENIE														
Cruzamentos F X M	Genótipos	0,9		1,0		1,1		0,0		0,9/1,0		0,9/1,1		1,0/1,1			
		F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M		
CG X RP																	
C1	0,9/1,0 X 1,0	0,9/1,0 X 1,0/___		-	-	1	2	-	-	-	-	3	2	-	-	-	-
C2	0,9/1,0 X 1,0	0,9/1,0 X 1,0/___		-	-	1	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-
C3	0,9/1,0 X 1,0/1,1	0,9/1,0 X 1,0/1,1		-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C4	1,0 X 0,0	0,9/1,0 X 0,0/0,0		-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	4	-	-	-
C5	0,9/1,0 X 1,0	0,9/1,0 X 1,0/___		-	-	1	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C6	0,9/1,0 X 1,0	0,9/1,0 X 1,0/___		-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-
C7	1,0 X 0,0	1,0/___ X 1,0/___		-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C8	1,0 X 0,0	1,0/___ X 0,0/0,0		-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RP X CG																	
C1	0,0 X 1,0	0,0/0,0 X 1,0/___		-	-	4	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C2	1,0/1,1 X 1,0	1,0/1,1 X 1,0/___		-	-	2	4	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1
C3	1,0 X 1,0	1,0/___ X 1,0/___		-	-	5	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C4	0,9 X 1,0	0,9/___ X 1,0/___		-	-	2	3	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-



Tabela 16. Herança da esterase-5 observada em cruzamentos por casal, entre as linhagens CP e RP de *Megaselia scalaris*.

PAIS			FENÓTIPOS DA PROGENIE													
Cruzamentos	Genótipos	0,9		1,0		1,1		0,0		0,9/1,0		0,9/1,1		1,0/1,1		
		F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	
CP X RP																
C1	1,0 X 1,0	1,0/___	X 1,0/___	-	-	1	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C2	1,0 X 1,0/1,1	1,0/___	X 1,0/1,1	-	-	3	2	-	-	-	-	-	-	-	-	1
C3	0,0 X 1,0/1,1	0,0/0,0	X 1,0/1,1	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-
C4	1,0 X 1,0	1,0/___	X 1,0/___	-	-	3	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-
C5	0,9 X 1,0	0,9/___	X 1,0/___	2	3	2	-	-	-	-	2	2	-	-	-	-
C6	0,9 X 1,0	0,9/___	X 1,0/___	-	-	1	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
C7	1,0/1,1 X 0,9	1,0/1,1	X 0,9/___	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-
C8	1,1 X 1,0/1,1	1,1/___	X 1,0/1,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-
RP X CP																
C1	1,0/1,1 X 0,9	1,0/1,1	X 0,0/0,0	-	-	-	-	-	-	-	-	2	3	-	-	-
C2	1,0/1,1 X 1,0	1,0/1,1	X 1,0/___	-	-	4	3	-	-	-	-	-	-	-	1	-
C3	1,0/1,1 X 1,0	1,0/1,1	X 1,0/___	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	1	-
C4	1,0/1,1 X 1,0	1,0/1,1	X 1,0/___	-	-	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabela 17. Herança da esterase-6 observada em cruzamentos por casal, entre as linhagens CP e RP de *Megaselia scalaris*.

PAIS		FENÓTIPOS DA PROGENIE														
Cruzamentos	Genótipos	0,9		1,0		1,1		0,0		0,9/1,0		0,9/1,1		1,0/1,1		
		F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	
CP X RP																
C1	0,9/1,0 X 1,0	0,9/1,0 X 1,0/___	-	-	-	1	-	-	-	-	1	3	-	-	-	-
C2	0,9/1,0 X 1,0	0,9/1,0 X 1,0/___	-	-	-	1	-	-	-	-	3	2	-	-	-	-
C3	0,9 X 1,0	0,9/___ X 1,0/___	-	-	-	1	1	-	-	-	1	1	1	-	-	-
C4	0,9 X 1,0	0,9/___ X 1,0/___	1	1	3	1	-	-	1	-	3	1	-	4	-	-
C5	0,9/1,0 X 0,9/1,0	0,9/1,0 X 0,9/1,0	-	1	-	-	-	-	-	1	3	1	-	-	-	-
C6	0,9 X 0,9/1,0	0,9/___ X 0,9/1,0	-	1	2	-	-	-	-	-	4	4	-	-	-	-
C7	0,9/1,0 X 1,0	0,9/___ X 0,9/1,0	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-
C8	0,0 X 0,9/1,0	0,0/0,0 X 0,9/1,0	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-
C9	0,9/1,0 X 1,0	0,9/1,0 X 1,0/___	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-	-
RP X CP																
C1	0,0 X 0,9/1,0	0,0/0,0 X 0,9/1,0	-	1	3	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C2	1,0 X 0,9/1,0	1,0/___ X 0,9/1,0	-	-	3	2	-	-	-	-	2	1	-	-	-	-
C3	0,9/1,0 X 0,9/1,0	0,9/1,0 X 0,9/1,0	-	-	1	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-
C4	1,0 X 0,9/1,0	1,0/___ X 0,9/1,0	-	-	-	1	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-



Tabela 18. Herança da esterase-5 observada em cruzamentos por casal, entre as linhagens PAR e RP de *Megaselia scalaris*.

PAIS		FENÓTIPOS DA PROGENIE									
Cruzamentos	Genótipos	1,0		1,2		0,0		1,0/1,1		1,0/1,2	
		F	M	F	M	F	M	F	M	F	M
PAR X RP											
C1	1,0 X 1,0/1,2	1,0/___ X 1,0/1,2	-	5	-	-	-	-	-	2	-
C2	0,0 X 1,0	0,0/0,0 X 1,0/___	5	4	-	-	-	-	-	-	-
C3	0,0 X 1,0/1,2	0,0/0,0 X 1,0/1,2	1	4	5	-	-	-	-	-	-
C4	1,0 X 1,0	1,0/___ X 1,0/___	1	1	-	-	-	-	-	-	-
RP X PAR											
C1	1,0 X 1,0	1,0/0,0 X 1,0/0,0	-	3	-	-	1	1	-	-	-
C2	1,0 X 1,0	1,0/___ X 1,0/___	3	5	-	-	-	-	-	-	-

Tabela 19. Herança da esterase-6 observada em cruzamentos por casal, entre as linhagens PAR e RP de *Megaselia scalaris*.

PAIS			FENÓTIPOS DA PROGENIE									
Cruzamentos		Genótipos	1,0		1,1		0,0		0,9/1,1		1,0/1,1	
F	X M		F	M	F	M	F	M	F	M	F	M
PAR X RP												
C1	1,0/1,1 X 0,0	1,0/1,1 X 0,0/0,0	2	2	-	3	-	-	-	-	-	-
C2	1,0/1,1 X 1,0	1,0/1,1 X 1,0/___	1	-	2	-	-	-	-	-	2	4
C3	1,0/1,1 X 0,0	1,0/1,1 X 0,0/0,0	4	4	2	-	-	-	-	-	-	-
C4	0,0 X 1,0	0,0/0,0 X 1,0/___	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-
RP X PAR												
C1	0,0 X 1,0	0,0/0,0 X 1,0/___	1	4	-	-	-	-	-	-	-	-
C2	1,0 X 1,0/1,1	1,0/___ X 1,0/1,1	2	3	-	2	-	-	-	-	1	-

IV. DISCUSSÃO

No gênero *Megaselia* estão incluídas aproximadamente a metade das 2600 espécies de forídeos descritas atualmente. Este gênero é abundante em muitas regiões do mundo, desenvolvendo-se em uma grande variedade de ambientes (Robinson, 1971). Dentre as espécies incluídas neste gênero, *Megaselia scalaris* é considerada a mais polífaga e cosmopolita de todas, ocorrendo em regiões de clima tropical e subtropical.

O estudo deste inseto é de interesse médico-sanitário devido ao fato desta espécie causar vários tipos de miíases humanas (Trape *et al.* 1982; Singh & Rana 1989 e Singh *et al.* 1988). Além disso, por desenvolver-se bem sobre matéria orgânica em decomposição e estar muito bem adaptada a ambientes modificados pelo homem, inclusive o ambiente doméstico, esta espécie é considerada veículo de outros agentes patogênicos. *Megaselia scalaris* também é considerada praga para algumas culturas de interesse econômico. Por outro lado, foi observado em testes no laboratório e no campo, que *Megaselia scalaris* ocasionalmente alimenta-se em carrapatos engorgitados (Garris, 1983; Rocha *et al.* 1984). Entre esses, a espécie *Amblyomma variegatum* é causadora de prejuízos consideráveis para os agropecuáristas por ser o transmissor de doenças que afetam o gado (Barré *et al.* 1991). Esses autores sugerem que *Megaselia scalaris* poderia potencialmente ser utilizada no controle biológico deste carrapato. Apesar das considerações acima, há poucos trabalhos na literatura enfocando aspectos biológicos, genéticos ou bioquímicos de *Megaselia*.

No laboratório, *Megaselia scalaris* está perfeitamente adaptada às condições utilizadas para a manutenção de *Drosophila* (Trumble & Pienkowski, 1979). Entretanto, alguns autores descrevem a suplementação deste meio com extrato de levedura e cogumelos (Mainx, 1964) e com fígado ou carne (Johnson *et al.* 1988), já que *Megaselia* requer uma dieta com um maior teor proteico. Outros meios descritos para o seu cultivo incluem ágar e sangue (Tunrasvin *et al.*, 1977) ração para peixes (Macieira *et al.*, 1983) e ração para camundongos (Silva, 1991). Vetorazzi (1993) utilizou meio para *Drosophila* à base de fubá e araruta para o estudo de componentes do valor adaptativo em populações de *Megaselia scalaris*, mantidas pela técnica de transferência seriada. A autora mostrou que a suplementação proteica proporciona uma explosão no número de larvas, inviabilizando os experimentos de estudos populacionais em garrafas. Neste trabalho optamos por utilizar o meio de fubá-araruta pois, as linhagens CG e CP mantidas em laboratório há muitos anos e utilizadas pela autora (op. cit), já vinham sendo mantidas neste meio. Para experimentos em tubo, utilizamos o meio para *Drosophila* à base de banana e ágar por ser mais homogêneo e duradouro,



facilitando a manipulação dos tubos e impedindo que as moscas morressem ao entrarem em rachaduras, as quais são freqüentes em tubos como meio de fubá-araruta.

O ciclo biológico de *Megaselia scalaris* já foi estudado por vários autores em diferentes meios de cultura, temperatura, fotoperíodo e umidade relativa.

Mainx (1964) observou, a 28°C, um período de desenvolvimento ovo-imago de 18 dias para os machos e de 20 dias para as fêmeas de *Megaselia scalaris*, mantidos em meio suplementado com extrato de leveduras e cogumelos. El-Miniawi & Moustafa (1965) acompanharam o desenvolvimento desta espécie a 27°C em meio suplementado com alimento para bebês (papa de cenouras) e observaram que a duração da fase larval foi de 4 a 6 dias para os machos e de 5 a 7 dias para as fêmeas e o período de pupa foi de aproximadamente nove dias. O tempo de desenvolvimento total observado pelos autores foi de 13 a 15 dias para os machos e de 14 a 16 dias para as fêmeas.

Os estudos de Tumrasvin *et al.* (1977) revelaram que em meio ágar-sangue a 27°C, o tempo de desenvolvimento total para *M. scalaris*, foi de 14 a 20 dias para os machos e de 16 a 24 dias para fêmeas. A passagem pelos três estádios de larvas levou de 5 a 9 dias, já a fase de pupa requereu de 7 a 9 dias.

Trumble & Pienkowski (1979) estudaram o tempo de desenvolvimento de *Megaselia scalaris* utilizando meio comercial para *Drosophila* e mantendo os experimentos em 21, 27 e 32°C com fotoperíodos de 12/12 horas ou 16/8 horas. Nos experimentos a 27°C os resultados médios obtidos foram 6,85 dias para o período larval, 10,45 dias para a fase de pupa, sendo que o desenvolvimento total levou aproximadamente 17 dias. Os autores concluíram que o tempo de desenvolvimento é significativamente influenciado pela temperatura, sendo que a velocidade de desenvolvimento é acelerada com o seu aumento. Em relação aos fotoperíodos não foi observada nenhuma diferença significativa.

Prawirodisastro & Benjamin (1979) estudaram a influencia das temperaturas de 15, 20 e 25°C na velocidade de desenvolvimento de *Megaselia scalaris*. A duração do período embrionário foi de 16,3 horas a 25°C. Nas temperaturas de 20 e 15°C este período foi mais longo, 26,4 e 47,8 horas, respectivamente. A duração da fase de larva variou de 7,3 para 10,6 até 19,7 dias nas temperaturas 25, 20 e 15°C. O período de pupa foi de 9,8 e 17,6 dias nas temperaturas 25 e 20°C. No experimento mantido a 15°C os autores não observaram nenhuma eclosão das moscas até 45 após a pupação. Estes trabalhos mostram que o tempo de desenvolvimento é amplamente influenciado pela temperatura. Experimentos realizados em temperaturas mais elevadas, diminuem o período ovo-imago, como pode ser observado nos estudos de Trumble &



Pienkowski (1979) e Pravirodisastro e Benjamin (1979). Entretanto, à 32°C ocorreu um acentuado aumento da mortalidade nos períodos larvais e de pupa, levando a uma redução do número de moscas adultas (Trumble & Pienkowski, 1979).

Nossos dados são comparáveis com os trabalhos citados acima, ressaltando-se algumas diferenças que podem ser atribuídas aos diferentes meios de cultura utilizados e/ou temperatura. Em experimentos mantidos a 25°C com meio de fubá-araruta observamos que a média do tempo de desenvolvimento total para duas linhagens (CG e PAR) de *Megaselia scalaris* foi de 21,5 dias para fêmeas e 19,2 dias para machos. O tempo médio correspondente ao período embrionário foi de 20,7 horas e para fase larval foi de 6,9 dias. Para a fase de pupa encontramos uma média de 11,7 dias para os machos e 13,6 dias para as fêmeas (Tabela 2).

Certamente a temperatura afeta a duração do ciclo biológico total, entretanto este não é, provavelmente, o único fator. Conforme Johnson *et al.* (1988) a manutenção de *Megaselia scalaris* em meio de *Drosophila* suplementado com carne ou fígado aumenta a razão de velocidade do desenvolvimento. Benner & Ostermeyer (1980) também consideram que o teor proteico do meio de cultura influencia a duração do tempo de desenvolvimento de *Megaselia scalaris* mas não altera seu padrão de eclosão, sendo que a emergência de machos é sempre anterior à de fêmeas. Esta particularidade também foi observada por Semenza (1953) cujos resultados mostraram um desenvolvimento mais rápido de pupas que dariam origem a machos do que aquelas que originavam as fêmeas. Neste trabalho encontramos resultados semelhantes sendo que o desenvolvimento médio de machos na fase de pupa (11,7 dias) foi mais rápido do que aquele apresentado por fêmeas nesta mesma fase (13,6 dias), ocorrendo uma eclosão anterior dos machos em relação às fêmeas (19,2 dias para os machos e 21,5 dias para as fêmeas). Diferenças no tempo de desenvolvimento entre os sexos nas fases de larvas não foram consideradas neste trabalho, por não existirem características distintas que pudessem ser utilizadas para se inferir, com certeza, o sexo. Entretanto alguns autores fazem referência sobre diferenças do tempo de desenvolvimento entre os sexos para estas fases (Semenza, 1953; El-Miniawi & Moustafa, 1965; Bener & Ostermeyer, 1980), afirmando que os períodos referentes a estas fases são menores em indivíduos que originaram machos comparados àqueles que originaram fêmeas. Os autores obtiveram tais resultados mantendo registros por indivíduo, separadamente, ou baseando nas diferenças de tamanho e/ou peso de larvas e pupas, com aproximadamente a mesma idade, para separá-las por sexo. Para Bener & Ostermeyer (1980), o menor tempo de desenvolvimento dos machos tem um significado biológico, levando a uma dispersão dos mesmos e diminuindo a possibilidade de endocruzamentos em populações naturais.



Em *Megaselia scalaris* pode ser observado um acentuado dimorfismo sexual, sendo que os machos têm, praticamente, a metade do tamanho das fêmeas. Essas diferenças de tamanho entre os sexos, também observadas nos estudos de biomassa de Vetorazzi (1987), foi confirmada pela análise do conteúdo proteico realizada neste trabalho. Os dados desta análise mostraram que, para as duas linhagens estudadas, as fêmeas possuem cerca de 2,6 vezes mais proteína do que os machos, o que provavelmente está relacionado ao seu tamanho corpóreo. Conforme Benner & Ostermeyer (1980), as fêmeas de *Megaselia scalaris* exibem maior tamanho, além de apresentarem tempo de desenvolvimento mais longo e maior longevidade, que podem ser conseqüências do processo adaptativo, devido ao grande esforço reprodutivo apresentado por elas.

Uma outra correlação positiva pode ser feita entre os resultados da análise do conteúdo proteico e aqueles obtidos por Zanon (1988). No seu trabalho a autora mostrou que existem diferenças significativas entre o comprimento e a largura de pupas machos e fêmeas. Tais diferenças entre o tamanho das pupas dos dois sexos podem, portanto, refletir proporções desiguais de proteína. Em média a quantidade de proteína em pupas pretas fêmeas (PPF) é cerca de duas vezes e meia maior que nas pupas pretas machos (PPM). Quando analisamos o conteúdo proteico de pupas amarelas obtidas para as duas linhagens, a diferença entre as médias foi altamente significativa pelo teste t de Student ($t=8,69$ para $p<0,01$), para diferenças entre médias. Este fato poderia estar relacionado à análise de amostras de pupas que apresentavam diferenças de tamanho e peso, apesar de estarem com o mesmo tempo de desenvolvimento. Tais diferenças podem ser devidas ao sexo.

O presente trabalho refere-se ao primeiro estudo de sistemas enzimáticos em *Megaselia scalaris*. A escolha das esterases baseou-se na ampla distribuição destas enzimas, aliada ao fato de que as mesmas têm sido muito estudadas em várias classes de insetos. Como já salientado na Introdução, as esterases nos insetos estão envolvidas em várias atividades fisiológicas importantes. Outro aspecto que merece ser ressaltado é o elevado grau de polimorfismo observado para as esterases nos insetos, notadamente naquelas que participam de processos digestivos e de desintoxicação, o que favoreceria a adaptação dos mesmos a diferentes meios (Johnson, 1974).

Nossos resultados mostraram um elevado número de bandas esterásicas nas fêmeas e nos machos das quatro linhagens de *Megaselia scalaris*. Na linhagem CG pudemos identificar até 33 bandas nas fêmeas e 28 nos machos. Em CP esses números corresponderam a 32 e 29. Para a linhagem RP, foram observadas 35 e 34 bandas e, na linhagem PAR 36 e 34 respectivamente, nas fêmeas e machos. Esses números estão entre os mais altos já encontrados para



esterases em insetos, detectadas através de eletroforese em gel de poliacrilamida e foram, tentativamente, correlacionados a locos gênicos responsáveis pela síntese dessas enzimas. Os locos que codificam para as esterases têm sido amplamente investigados em insetos. Os primeiros trabalhos neste tópico foram realizados por Wright (1963) e por Beckman & Johnson (1964) que descreveram seis bandas esterásicas em homogenatos de *Drosophila melanogaster*, e observaram que duas dessas enzimas apresentavam variações polimórficas.

Em *Drosophila dunni*, Carrasco *et al.* (1984) detectaram seis bandas esterásicas que foram atribuídas a cinco locos gênicos, sendo pelo menos dois deles polimórficos. Em *D. buzzatti* 20 bandas esterásicas foram detectados em gel de poliacrilamida na fase adulta, sendo que uma enzima adicional foi observada na fase larval (East, 1981). Para o autor, tanto a principal enzima da fase adulta quanto a enzima larval apresentaram variações alélicas.

Ceron (1988) demonstrou para *Drosophila mulleri* e *D. arizonensis* (atualmente *D. arizonae*), a ocorrência de 8 locos gênicos que codificam para esterases nas fêmeas e 10 nos machos. O autor também relacionou locos exclusivos de cada espécie, além de dois locos observados apenas nos machos. Em *D. melanogaster*, Healy *et al.* (1991), utilizando técnicas de eletroforese e de focalização isoeletrica, descreveram 23 esterases as quais foram correlacionadas a 19 locos gênicos.

Lapenta *et al* (1995) detectaram 43 bandas esterásicas em oito linhagens isofêmeas, sendo quatro de *Drosophila serido*, duas de *D. koepferae*, uma de *D. siriema* e uma de *D. buzzatii*, evidenciando a existência de pelo menos três locos gênicos constantes em todas as espécies. A comparação da ocorrência de bandas comuns e/ou restritas a linhagens da superespécie *D. serido* serviram para quantificar o "status" de diferenciação entre as mesmas.

Em outros insetos, variações no número de locos e na proporção de locos polimórficos para as esterases também foram descritas. Jones & Brancoft (1986) observaram 12 bandas esterásicas que foram correlacionadas a cinco locos gênicos, sem distinção de sexo em *Anthonomus grandis*. Já em *Lucilia cuprina* (diptera), pelo menos 16 bandas foram observadas, sendo proposto que, no mínimo, pelo menos sete locos eram responsáveis pelo padrão observado (Hughes & Raftos, 1985 apud Lai-Fook & Smith, 1992). Desse total, a hemolinfa respondia por 10 das bandas observadas, as quais eram codificadas por dois locos polimórficos.

Em *Spodoptera frugiperda* (lepidoptera), Lima & Contel (1990) descreveram três sistemas esterásicos dois dos quais apresentaram variações alélicas com a detecção de seis alelos para um dos locos. Num estudo envolvendo 12 populações naturais de *Zaprionus indianus* (um díptero relacionado à



Drosophila), Parkash & Yadar (1993) demonstraram a existência de uma elevada variação genética em sete locos esterásicos. Segundo os autores essa variabilidade mostrou uma correlação positiva com os hábitos alimentares e condições climáticas das populações estudadas.

Lima-Catelani (1996), através de eletroforese em gel de poliacrilamida, detectou 19 e 22 bandas com atividade esterásica, em duas populações de *Aedes aegypti* de diferentes localidades geográficas. Em o *Aedes albopictus*, essa autora observou 20 bandas esterásicas. Entretanto, nenhuma correspondência foi estabelecida entre as bandas de ambas as espécies.

Como já anteriormente citado, esterases representam um grupo de enzimas altamente polimórficas provavelmente devido à grande variabilidade de substratos sobre os quais atuam. Na natureza, os insetos estão adaptados a uma variada gama de ambientes que promovem mudanças nas funções fisiológicas e bioquímicas, o que pode estar refletido no alto grau de polimorfismos dessas enzimas.

Em *Megaselia scalaris*, identificamos 20 locos esterásicos. Dentre estes, o grau de polimorfismo foi maior nas linhagens RP (55%) e PAR (65%) do que nas linhagens CG (45%) e CP (49,5%). O grau mais elevado de polimorfismo presente nas linhagens RP e PAR pode estar relacionado ao fato destas linhagens terem sido coletadas mais recentemente do que as linhagens CG e CP, mantidas no laboratório há mais de 10 anos. Essas linhagens veêm se adaptando às condições constantes de temperatura, umidade, densidade e tipo de alimento, há mais tempo do que as duas primeiras. Entretanto, o X^2 para homogeneidade (Tabela 9) foi altamente significativo quando realizado para a comparação do polimorfismo de cada loco esterásico entre as quatro linhagens, demonstrando que a variabilidade dentro de cada loco nas quatro linhagens ainda é alta.

Conforme Wagner & Selander (1974), o estudo da variação gênica em 19 populações de *Drosophila* revelaram a existência de 11 a 33 locos polimórficos, apresentando uma heterozigose média 14,5%. Spicer & Fleming (1991) estudaram o polimorfismo proteico em sete populações de *D. melanogaster* com distribuições geográficas distintas, através da eletroforese bi-dimensional. Dos 611 pontos proteicos demonstrados pela técnica, 90 foram variáveis entre as populações, indicando um índice médio de similaridade, ao nível proteico, de 0,965.

Krafsur et al. (1992) utilizaram eletroforese em gel de poliacrilamida para separar 73 locos enzimáticos em populações naturais de *Musca domestica*. Do total de locos observados 39 foram considerados polimórficos (53%) e a heterozigose média foi estimada, entre 34 destes locos, em aproximadamente 16%.



Krafsur e Black IV (1992) demonstraram que 62% dos 50 locos aloenzimáticos são polimórficos em *Musca autumnalis*, dos quais a heterozigose média calculada foi de 18%. Krafsur (1993) utilizando a mesma técnica para o estudo da *Stomoxys calcitrans* (L.), espécie hematófaga conhecida como mosca do estábulo, detectou 38 locos que codificam várias aloenzimas; destes, 20 foram polimórficos (52,6%) com uma heterozigose de 9% por loco.

Krafsur *et al.* (1995) demonstraram a diversidade gênica de isoenzimas em populações de *Chrysomela scripta* (coleóptera). Dos 38 locos interpretados 22 foram polimórficos. A heterozigose média por loco foi de 20%. O alto índice de polimorfismos apresentados pelos coleópteros foi relacionado à seleção neutra e grande tamanho efetivo destas populações. Taylor *et al.* (1996) estudaram a variabilidade em populações *Cochliomyia hominivorax* coletadas no Brasil. Dos 13 locos estudados oito foram polimórficos (61%), com índice de heterozigose de 15%.

Em *Megaselia scalaris*, a heterozigose média foi estimada em 22% para a linhagem CG, 26% para CP, 24% em RP e 19% em PAR. Esses valores são superiores àqueles encontrados para várias espécies de *Drosophila* (Wagner & Selander, 1974), para as quais foram relatados valores entre 5 a 22%. Uma possível explicação para este fato, talvez, seja a elevada variabilidade dos locos esterásicos de *Megaselia*, associada a seus hábitos polífagos.

De acordo com Ayala (1965), a manutenção de populações de *Drosophila* em garrafas, onde o espaço e o alimento são limitados, levaria à competição intraespecífica e a seleção atuaria favorecendo genótipos adaptados a estas condições. Portanto, para as linhagens CG e CP, o processo seletivo que promove adaptação às condições constantes em que são mantidas, está atuando há mais tempo, promovendo diferenças no padrão de polimorfismo de esterases. Por outro lado, a homeostase, definida como a propriedade que um organismo ou população tem de equilibrar sua composição genética e de resistir a modificações súbitas do ambiente, poderia estar ocorrendo de maneira mais acentuada nas linhagens RP e PAR, mantendo uma taxa maior de polimorfismo.

A especificidade das bandas esterásicas foi primeiramente verificada pela utilização do α e do β acetatos separadamente. Johnson *et al.* (1966) afirmaram que a especificidade ao alfa ou beta-naftil acetato é fracamente definida, de modo que, se esses substratos são usados separadamente em géis de uma mesma espécie, são obtidos padrões de bandas semelhantes e nenhuma especificidade é detectada.

Em *Megaselia scalaris*, observamos que a maioria das esterases é capaz de hidrolisar ambos os substratos. Entretanto, existe uma variação de intensidade de algumas bandas esterásicas, o que poderia ser relacionado a uma



atividade mais acentuada de algumas dessas enzimas atuando preferencialmente sobre um dos substratos, ou a quantidades diferentes das enzimas presentes nas amostras. Por exemplo, as bandas 2, 3, 14, 15, 16 e 17 coram-se melhor quando a solução de coloração é preparada com o β naftil-acetato, mostrando que estas enzimas atuam preferencialmente sobre este substrato. Já as bandas 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 41 e 42 apresentam-se mais coradas, pelo α naftil acetato, mostrando hidrolisá-lo preferencialmente. Também foi possível demonstrar através da coloração por substratos, em separado, que as esterases referentes às bandas 1, 27, 38 e 39 possuem atividade específica ao β -naftil acetato. Lima-Catelani (1996) demonstrou, da mesma forma, bandas que são coradas apenas pelo β -naftil em *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. Conforme Carrasco *et al.* (1984), soluções de coloração com o α ou β -naftil acetatos, preparados conjuntamente, proporcionam boas resoluções e revelavam diferenças na especificidade aos substratos.

Neste trabalho, verificamos a relação de especificidade frente aos diferentes substratos comparando-se as mesmas amostras coradas por α e β naftil-acetato e por α e β naftil-butirato, sendo todos esses substratos fornecidos em proporções iguais. Conforme Healy *et al.* (1991), o comprimento da cadeia da porção ácida dos esteres influencia a habilidade da enzima em hidrolizá-lo. Os autores testaram três substratos: o naftil acetato, o naftil propionato e o naftil butirato, em 22 esterases de *Drosophila melanogaster*. Observaram que, embora muitas enzimas pudessem atuar sobre os três substratos, a maioria utilizou-os diferencialmente. Em geral, ocorreu preferência ao éster de cadeia mais curta. Entretanto, foi possível diferenciar algumas enzimas com atividades específicas aos outros dois ésteres.

Em *Megaselia scalaris* identificamos a EST-4 (banda número 8) como específica ao α ou β naftil-acetato, pois nenhuma atividade desta enzima foi detectada em géis corados com os ésteres do butirato. Atividades diferenciadas foram observadas para as esterases 1, 2, 3 e 12 (bandas 1, 4, 5, 6, 7, e 28 dos zimogramas) as quais apresentaram-se mais acentuadamente coradas quando o α naftil-acetato foi utilizado como substrato, indicando preferência por este éster de cadeia mais curta. As esterases 1A, 6 e 9 (bandas 2, 13 a 17 e 23) que se coram geralmente em vermelho em géis tratados com o α e o β naftil-acetato em conjunto, não apareceram em géis corados utilizando-se o α e o β naftil-butirato como substratos, mostrando assim especificidade ao éster de cadeia curta, na posição β . As enzimas que não apresentaram preferência pelo α ou pelo β naftil em particular (α/β -esterases), esterases 14, 15 e 16 (bandas 31, 32, 35 e 36) apresentaram atividade apenas frente ao α naftil-butirato, quando esses dois substratos foram adicionados à solução de coloração.



Podemos ainda ressaltar, quanto à atividade de algumas esterases, as diferenças na intensidade de coloração dessas enzimas, observadas entre machos e fêmeas. Por exemplo a EST-6 (bandas 13 a 17) possui uma atividade marcante nas fêmeas aparecendo fortemente corada e, mais fraca nos machos, revelada por uma coloração tênue. Já as EST-12 (banda 28) e a EST-18 (bandas 40 a 41) apresentam-se com maior atividade nos machos, sendo bandas bem delimitadas e fortemente coradas.

Polyakova & Korochkin (1986) observaram variações individuais de intensidades das bandas esterásicas em várias espécies de *Drosophila* do grupo *virilis*, atribuindo-as a peculiaridades fisiológicas dos indivíduos. Ceron (1988) e Lapenta (1995) observaram um aumento de intensidade de coloração em bandas esterásicas, refletindo variações na quantidade das enzimas. A maior atividade de algumas bandas foram observadas em híbridos interespecíficos e foram relacionadas à soma das expressões dos dois genes das duas espécies.

Em *Megaselia scalaris*, as diferenças de atividade das esterases EST-6, EST-12 e EST-18 entre os sexos podem estar relacionadas a atividades fisiológicas diferentes. Em *D. melanogaster* já está bem estabelecido o papel fisiológico importante na reprodução desempenhado pela EST-6, uma enzima predominantemente encontrada nos machos.

A utilização de inibidores é uma das principais maneiras de classificação das esterases em insetos e outros organismos. As carboxilesterases são conhecidas como serino hidrolases fortemente inibidas por compostos organofosforados. Por outro lado essas enzimas são relativamente resistentes quando tratadas com carbamatos (carbaril, eserina, prostigmina, etc.) ou inibidores de grupos sulfidrilas, como o PCMB (Murthy & Veerabhadrapa, 1996).

Um papel importante das carboxilesterases na prevenção do envenenamento por organofosforados no homem e outros mamíferos, foi salientado por Maxvell (1992). A reação das carboxilesterases e butirilcolinesterases do soro com os inseticidas organofosforados reduz a quantidade do produto tóxico que pode atuar sobre a acetilcolinesterase do sistema nervoso central. Assim, carboxilesterases e butirilcolinesterases do soro seriam inibidas pelos organofosforados, mas ao mesmo tempo, serviriam como uma barreira de proteção para o SNC. As carboxilesterases e as butirilcolinesterases seriam enzimas "seqüestrantes" dos organofosforados. Isso explicaria, por exemplo, por que os aplicadores de inseticidas que apresentam baixos níveis de butirilcolinesterases (pseudocolinesterases do soro) são mais sensíveis ao envenenamento por organofosforados.



Entre as esterases dos imagos de *Megaselia scalaris* (Tabela 10), pelo menos sete apresentaram forte inibição pelo malathion (organofosforado) mas não foram significativamente inibidas pela eserina. Essas enzimas correspondem às esterases 5, 10, 14, 15, 16, 17, 18, e por isso consideradas pertencentes à classe das carboxilesterases.

Acetilcolinesterases são, por sua vez, inibidas pelos organofosforados e por carbamatos (eserina e outros).

As esterases 12 e 19 foram inibidas pelo malathion, eserina, prostigmina e, em menor escala, PMSF (Tabela 10). Esses dados indicam fortemente que essas enzimas sejam acetilcolinesterases. A esterase 12 foi observada em 100% dos indivíduos nas quatro linhagens. Além disso apresentou atividade para o α naftil acetato, fato comum às acetilcolinesterases de outros insetos. Outra característica marcante é a sua inibição pela eserina e prostigmina, que são considerados inibidores específicos das colinesterases.

Um único loco gênico, denominado *Ace*, é responsável pela síntese da acetilcolinesterase em insetos. Sua expressão nesses organismos localiza-se exclusivamente nas células do sistema nervoso central, sendo que a proteína formada apresenta uma especificidade intermediária entre as acetilcolinesterases e as butirilcolinesterases encontradas nos vertebrados. O gene *Ace* de *Drosophila melanogaster* já foi clonado (Hall & Spierer, 1986) e sua expressão verificada em *Drosophila* e em oocistos de *Xenopus* (Hoffmann *et al.*, 1992 ; Fournier *et al.*, 1992). Embora um único gene seja responsável pela codificação da acetilcolinesterase nos insetos, várias formas moleculares diferentes desta enzima foram observadas. Em *Drosophila melanogaster*, Healy *et al.* (1991) mostraram a existência de quatro isoenzimas para acetilcolinesterase em cérebros de larvas e de moscas adultas. No besouro da batata (*Leptinotarsa decemlineata*), foram purificadas duas formas moleculares diferentes para esta enzima, constituída de dois dímeros com pesos moleculares e pontos isoelétricos iguais, mas com propriedades hidrofílicas diferentes (Zhu & Clark, 1994). Em outro inseto, *Lygus hesperus* (hemíptera) formas moleculares monoméricas e diméricas para a acetilcolinesterase já haviam sido identificadas (Zhu & Bundley, 1992).

Em *Megaselia scalaris* (Tabela 10), além da esterase-12, classificada como acetilcolinesterase, também a esterase-19 apresenta propriedades que sugerem ser esta enzima, uma segunda colinesterase. Esta enzima poderia ser originada de um segundo loco para acetilcolinesterase, ou corresponder a uma forma molecular diferente da esterase-12, ambas codificadas pelo mesmo gene. Considerando os dados obtidos para outros insetos, acreditamos que a segunda



interpretação seja a mais correta. Nesse caso, a esterase-19 não seria codificada por um loco específico.

Algumas esterases de *Megaselia scalaris* também foram inibidas pelo PMSF. As esterases 6 e 15 apresentaram inibição total. Já as esterases 14, 16 e 19 foram quase que totalmente inibidas nas mesmas condições experimentais. O PMSF é um reconhecido inibidor de serino-proteases, podendo também inibir outras hidrolases cuja ação catalítica depende de um resíduo de serina no centro ativo. As carboxilesterases e colinesterases fazem parte deste segundo grupo de enzimas. Portanto, os resultados obtidos com o PMSF reforçaram, em alguns casos, a classificação de algumas esterases de *Megaselia* como carboxilesterases ou colinesterases. Entretanto outras esterases, que tentativamente classificamos como carboxilesterases, não foram inibidas por este composto, talvez em função da estrutura tridimensional dessas enzimas que formam seus centros ativos inacessíveis ao PMSF. Dentre as esterases de *Megaselia scalaris*, a esterase-6 foi a única que demonstrou uma sensibilidade quase que exclusiva ao PMSF, não sendo inibida pelo malathion ou PCMB. Esta enzima foi detectada em todas as fases do desenvolvimento nas duas linhagens analisadas, indicando um papel fisiológico importante. Uma atividade enzimática que poderia corresponder ao papel da esterase-6, seria o de uma enzima proteolítica com função digestiva ou de desintoxicação. Uma evidência indireta para esta suposição seria o fato de que esta enzima foi inibida pelo PMSF, um potente inibidor de serino proteases.

As esterases 2, 3 e 4 poderiam ser consideradas arilesterases pelo fato de terem sido inibidas pelo PCMB e no caso da esterase-4 também pelo sulfato de cobre. Os dados da Tabela 10 também indicam que a esterase-8 poderia ser tentativamente considerada uma acetilesterases, já que não foi inibida por nenhum dos compostos testados.

Várias hidrolases apresentam padrões específicos de expressão no desenvolvimento dos insetos, desempenhando atividades importantes. Por exemplo, Takarashi *et al.* (1992) detectaram um aumento da síntese de uma proteínase nos ovários das fêmeas de *Bombyx mori* que ocorria durante a transição pupa-imago e posteriormente era depositada nos ovos. A função desta proteínase seria a degradação da vitelina nos ovos fertilizados, suprimindo o desenvolvimento do embrião.

Outro exemplo, já amplamente demonstrado, é a função das esterases do hormônio juvenil que são sintetizadas em períodos específicos do desenvolvimento dos insetos e que desempenham funções importantíssimas no processo de metamorfose. Um trabalho mais recente, embora não envolva uma enzima em particular, refere-se à não deposição das catecolaminas e escurecimento



do puparium de *Ceratitis capitata*, levando à formação de "pupas brancas". Provavelmente esse fenômeno esteja relacionado à ausência de uma proteína específica desta fase do desenvolvimento e que é responsável pelo transporte das catecolaminas da hemolinfa para a cutícula da pupa (Wappner *et al.* 1995).

O padrão de esterases no desenvolvimento das linhagens CG e PAR de *Megaselia scalaris* mostraram que algumas esterases tiveram uma expressão constante durante todo o ciclo, como por exemplo a esterase-6, já mencionada anteriormente. Esta enzima foi detectada com atividade acentuada desde larvas de 1º estágio até adultos. Outra enzima que apresentou uma atividade constante ao longo do desenvolvimento foi a esterase-12, já identificada como acetilcolinesterase. Esta enzima apresentou uma atividade muito mais baixa em larvas de 3º estágio em comparação com o estágio de pupas ou adultos (Figura 14). Não temos uma explicação para este fato. Talvez, o grau de complexidade do sistema nervoso central dos adultos seja maior do que no estágio larval, exigindo uma maior atividade (ou concentração) desta enzima. Também detectamos uma atividade muito maior da EST-12 nos machos em relação às fêmeas, embora as fêmeas apresentem um conteúdo proteico maior. Já foi observado que em testes de bioensaios para inseticidas organofosforados, os machos de *Megaselia scalaris* mostraram-se muito mais sensíveis do que as fêmeas (Qadri, 1969).

Em larvas de 1º e 2º estágios detectamos uma esterase específica destas fases, indicada pelas setas nas Figuras 12 e 13. Não há correspondência desta enzima nas demais fases larvais.

Para larvas de 3º estágio podemos observar uma atividade acentuada da esterase-15, uma carboxilesterase inibida pelo malathion e PMSF. Esta enzima tem sua atividade diminuída na fase de pupa, tornando-se constante em baixos níveis nos adultos. Uma possibilidade para a função desta enzima seria atuar, em conjunto com a esterase-14, nos processos de metabolização da cutícula.

As linhagens CG e PAR apresentaram algumas bandas com atividade esterásica nos casulos vazios. Essas enzimas foram tentativamente numeradas como EST-5 (cas), EST-10 (cas) e EST-14 (cas), com base na posição das esterases detectadas nos adultos. Essa designação tem uma finalidade meramente classificatória porque não podemos afirmar se as enzimas observadas nos casulos vazios são as mesmas já descritas para as moscas adultas. De todo modo, essas enzimas parecem ser sintetizadas pelo organismo (na fase de pupa) e então acumuladas no tegumento ou cutícula do casulo (Figuras 16 e 17). Além disso a solubilização das enzimas dos casulos com desoxicolato de sódio e/ou triton X-100 indica que as mesmas estejam associadas à matriz lipídica do casulo, constituída principalmente de lipídios, proteínas e queratina. Essas enzimas às vezes podem



ser fracamente detectadas nos adultos (Figura 17, amostras 12 e 15), onde talvez estejam associadas à cutícula. Enzimas encontradas nos casulos foram detectadas pela primeira vez em *Drosophila pseudoobscura* por Berger & Canter (1973). Esses autores descreveram as propriedades de um grupo de enzimas que se posicionavam na região anódica dos géis e que apresentavam atividade máxima nas pupas. Essas enzimas também podiam ser detectadas nos casulos vazios, após a eclosão da mosca. Além disso, os autores acima sugeriram que essas esterases poderiam ser de ocorrência geral desde que foram detectadas em outras espécies de *Drosophila* filogeneticamente não relacionadas. Estudos de Ceron (1988) mostraram a presença de esterases específicas da fase de pupa detectadas nos casulos de *D. mulleri* e *D. arizonae* (Mani, resultados não publicados) que poderiam assemelhar-se àquelas já descritas por Berger e Canter (1973).

Os autores acima citados postularam que, nos insetos, poderia existir um grupo de enzimas esterásicas cuja função seria facilitar o processo de muda, através da digestão da cutícula da pupa. Esse conjunto de enzimas parece ter grande semelhança com as enzimas da muda dos lepidópteros.

As enzimas que identificamos nos casulos vazios de *Megaselia scalaris* parecem enquadrar-se nessa categoria. Além disso o comportamento frente a inibidores apresentado pelas mesmas foi essencialmente similar ao descrito para *Drosophila pseudoobscura*. As enzimas dos casulos não foram inibidas por agentes mercuriais nem por eserina, sendo completamente inibidas pelo malathion e em parte pelo PMSF. Esses dados indicam que as esterases do casulo de *Megaselia scalaris* podem ser classificadas como carboxilesterases, contendo serina em seus centros ativos.

A cutícula dos insetos é constituída principalmente por fibras de quitina associada a uma matriz proteica e lipídica. A purificação e seqüenciamento de algumas proteínas cuticulares em várias ordens de insetos, tem demonstrado uma grande similaridade em suas seqüências de aminoácidos, indicando um papel estrutural importante para as mesmas (Jensen et al., 1997; Andersen et al., 1997). Outros trabalhos têm mostrado a presença de enzimas associadas à cutícula larval e pupal, envolvidas no processo de esclerotização e defesa dos insetos (Andersen, 1989). As atividades quitinolíticas e proteolíticas associadas aos processos de muda já estão bem estabelecidas nos insetos. Em *Manduca sexta*, Brookhart & Kramer (1990) caracterizaram várias proteinases do fluido da muda deste inseto. A degradação da cutícula velha é iniciada por um ataque das proteinases, expondo a quitina para subsequente ataque das quitinases. Os dados obtidos neste trabalho, embora preliminares, poderiam indicar que, em *Megaselia scalaris*, um grupo de enzimas com essas funções estariam agindo na fase de pupa, com a função de



facilitar a digestão do exoesqueleto e/ou a formação do opérculo por onde o inseto adulto poderia emergir. Entretanto, vale ressaltar que a atividade esterolítica das enzimas encontradas nos casulos vazios de *Megaselia scalaris* talvez não reflita o verdadeiro papel apresentado por essas hidrolases *in vivo*.

Além de todos os aspectos anteriormente citados, *Megaselia scalaris* é uma espécie geneticamente interessante por apresentar um mecanismo incomum de determinação sexual. Segundo Mainx (1964), (1966) e Johnson *et al.* (1988), *Megaselia scalaris* possui três pares de cromossomos homomórficos, dos quais dois pares são longos, metacêntricos e indistinguíveis entre si, enquanto o terceiro é curto e acrocêntrico. Nesta espécie, a diferenciação sexual ocorre através de uma unidade subcromossômica denominada "sex-realizer", ou fator M, o qual pode ligar-se terminalmente a qualquer um dos três cromossomos, determinando o sexo nos machos. O processo de troca deste fator pode ocorrer entre cromossomos não homólogos em uma proporção de 0,08 a 0,34%, considerado como um processo de translocação (Mainx, 1966) ou de transposição (Green, 1980 e Traut & Willhoeft, 1990).

De acordo com Mainx (1964) o polimorfismo unissexual e o processo de translocação de *Megaselia scalaris* indicam a existência de um valor adaptativo como tem sido demonstrado para outros polimorfismos genéticos. O autor estabeleceu suposições para tentar interpretar os valores adaptativos do polimorfismo unissexual. Parece possível que o "sex-realizer" possa ter um efeito de posição sobre genes particulares dentro de um grupo de ligação no qual estaria localizado, ou por um sistema baseado na heterose. Uma vez que a permuta é fortemente reduzida nos machos, cada cromossomo que possui o "sex-realizer" é continuamente protegido contra distúrbios na sua seqüência gênica e, pela incorporação de inversões, esta proteção poderia ser posteriormente fortalecida. O cromossomo determinante do sexo poderia então servir como um modelo no qual séries alélicas heteróticas no sexo masculino poderiam ser construídas, algo como coadaptação. Dependendo do valor seletivo dos efeitos heteróticos nos três grupos de ligação, o sistema teria uma certa elasticidade na sua adaptabilidade, a qual seria manifestada nas variações das proporções dos três tipos de machos dentro de uma população, conferindo uma vantagem adaptativa principalmente ao sexo masculino.

Johnson *et al.* (1988) isolaram e caracterizaram sete marcadores citogenéticos, as translocações T1-T7, e três novos marcadores genéticos fenotípicos envolvendo dois ou todos os três cromossomos do lote haplóide. Todas as translocações foram reconhecidas como macho específicas, transmitidas dos



pais para os filhos. Assim, os autores conseguiram localizar o fator determinante do sexo, M, em um dos dois cromossomos metacêntricos.

Willhoeft & Traut (1990) analisaram, através de sondas genéticas, duas populações de origem geográfica diferente e verificaram semelhanças muito grandes no cromossomo Y (autossômico portador do fator M), sugerindo que o mesmo cromossomo é portador do fator M desde a separação dessas linhagens. Na comparação dos cromossomos X e Y, encontraram pequenas diferenças sugerindo que estes cromossomos estejam em um estágio inicial de diferenciação. Traut *et al.* (1990) através do estudo do pareamento somático de cromossomos homólogos e de translocações utilizadas como marcadores citogenéticos, demonstraram que o fator determinante do sexo é necessariamente parte de uma translocação balanceada. Os autores demonstraram quatro tipos de translocações: T1 e T6, $t(1;2)$, $T4\ t(2;3)$ e $T3\ t(1;2;3)$ e concluíram que o cromossomo II é o único envolvido em todas as translocações, caracterizando-o como o portador do fator determinante do sexo. Traut & Willhoeft (1990) usaram marcadores genéticos e fenotípicos em linhagens de laboratório para detectar os raros casos nos quais os pares cromossômicos I ou III atuam como par sexual.

Traut (1994) localizou e mapeou o fator determinante do sexo (fator M) através de marcadores fenotípicos em duas linhagens independentes de *M. scalaris*. O autor revelou duas diferentes localizações do fator M no cromossomo III. Willhoeft & Traut (1995) obtiveram uma linhagem criada pela recombinação entre o cromossomo Y original (autossômico homomórfico II) e um cromossomo X. Através de sondas específicas para a região do cromossomo Y original, os autores conseguiram demonstrar que o fator determinante do sexo está na posição terminal do braço curto do cromossomo Y (cromossomo2).

Em *Megaselia scalaris* constatamos que existem diferenças quanto à ocorrência de algumas bandas esterásicas, comparando-se machos e fêmeas das diferentes linhagens. Tais diferenças poderiam constituir uma demonstração direta do grau de polimorfismo gênico de cada sexo. As proporções médias de locos polimórficos mostraram-se de 8 a 16% maiores nas fêmeas do que nos machos. Por outro lado, para a esterase-5, observamos em cruzamentos intralinhagens uma correlação entre sua expressão nos machos F1 ser igual à do pai, em 90% dos casos. Esses dados embora preliminares sugerem que pelo menos uma das esterases de *Megaselia scalaris* poderia servir como marcador bioquímico relacionado ao fator determinante do sexo, neste inseto.

Os dados obtidos no presente trabalho, justificam, em nosso entender a continuidade dos estudos referentes às esterases de *Megaselia scalaris*. O grau de polimorfismo dos diferentes locos propostos, a variação do padrão no



desenvolvimento, a variação de expressão de algumas enzimas entre os sexos, sugerindo a presença de mecanismos reguladores, são algumas observações que recomendam o prosseguimento nessa linha de pesquisa.



V. RESUMO E CONCLUSÕES

Nesse trabalho foram analisados os padrões de esterases em quatro linhagens de *Megaselia scalaris* (Diptera, Foridae). Duas dessas linhagens, denominadas CG e CP têm sido mantidas no laboratório há mais de dez anos. As outras duas (RP e PAR) foram coletadas mais recentemente, e mantidas nas mesmas condições.

As linhagens CG e PAR foram utilizadas para a determinação do tempo de desenvolvimento deste inseto, realizado a 25°C em meio de fubá-araruta. O período embrionário correspondeu a 20,7 horas. O período larval foi de 6,9 dias, enquanto a fase de pupa durou cerca de 11,7 dias para os machos e 13,6 dias para as fêmeas. Os machos apresentaram um tempo de desenvolvimento menor, em aproximadamente dois dias, em comparação às fêmeas. A duração do período ovo-imago para os machos foi em média de 19,2 dias e para as fêmeas 21,7 dias. Este padrão incomum de eclosão dos machos pode ter, na natureza, algum efeito adaptativo para esta espécie, reduzindo a incidência de endocruzamentos.

As quatro linhagens apresentaram praticamente o mesmo perfil de bandas esterásicas. Na linhagem CG detectamos 33 bandas, nas fêmeas, e 28 nos machos. Na linhagem CP esses números foram 32 e 29. Para a linhagem RP encontramos 35 e 34 bandas, e em PAR, 36 e 34 bandas nas fêmeas e machos, respectivamente.

Algumas bandas esterásicas apresentaram preferência na hidrólise do α naftil acetato e, portanto, foram consideradas alfa-esterases. Também foram detectadas enzimas que hidrolizaram preferencialmente o β naftil-acetato. Essas enzimas foram classificadas como beta-esterases. Detectamos ainda um terceiro grupo de enzimas que não mostraram preferência por nenhum dos dois substratos em particular. Essas enzimas foram denominadas alfa-beta esterases. Todas as esterases de *Megaselia scalaris* apresentaram atividade frente ao α naftil-butilato, em graus variados, com exceção da esterase-4 que não foi detectada por este substrato.

A análise do padrão de bandas, a especificidade aos substratos e a sensibilidade diferencial aos inibidores permitiram-nos estimar que as esterases de *Megaselia scalaris* são codificadas por pelo menos 17 locos gênicos. Não foi identificado nenhum loco que codifique uma esterase sexo-específica. Os mesmos locos foram encontrados nas quatro linhagens, exceto o loco Est-1, observado apenas nas linhagens CG e PAR. Entretanto, as quatro linhagens puderam ser diferenciadas com base no padrão específico de cada linhagem. Dentre esses locos os que codificam as esterases-1, 4, 11, 12, 14 foram monomórficos. Já os locos para as esterases-1A, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 13, 15, 16, 17, 18, 19 foram consideradas



polimórficos, com base nos padrões encontrados nos adultos e na análise de cruzamentos por casal. Também foi observada a existência de "alelos nulos" para os locos que codificam as esterases 5 e 6.

O uso dos inibidores permitiu uma classificação das esterases observadas nos adultos de *Megaselia scalaris*. Dentre essas enzimas, sete foram consideradas carboxilesterases com base na inibição pelo malathion, um composto organofosforado. Essas carboxilesterases corresponderam às esterases 5, 6, 10, 14, 15, 16 e 18. As esterases 2, 3 e 4 foram classificadas como arilesterases devido à inibição específica pelo PCMB. As esterases 12 e 19 foram inibidas pelo malathion, prostigmina e em menor escala pelo PMSF, sendo classificadas como acetilcolinesterases. É provável que a esterase-19 seja uma forma derivada da esterase-12. A esterase-6 também foi inibida pelo PMSF, indicando que esta enzima é uma carboxilesterase com um resíduo de serina em seu centro ativo, acessível a este inibidor.

Os casulos vazios de *Megaselia scalaris* apresentaram pelo menos três esterases que também foram classificadas como carboxilesterases. Essas enzimas parecem ser sintetizadas na fase de larva ou pupa e posteriormente depositadas no tegumento dos casulos. Não temos evidências do papel das carboxilesterases dos casulos vazios. Entretanto essas enzimas poderiam desempenhar atividades hidrolíticas relacionadas ao tegumento da pupa, como observado para outros insetos.

Algumas esterases apresentaram atividade em períodos específicos ou variações de atividade ao longo do desenvolvimento de *Megaselia scalaris*. Esses dados foram observados nas duas linhagens escolhidas para este estudo, CG e PAR. Em especial, detectamos uma esterase presente apenas nas fases de larvas de 1° e 2° estádios. As esterases observadas nos casulos também parecem ser sintetizadas em períodos específicos das larvas de 3° estádio e posteriormente transferidas para os casulos. A enzima que identificamos como acetilcolinesterase (esterase-12) apresentou uma baixa atividade em larvas de 3° estádio, comparada a outros períodos. Essa enzima também mostrou uma atividade bem maior nos machos do que nas fêmeas, embora os machos apresentem uma quantidade de proteínas bem menor.

A análise de cruzamentos por casal realizada para as quatro linhagens confirmou a existência de "alelos nulos" para os locos esterásicos 5 e 6. Esses estudos também mostraram que pelo menos uma das esterases, a esterase-5, parece estar associada ao fator determinante do sexo em *Megaselia scalaris*. Estudos posteriores devem ser conduzidos para esclarecer este ponto.



VI. SUMMARY AND CONCLUSIONS

The esterase patterns was investigated in four strains of *Megaselia scalaris* (Diptera, Phoridae) by polyacrylamide gel electrophoresis. Two of these strains (CG and CP) have been reared in corn wheat-arrowroot culture medium for more than ten years. The other two strains (RP and PAR) were collected more recently and have been maintained in the same conditions.

Two of these strains (CG and PAR) were used for determining the life-cycle of this insect at 25°C in corn wheat-arrowroot medium. The embryogenesis period lasted about 20,7 hours. The mean duration of the larval period was 6,9 days whereas for the pupal stage it was found to be 11,7 days for pupae which originate males and 13,6 days for those originating females. The overall life-cycle was determined to be 19,2 days for males and 21,7 days for females. This unusual eclosion pattern might reduce the incidence of inbreeding in natural populations of this insect.

We have detected 33 esterase bands in females and 28 in males for the CG strain. In CP strain these numbers were 32 and 29, respectively in females and males. The esterase bands in RP and PAR strains were 35 and 36 in the females, respectively for both strains. We found 34 bands in the males of these two strains.

Some of these enzymes were classified as beta-esterases due to their preference to hydrolyse the beta-naphthyl-acetate as a substrate whereas other esterases showed a distinct preference for the alpha-naphthyl isomer, being classified as alpha-esterases. A third group did not show any particular preference for one or another substrate and therefore were assigned as alpha-beta-esterases.

The banding patterns, along with the substrate preference and differential inhibition behavior shown by the esterases in the four strains, allowed us to propose that in *Megaselia* these enzymes are coded at least by 17 gene loci, all of them expressed in both females and males. The four strains presented the same loci number but one, the Est-1 locus, was observed only in the CG and PAR strains. Despite of this observation, the four strains could be differentiated based on its specific alleles distribution. The loci for the esterase-1, 4, 11, 12 and 14 displayed monomorphic patterns; however, the loci for the esterase-1A, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 13, 15, 16, 17, 18 and 19 have been considered polymorphic. Null alleles were observed for the esterase-5 and esterase-6 loci.

The use of inhibitors allowed us to classify the esterases found in adult flies in three classes. The esterase-5, 6, 10, 14, 15, 16, and 18 were classified as carboxylesterases due to their inhibition by the organophosphate malathion. Esterase-2, 3 and 4 were considered as belonging to the arylesterase class, as they are selectively inhibited by PCMB. Esterase-12 and 19 were classified as



acetylcholinesterases as judged by their inhibition profile against malathion, eserine sulfate, and prostigmine. Esterase-6 could be further classified as a serine hydrolase based on its sensitivity to PMSF.

We have observed three esterases in the empty pupal case of *Megaselia scalaris*. These enzymes were also classified as carboxylesterases. They seem to be synthesized in third instar larvae and further deposited in the pupal case, where they might have some hydrolytic functions as described for other insects.

Some esterases of *Megaselia scalaris* presented a specific pattern during the life-cycle of this insect. These observations were made in two strains selected for this experiment (CG and PAR). We detected one alpha-esterase specific to the first and second larvae periods. We also observed that the esterases deposited in the pupal cases were synthesized in the third instar larvae. The acetylcholinesterase (esterase-12) was observed to have a much lower activity in the third instar larvae, as compared to pupae or adult flies. In contrast, this enzyme showed a greater activity in males than females in spite the higher protein content presented by females.

Pair mating crosses have confirmed the existence of null alleles for esterase-5 and esterase-6 loci. These crosses also indicated that the expression of the esterase-5 seems to be associated to the "sex-realizer factor" described for *Megaselia scalaris*.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACQUAAH, G. Genetic principles associated with isozymes. In: **Practical Protein Electrophoresis for Genetic Research**. Portland, Oregon. **Dioscorides press**, 1992. cap.1, p. 13-15.
- ALDRIGE, W. N. Serum esterase. Two types of esterase (A and B) hydrolysing p-nitrophenil acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination. **Biochem. J.**, v. 53, p. 110-117, 1953.
- ANDERSEN, S. O. Enzymatic activities in Locust cule involved in sclerotization. **Insect. Biochem.**, v. 19, n. 1, p. 59-67, 1989.
- ANDERSEN, S. O., RAFN, K., ROEPSTORFF, P. Sequence studies of proteins from larval and pupal cuticle of the yellow meal worm, *Tenebrio molitor*. **Insect. Biochem. Molec. Biol.**, v. 27, n. 2, p. 121-131. 1997.
- 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. Molec. Biol.**, v. 25, p. 621-630, 1995.
- AYALA, F. J. Relative fitness of populations of *Drosophila serrata* and *Drosophila birchii*. **Genetics**, v. 51, p. 527-544, 1965.
- BARRÉ, N., MAULÉON, H., GARRIS, G. I., KERMARREC, A. Predators of the tick *Amblyomma variegatum* (Acari: Ixodidae) in Guadeloupe, French West Indies. **Exp. & Appl. Acarol.**, v. 12, p. 163 -170, 1991.
- BECKMAN, L., JOHNSON, F. M. Esterase variations in *Drosophila melanogaster*. **Hereditas**, v. 51, p. 212-220, 1964.
- BEEMAN, R. W., SCHMIDT, B. A., Biochemical and genetic aspects of malathion-specific resistance in the Indianmeal moth (Lepidoptera: Pyralidae). **J. Econ. Entomol.** v. 75, p. 945, 1982.
- BENNER, D. B., CURTIS, S. K. Internal reproductive organs of the female humpbacked fly, *Megaselia scalaris* Loew (Diptera: Phoridae). **Int. J. Insect Morphol. Embriol.**, v. 17, n.3, p.197-205, 1988.
- BENNER, D. B., OSTERMEYER, E. C. Some observations on the life history of fly *Megaselia scalaris* Loew (Phoridae) with special reference to the eclosion pattern. **J. Tenn. Acad. Sci.**, v. 55, n. 3, p. 103-105, 1980.
- BERGER, E. M., CANTER, R. The esterase of *Drosophila*. I. The anodal esterases and their possible role in eclosion. **Develop. Biol.**, v. 33, p. 48-55, 1973.
- BICUDO, H. E. M. C., RICHARDSON, R. H. Morphological and developmental studies of *Drosophila mulleri*, *D. arizonensis* and their hybrids. **Biol. Zbl.**, v. 97, p. 195-203, 1978.



- BINNS, E. S., GURNEY, B., WYATT, I. J. WHITE, P. F. Populations of the phorid fly *Megaselia halterata* on an experimental mushroom unit over four years. **Ann. Appl. Biol.**, v. 92, p. 159-171, 1979.
- 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. of Entomol. Res.**, v. 81, n. 5-10, 1991.
- BOWNES, M. The role of juvenile hormone, ecdysone and the ovary in the control of *Drosophila* vitellogenesis. **J. Insect Physiol.**, v. 35, 409-413, 1989.
- BRADLEY, J. U., SONYA, N. M., CHEN, J. Inhibition neurally mediated nonadrenergic, noncholinergic contractions of guinea pig bronchus by isozyme-selective phosphodiesterase inhibitors. **J. Farmacol. Exp. Therap.**, v. 272, n.2, 1994.
- BRISABOIS, A., GOULLET, P. Isolation and characterization of carboxylesterase E3 from *Salmonella enterica*. **J. App. Bacteriol.**, v. 75, p. 176-183, 1993.
- BROOKHATR, G. L., KRAMER, K. J. Proteinases in molting fluid of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. **Insect Biochem.**, v. 20, n. 5, p. 467-477, 1990.
- CALLAGHAN, A., HEMINGWAY, J., MALCOLM, C. A. The selection and genetic analysis of esterase electromorphs in an organophosphate-resistant strain of *Culex pipiens* from Italy. **Biochem. Genet.**, v. 31, n. 11/12, p. 459-472, 1993.
- CAMPBELL, P. M., HEALY, J. M., OAKESHOTT, J. G. Characterisation of juvenile hormone esterase in *Drosophila melanogaster*. **Insect. Biochem. Molec. Biol.**, v. 22, n.7, p. 665-677, 1992.
- CARARETO-CAMARGO, C. M. A., MOURÃO, C. A. O dimorfismo sexual de tamanho em pupas de *Megaselia scalaris* (Phoridae, Diptera). **Ciênc. e Cult.**, v. 38 (supl.), p. 928, 1986.
- CARRASCO, C.E., PÉREZ-CHIESA, Y., BRUCK, D. The esterases of *Drosophila dunni*. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 79B, n. 3, p.37, 1984.
- CASABÉ, N., ZERBA, E. N. Esterases of *Triatoma infestans* and its relationship with the metabolism of organophosphorus insecticides. **Comp Biochem. Physiol.**, v. 68C, p. 255-258, 1980.
- CERON, C. R. **Padrão de esterases no desenvolvimento de *Drosophila mulleri*, *D. arizonensis* e seus híbridos**. São Paulo, 1988. 142p. . Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Genética). Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.
- CERON, C. R., SANTOS, J. R., BICUDO, H. E. M. C. The use of gelatin to dry cellophane wound slab gels in embroidering hoop. **Rev. Brasil. Genet.**, v. 15, n. 1, p. 201-203, 1992.



- COLLET, C., NIELSEN, K. M., RUSSELL, R. J., KARL, M., OAKESHOTT, J. G. RICHMOND, R. C. Molecular analysis of duplicated esterase genes in *Drosophila melanogaster*. **Mol. Biol. Evol.**, v. 7, p. 9-28, 1990.
- COUNDRON, T. A., DUNN, P. E., SEBALLOS, H. L., WHAREN, R. E., SANBURG, L. L., LAW, J. H. Preparation of homogeneous juvenile hormone specific esterase from the haemolymph of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. **Insect Biochem.**, v. 11, n. 4, p. 453-461, 1981.
- DANFORD, N. D., BEARDMORE, J. A. Biochemical properties of esterase-6 in *Drosophila melanogaster*. **Biochem. Genet.**, v. 17, p. 1-22, 1979.
- DAVIS, B. J. Dis electrophoresis II. Methods and application to human serum proteins. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v.121, p. 404-427, 1964.
- DEBERNARD, S., COUILLAUD, F. Juvenile hormone degradation in the female locust *Locusta migratoria*: evidence for new catabolites. **J. Insect. Physiol.**, v. 40, p. 975-982, 1994.
- DEIMILING, O. Esterase 23 (ES-23): characterization of a new carboxylesterase isozyme (E.C. 3.1.1.1) of the house mouse, genetically linked to ES-2 or chromosome 8. **Biochem. Genet.**, v. 22, p. 769-782, 1984.
- DEIMILING, O., TAYLOR, B. A. Esterase 25 (ES-25): identification and characterization of a new kidney arylesterase of the house mouse, genetically linked to Ly-10 on chromosome 12. **Biochem. Genet.**, v.25, p. 639-646, 1987.
- DEIMILING, O., WASSMER, B. Genetic characterization of esterase-28 (ES-28) of the house mouse. **Biochem. Genet.**, v. 29, p. 55-64, 1991.
- DEMEREK, M., KAUFMANN, B. P. **Drosophila guide**. The Lord Baltimore Press, Baltimore, Maryland, 1945.
- DENLINGER, D. A., TANAKA, S. Cycles of juvenile hormone esterase activity during the juvenile hormone-driven cycles of oxygen consumption in diapause of flesh flies. **Experientia**, v. 45, p. 474-476, 1989.
- DEVONSHIRE, A. L. The properties of a carboxylesterase from the peach-potato aphid, *Myzus persicae* (Sulz.), and its role in conferring insecticide resistance. **Biochem. J.**, v. 167, p. 675-683, 1977.
- DEVONSHIRE, A. L., MOORES, G. D., A carboxylesterase with broad substrate specificity causes organophosphorus, carbamate and pyrethroid resistance in peach-potato aphids (*Myzus persicae*). **Pestic. Biochem. Physiol.**, v. 18, p. 235-246, 1982.
- 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, n. 4, p. 659-665, 1986.
- DISNEY, R. H. I. A further case of a scuttle fly (Dipt., Phoridae) whose larvae attack lug eggs. **Entomol. Mon. Mag.**, v. 112, p. 174, 1976.
- EAST, P. D. Non-specific esterases of *Drosophila buzzatti*. In: **Ecological Genetics and Evolution. The Cactus- Yeast *Drosophila* Model System.** I. S. F. Baker and W. T. Starmer editors. **Academic Press Australia**, p. 323-338, 1982.
- EL-MINIAWI, S. F., MOUSTAFA, M. A. On the biology of *Megaselia scalaris* Loew. **Bull. Soc. Entomol. Egypte**, v. 49, p. 81-91, 1965.
- FIELD, L. M., DEVONSHIRE, A. L., FORDE, B. G. Molecular evidence that insecticide resistance in peach-potato aphids (*Myzus persicae* Sulz.) results from amplification of an esterase gene. **Biochem. J.**, v. 251, p. 309-312, 1988.
- 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.
- 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.
- FOURNIER, D., BRIDE, J. M., HOFFMANN, F., KARCH, F. Acetylcholinesterase: two types of modifications confer resistance to insecticide. **J. Biol. Chem.**, v. 267, n. 20, p. 14270-14274, 1992.
- FOURNIER, D., MUTERO, A., PRALAVORIO, M., BRIDE, J. M., *Drosophila* acetylcholinesterase mechanisms of resistance to organophosphates. **Chem. Biol. Interactions**, v. 87, p. 233-238, 1993.
- GARRIS, G. I. *Megaselia scalaris* (Diptera. Phoridae) infesting laboratory tick colonies. **J. Med. Entomol.**, v. 20, n. 6, p. 688, 1983.
- GEORGHIOU, G. P., PASTEUR, N. Electrophoretic esterase patterns in insecticide-resistant and susceptible mosquitoes. **J. Econ. Entomol.**, v. 71, n. 2, p. 201-205, 1978.
- GRANDI, G. Ricerche sopra un Phoridae (diptera) africano (*Aphiochaeta xantina* Speis.), con particolare riguardo alla morfologia esterna della larva. **Bollettino del Laboratorio di Zoologia Generale e Agraria**. v. VIII, p. 242-263, 1913-1914.
- GREEN, M. M. Transposable elements in *Drosophila* and other Diptera. **Ann. Rev. Genet.**, v. 14, p. 109-120, 1980.



- HAIDER, S. R. Description of the male genitalia of *Megaselia scalaris* (Loew) an intestinal myiasis producing fly. **Pak. J. Health**, v. 6, n. 3, p. 191-192, 1956.
- HALL, L. M. C., SPIERER, P. The Ace locus of *Drosophila melanogaster*: structural gene for acetylcholinesterase with an unusual 5' leader. **EMBO J.**, v. 5, p. 2949-2954, 1986.
- HANZILIK, T. N., ABDEL-AAL, Y. A. I., HARSHMAN, L. C., 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, n. 12, p. 419-425, 1989.
- HANZILIK, T. N., HAMMOCK, B. D. Characterization of juvenile hormone hydrolisis in early larval developmente of *Trichoplusia ni*. **Arch. Insect. Bioch. & Physiol.**, v. 9, p. 135-156, 1988.
- HARRIS, H. Gene and isozyme (Review lecture). **Proc. Royal Soc. Serv. B.**, v. 174, p. 1-13, 1969.
- HARSHMAN, L. G., WARD, V. K., BEETHAM, J. K., GRANT, D. F., GRAHAN, L. J., ZRAKET, C. A., HECKEL, D. G., HAMMOCKS, D. B. Cloning, characterization, and genetics of the juvenile hormone esterase gene from *Heliothis virescens*. **Insect. Biochem. Molec. Biol.**, v. 24, n. 7, p. 671-676, 1994.
- HAYAKAWA, Y. A putative new juvenile peptide hormone in Lepidopteran insects. **Biochem. Biophy. Res. Commun.**, v. 185, n. 3, p. 1141-1147, 1992.
- HEALY, M. J., DUMANCIC, M. M., OAKESHOTT, J. G. Biochemical and physiological studies of soluble esterases from *Drosophila melanogaster*. **Biochem. Genet.**, v. 29, n. 7/8, 1991.
- HEMINGWAY, J. Malathion carboxylesterase enzymes in *Anopheles arabiensis* from Sudan. **Pestic. Biochem. Physiol.** v. 23, p. 309, 1985.
- HEYMANN, E. Carboxylesterase and amidases. In: **Enzymatic Basis of Detoxication**. New York: Academic press, 1980. v. 2., p. 291-323.
- HIGA, H. H., MANZI, A., VARKI, A. O-acetylation and de-O-acetylation of sialic acids. Purification, characterization, and properties of a glycosylated rat liver esterase especific for 9-O-acetylated sialic acids. **Biol. Chem.**, v. 234, p. 19435-19442, 1989.
- HOFFMANN, F., FOURNIER, D., SPIERER, P. A minigene rescues acetylcholinesterase lethal mutation in *Drosophila melanogaster*. **J. MOI. Biol.**, v. 223, P. 17-22, 1992.
- HOFFMANN, K. H., FIBINGER, S. C., HOFFMANN, G. Haemolymph juvenile hormone III esterase activity during adult life of female and male crickets, *Gryllus*



- bimaculatus* de Geer (Ensifera, Gryllidae). **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 109A, n. 2, p. 285-291, 1994.
- HOPKINSON, D. A. Isozymes. **J. Clin. Phathol.**, v. 24, p. 122-127, 1974.
- HUANG, Y. S., WOODS, L., SULFATOS, L. G. Solubilization and purification of A-esterase from mouse hepatic microsomes. **Biochem. Pharmacol.**, v. 48, p.1273-1280, 1994.
- HUBBY, J. L., LEWONTIN, R. C. A molecular approach to the study of genic Heterogeneity in natural population. I. The number of alleles at different loci in *Drosophila pseudoobscura*. **Genetics**, v. 54, p. 577-574, 1966.
- JERSEN, U. G., ROTHMANN, A., SKOU, L., ANDERSEN, S. O., ROEPSTORF, P., HOJRUP, P. **Insect. Biochem. Molec. Biol.**, v. 27, n. 2, p.109-120, 1997.
- JOHNSON, D. S., MERTL, H. G., TRUT, W. Inheritance of cytogenetic and new genetic markers in *Megaselia scalaris*, a fly with an unusual sex determining mechanism. **Genetica**, v. 77, p. 159-170, 1988.
- JOHNSON, F. M., RICHARDSON, R. H., KAMBYSELLIS, M. P., Isozyme variability in species of the genus *Drosophila*. III. Qualitative comparasion of the esterases of *D. aldrichi* and *D. mulleri*. **Biochem. Genet.**, v. 1, p. 239-247, 1968.
- JOHNSON, F. N., KANADI, C. G., RICHARDSON, R.H., WHEELER, M. R., STONE, W. S. An operational classification of *Drosophila* esterases for especies comparasion. **Univ. Texas Publ.**, v. 6615, p. 517-532, 1966.
- JOHNSON, G. B. Enzyme polymorphism and metabolism. **Science**, v. 184, p.28-37, 1974.
- 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*. **Both Biochem. Genet.**, v. 24, n. 5-6, p. 499-508, 1986.
- JONES, D., JONES, G., RUDINICKA, M., CLICK, A.J., SPEEKRISHNA, S.C. High resolution isoelectric focusing of juvenile hormone esterase activity from the haemolymph of *Tricoplusia ni* (Hubner). **Experientia**, v. 42, n. 1, p. 45-47, 1986.
- JONES, D., JONES, G., WING, K. D., HAMMOCK, B. D. The source and action of head factors regulations esterase in larvae of the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. **J. Insect Physiol.**, v. 27, p. 85-91, 1981.
- JONES, D., JONES, G., WING, K. D., RUDINICKA, M., HAMMOCK, B. D. Juvenile hormone esterases of lepdoptera. I. Activity in the hemolymph during the last larval instar of 11 species. **J. Comp. Physiol.**, v. 148, p.1-10, 1982.
- JONES, G. VENKATARAMAN, B. R., RIDLEY. B., O'MANOY, P., TURNER, H. Structure, expression and gene sequence of a juvenile hormone esterase-related protein from metamorphosing larvae of *Trichoplusia ni*. **Biochem. J.**, v. 302, p. 827-835, 1994.



- JONES, G., MANCZAK, M., WOZNIAK, M., R`YKANDAR, K. Characterization of two major isoforms of juvenile hormone esterase from *Trichoplusia ni* (Lepidoptera). **Biochim. et Biophys. Acta.**, v. 1161, p. 235-243, 1993.
- JUNGE, W. Human microsomal carboxylesterase. Distribution in several tissues and some preliminary observation on its appearance in serum. **Enzymes Health Dis.**, p. 54-58, 1981.
- JUNGE, W. Carboxylesterases. In: BERGMAYER, H. U. **Methods of enzymatic analysis**, 3ed., Florida: Verlag Chemie, v. II, cap. 1.1, p. 2-14, 1984.
- KAMBYSELLIS, M. P., JOHNSON, F. M., RICHARDSON, R. H., Isoenzyme variability in species of the genus *Drosophila*. IV. Distribution of the esterases in the body tissues of *Drosophila aldrichi* and *D. mulleri* adults. **Biochem. Genet.**, v. 1, p. 249-265, 1968.
- 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, qualification and characterization. **Insect Biochem.**, v. 10, p.331-337, 1980.
- KAROTAM, J., DELVES, A. C., OAKESHOTT, J. G. Conservation and change in structural and 5' flanking sequences of esterase 6 in sibling *Drosophila* species. **Genetica**, v. 88, p.11-28, 1993.
- KAROTAM, J., OAKESHOTT, J. G. Regulatory aspects of esterase 6 activity variation in sibling *Drosophila* species. **Heredity**, v. 71, p. 41-50, 1993.
- 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.
- KENNEDY, B. P., AAMODT, E. J., FRANCES, L. A., CHUNG, M. A., HESCHL, M. F. P. McGHEE, J.D. The gut esterase gene (ges-1) from the nematodes *Caenorhabditis elegans* and *Caenorhabditis briggsae*. **J. Mol. Biol.**, v. 299, p. 890-908, 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.



- KLAGES, G., EMMERICH, H. Juvenile hormone metabolism and juvenile hormone esterase titer in hemolymph and peripheral tissues of *Drosophila hydei*. **J. Comp. Physiol.**, v. 132, p. 319-325, 1979.
- KOMORI, K., SMITH, K. G. U., ODA, T., KARAMINE, D. A case of lung myiasis caused by larvae of *Megaselia spiracularis* Schmitz (Diptera: Phoridae). **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 72, n. 5, p. 467-470, 1978.
- KORT, C. A. D. de, GRANGER, N. A. Regulation of the juvenile hormone titer. **Am. Rev. Entomol.**, v. 26, p.1-28, 1981.
- KRAFSUR, E. S. Allozyme variation in stable flies (Diptera: Muscidae) **Biochem. Genet.**, v. 31, n. 5/6, p. 231-249, 1993.
- KRAFSUR, E. S., BLACK, IV. Analysis of isozyme loci in the face fly, *Musca autumnalis* degeer. **Biochem. Genet.**, v. 30, n. 11/12, p. 625-634, 1992.
- KRAFSUR, E. S., HELM., J. M., BLACK, W. C., Genetic diversity at Electrophoretic loci in the house fly, *Musca domestica* L. **Biochem. Genet.**, v. 30, n. 5/6, p. 317-329, 1992.
- KRAFSUR, E. S., VOS, J., NARIBOLI, P., MARQUEZ, G. Gene diversity at allozyme loci in the cottonwood leaf beetle, *Chrysomela scripta*. **Biochem. Genet.**, v. 33, n. 3/4, p. 83-89, 1995.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LAI-FOOK, J., SMITH, P. H. Genetics of the hemolymph esterase of *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae). **Biochem. Genet.**, v. 30, n. 3/4, p. 123-131, 1992.
- LAPENTA, A. S. Esterase patterns of species in the *Drosophila buzzatii* cluster. **Cytobios**, v. 84, p. 13-29, 1995.
- LEE, H., TO, R. J. B., LATTA, R. K., BIELY, P., SCHNEIDER, H. Some properties of extracellular acetylxylin esterase produced by the yeast *R. mucilaginosa*. **App. Environ. Microbiol.**, v. 53, n.12, p. 2831-2834, 1987.
- LEIBEL, W. S. An analysis of esterase activities from surgeon fish tissues yields evidence of an atypical pseudocholinesterase. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 91B, p. 437-447, 1988.
- 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 population of *D. pseudoobscura*. **Genetics**, v. 54, p. 595-609, 1966.
- LIMA, L. M. K. S., CONTEL, E. P. B. Electrophoretic analysis of 12 proteins in natural populations of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: noctuidae). **Rev. Brasil. Genet.**, v. 13, n. 4, p. 711-729, 1990.



- LIMA-CATELANI, A. R. A. **Padrão de esterases de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus***. São José do Rio Preto, 1996. 126p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Genética). Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP.
- LITH, H. A., BIEMAN, M., ZUTPHEN, B. F. M. Purification and molecular properties of rabbit liver esterase ES-1A. **Ev. J. Biochem.**, v. 184, p. 545-551, 1989.
- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L., RANDALL, R. J. Protein determination with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 193, p. 265-275, 1951.
- MacCALEB, D. C., REDDY, G., KUMARA, A. K. Some properties of the haemolymph juvenile hormone esterase in *Galleria mellonella* larvae and *Tenebrio molitor* pupae. **Insect. Biochem.**, v. 10, p. 273-277, 1980.
- MACIEIRA, J. O., CHAUD-NETTO, J., ZANON, A. M. Oviposition rate and relative viability of descendants from couples of *Megaselia scalaris* (Diptera: Phoridae) reared in different experimental conditions. **Rev. Bras. Biol.**, v. 43, p. 223-228, 1983.
- MAINX, F. Die geschlechtsbestimmung bei *Megaselia scalaris* Loew (phoridae). **Z. Vererbungs.** v. 98, p. 49-60, 1966.
- MAINX, F. The genetics of *Megaselia scalaris* loew (phoridae): A new Type of sex determination in diptera. **Am. Nat.**, v. XCVIII, n. 903, p. 415-430, 1964.
- MALKENSON, N. C., WOOD, E. J., ZERBA, E. N. Isolation and characterization of an esterase of *Triatoma infestans* with a critical role in the degradation of organophosphorus esters. **Insect Biochem.** v. 14, n. 4, p. 481-486, 1984.
- MANE, S. D., TOMPKINS, L., RICHMOND, R. C. Male esterase 6 catalyses the synthesis of a sex pheromone in *Drosophila melanogaster* females. **Science**, v. 222, p. 419-421, 1983a.
- MANE, S. D., TEPPER, C. S., RICHMOND, R. C. Studies of esterase-6 in *D. melanogaster*. XIII. Purification and characterization of the two major isozymes. **Biochem. Genet.**, v. 21, p. 1019-1039, 1983b.
- 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.
- MAXWELL, D. M. The specificity of carboxylesterase protection against the toxicity of organophosphorus compounds. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 114, p. 306-312, 1992.
- MEIKLE, D. D., SHEEMAN, 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, n.2, p. 93-101, 1990.



- MILLER, P. L. A possible sensory function for the stop-go patterns of running in phorid flies. **Physiol. Entomol.**, v. 4, p. 301-310, 1979.
- MORGAN, E. W., YAN, B., GREENWAY, D., PETERSEN, D. R., PARKINSON, A. Purification and characterization of two rat liver microsomal carboxylesterase (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 *Drosophila 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 organophosphorus resistance. **J. Agr. Food. Chem.**, v. 22, p. 350-355, 1974.
- MOTOYAMA, N., KAO, L. R., LIN, P. T., DAUTERMAN, W. C., Dual role on esterases in insecticide resistance in green rice leafhopper. **Pestic. Biochem. Physiol.**, v. 21, p. 139, 1984.
- MOUCHÉS, C., MAGNIN, M., BERGE, J. B., DE SILVESTRI, M., BEYSSAT, V., PASTEUR, N., GEORGHIOU, G. P. Overproduction of detoxifying esterases in organophosphate-resistant *Culex* mosquitoes and their presence in other insects. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.84, p. 2113-2116, 1987.
- MOUCHÉS, C., PASTEUR, N., BERGE, J. B., OLIVER, H., Amplification of an esterase gene is responsible for insecticide-resistance in a California *Culex* mosquito. **Science**, v. 233, p. 778-780, 1986.
- MOUCHÉS, G., PAUPLIN, Y., AGARWAL, M., LEMIEUX, L., HERZOG, M., ABADON, M., BEYSSAT-ARNAOUTY, V. HYRIEN, O., VINCENT, B. R. S., GEORGHIOU, G., PASTEUR, N. Characterization of amplification core and esterase B1 gene responsible for insecticide resistance in *Culex*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 87, p. 2574-2578, 1990.
- MOURÃO, C. A. Araruta como substituto de ágar em meio de cultura para *Drosophila*. **Rev. Brasil. Genet.**, v.10, n. 3 (encarte), 1987.
- MURTHY, K. R. S., VEERABHADRAPPA, P. S. Purification, characterization and properties of carboxylesterases from the midgut of the silkworm, *Bombyx mori* L. **Insect Biochem. Molec. Biol.**, v. 26, p. 287-296, 1996.
- MUTERO, A. PRALAVORIO, M. , BRIDE, J. M., FOURNIER, D. Resistance-associated point mutations in insecticide-insensitive acetylcholinesterase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 91, p. 5922-5926, 1994.
- 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., COLLET, C., PHILLIS, R. W., NIELSEN, K. M., RUSSELL, R. J. CHAMBERS, G. K., ROSS, V., RICHMOND, R. C. Molecular cloning and



- characterization of esterase-6, a serine hydrolase of *Drosophila*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 84, p. 3359-3363, 1987.
- OAKESHOTT, J. G., PAPENRECHT, E. A., BOYCE., T. M., HEALY, M. J., RUSSEL, R.J. Evolutionary genetics of *Drosophila* esterases. **Genetica**, v. 90, p. 239-268, 1993.
- PARKASH, R., YADAV. J. P. Geographical clinal variation at seven esterase-coding loci in Indian populations of *Zaprionus indianus*. **Hereditas.**, v.119, p. 161-170, 1993.
- PASTEUR, N., SINÈGRE, G. Esterase polymorphism and sensitivity to Dursban organophosphorus insecticide in *Culex pipiens pipiens* populations. **Biochem. Genet.**, v. 13, n. 11/12, p. 789- 803, 1975
- PATTON, W. S. Notes on the Indian *Aphiochaetae*. **Indian J. Med. Res.**, v. 9, p. 683-691, 1922.
- PESSOA, S. B. **Parasitologia medica**. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1951.
- PICKEL, D. B. Contribuição para a biologia dos Phorídeos. **Bol. Mus. Nac. Rio de Janeiro**, v. 4, p. 67-68, 1928.
- POIRIÈ, M., RAYMOND, M. PASTEUR, N. Identification of two distinct amplifications of the esterase B locus in *Culex pipiens* (L.) mosquitoes from mediterranean countries. **Biochem. Genet.**, v. 30, n. 1/2, p. 13-26, 1992.
- POLYAKOVA, E. V., KOROCHKIN, L. I. Investigation of the spectrum of esterase isozymes in various species of *Drosophila* of *virilis* group J. **Evol. Biochem. Physiol.**, v. 22, n. 3, p. 156-161, 1986.
- PRABHAKARAN, S. K., KAMBLE, S. T. Purification and characterization of an esterase isozyme from insecticide resistant and susceptible strains of German cockroach, *Blattella germanica* (L.). **Insect. Biochem. Molec. Biol.**, v. 25, n. 4, p. 519-524, 1995.
- PRALAVORIO, M., FOURNIER, D. *Drosophila* acetylcholinesterase: characterization of different mutants resistant to insecticides. **Biochem. Genet.**, v. 30, n. 1/2, p. 77-83, 1992.
- PRAWIRODISASTRO, M., BENJAMIN, D. M. Laboratory study on the biology and ecology of *Megaselia scalaris* (Diptera: Phoridae). **J. Med. Entomol.**, v. 16, n. 4, p. 317-320, 1979.
- PROCUNIER, W. S., SMITH, J. J., RICHOMOND, R. C. Physical mapping of the esterase-6 locus of *Drosophila melanogaster*. **Genetica**, v. 84, p. 203-208, 1991.
- QADRI, S. S. H. *Megaselia scalaris* (Lw.) (Dipt. Phoridae) for the biossay of organophosphorus insecticides. **Bull. Ent. Res.**, v. 59, p. 389-392, 1969.



- RACHINSKY, A., HARTFELDER, K. Corpora allata activity. A prime regulating element for caste-specific juvenile hormone titre in honey bee larvae (*Apis mellifera carnica*). **J. Insect Physiol.**, v. 36, p. 189-194, 1990.
- RAUSCHENBACH, I. Y., LUKASHINA, N. S., KHLEBODAROVA, T. M., KOROCKKIN, L. I. Role of juvenile hormone esterase in dipteran (*Drosophila virilis*) metamorphosis. **J. Comp. Physiol.**, v. 37, p. 541-548, 1991.
- RAUSCHENBACH, I. Y., LUKASHINA, N. S., KOROCKKIN, L. I. Role of pupal esterase in regulation of hormonal status in two *D. virilis* stocks differing in response to high temperature. **Develop. Genet.**, v. 22, p. 65-80, 1994.
- RAYMOND, M., BEYSSAT-ARNAOUTY, V., SIVASUBRAMANIAN, N., MOUCHÈS, C., GEORGHIOU, G. P., PASTEUR, N. Amplification of various esterase B's responsible for organophosphate resistance in *Culex* mosquitoes. **Biochem. Genet.**, v. 27, n. 7/8, p. 417- 423, 1989.
- RAYMOND, M., CALLAGHAN, A., FORT, P., PASTEUR, N. Worldwide migration of amplified insecticide resistance genes in mosquitoes. **Nature**, v. 350, p. 151-153, 1991.
- 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.
- RICHARDSON, P. N., CHANTER, D. O. Aspects of the laboratory production of mushroom phorid flies (*Megaselia halterata*) parasitised by the nematode *Howardula husseyi*. **Ann. Appl. Biol.**, v. 95, p. 1-9, 1981.
- RICHARDSON, P. N., HESLING, J. J. Laboratory rearing of the mushroom phorid *Megaselia halterata* (Diptera: Phoridae). **Ann Appl. Biol.**, v. 88, p. 211-217, 1978.
- RICHARDSON, P. N., HESLING, J. J., RIDING, I. L. Life cycle and description of *Howardula husseyi* n. sp. (Tylenchida: Allantonematidae). A nematode parasite of the mushroom phorid *Megaselia halterata* (Diptera: Phoridae). **Nematologica**, v. 23, p. 217-231, 1977.
- RICHARDSON, P. N., HESLING, J. J. Studies on an overwintering population of the mushroom phorid *Megaselia halterata* (Diptera: Phoridae) parasitized by *Howardula husseyi* (nematoda: Allantonema tidae). **Ann. Appl. Biol.**, v. 86, p. 321-327, 1977.



- 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, n. 12, p. 849-853, 1981.
- RIDDIFORD, L. M. Effects of juvenile hormone on the programming of postembryonic development in eggs of the silkworm, *Hyalophora cecropia*. **Dev. Biol.**, v. 22, p. 249-263, 1970.
- RIDDIFORD, L. M., WILLIAMS, C. M. The effects of juvenile hormone analogues on the embryonic development of silkworms. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 57, p. 595-601, 1967.
- ROBINSON, W. M. *Megaselia (M.) scalaris* (Diptera: Phoridae) associated with laboratory cockroach colonies. **Proc. Entomol. Soc. Mash.**, v. 77, n. 3, p. 384-390, 1975.
- ROBINSON, W. M. Old and new biologies of *Megaselia (M.) scalaris* (Diptera, Phoridae). **Studia Ent.**, v.14, n. 1-4, p. 321-348, 1971.
- ROCHA, U. F., BELO, M., MORAIS, J. R. E., SOGORB, A., BARUCH, A. Ecologia de carrapatos. VI. Influência da umidade ambiente sobre a invasão de fêmeas de *Boophilus microphus* (Canestrini) (Acari, Ixodidae) por larvas de *Megaselia scalaris* Loew (Diptera, Phoridae) e sobre a prolificidade desses artrópodes. **Naturalia**, v. 9, p. 93-100, 1984.
- ROE, R. M., HAMMOND, A. M., SPARKS, T. C. Characterization of the plasma juvenile hormone esterase in synchronous last stadium female larvae of the sugar cane borer, *Diatraea saccharalis* (F.) **Insect Biochem.**, v. 13, p. 163-170, 1983.
- ROE, R. M., JESUDASON, P., VENKATESH, K., KALLAPUR, V. L., ANSPAUGH, D. D., MAJUMDER, C. Developmental role of juvenile hormone metabolism in Lepidoptera. **Amer. Zool.**, v. 33, p. 375-383, 1993.
- ROTIN, D., TOBE, S. S. The possible role of juvenile hormone esterase in the regulation of juvenile hormone titre in the female cockroach *Diploptera punctata*. **Can. J. Biochem. Cell. Biol.**, v. 61, p. 811-817, 1983.
- SCOTT, D. Inhibition of female *Drosophila melanogaster* remating by a seminal fluid protein (esterase-6). **Evolution**, v. 40, n. 5, p. 1084-1091, 1986.
- SCOTT, D., RICHMOND, R. C. Evidence against an antrophrodisiac role for cis-vaccenil acetate in *Drosophila melanogaster*. **J. Insect. Physiol.**, v. 33, p. 363-369, 1987.
- SEKAR, V., HAGEMAN, J. H. Specificity of the serine protease inhibitor, phenylmethylsulfonyl fluoride. **Biochem. Bioph. Res. Comun.**, v. 89, p. 474-478, 1979.



- SEMENZA, L. *Aphiochaeta xanthina* Speiser. Contributo alla conoscenza della morfologia e del ciclo biologico. **Re. Ist. Lon. Sci. Lett. Cl. Sci. Mat. Nat.**, v. 86, p. 320-330, 1953.
- SERGEEV, P. V., YENIKOLOPOV, G. N., PEUNOVA, N. I., KUZIN, B. A., KHECHUMIAN, R. A., KOROKHIN, L. I., GEORGIEV, G. P. Regulation of tissue-specific expression of esterase S gene in *Drosophila virilis*. **Nucleic Acids Research**, v. 21, n. 15, p. 3545-3551, 1993.
- SHAMAAN, N. A., HAMIDAH, R., JEFFRIES, J., HASHIM, A. J., WAN NGAH, W. Z. Insecticide toxicity, glutathione transferases and carboxylesterase activities in the larva of the *Aedes* mosquito. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 104, n. 1, p. 107-110, 1993.
- SHAPIRO, A. B., WHEELLOCK, G. D., HAGEDORN, H. H., BAKER, F. C., TSAI, L. W. SCHOOLEY, D. A. Juvenile hormone and juvenile hormone esterase in adult females of the mosquito *Aedes aegypti*. **J. Insect. Physiol.**, v. 32, p. 867-877, 1986.
- SHEEHAN, K., RICHMOND, R. C., COCHRANE, B. J. Studies of esterase-6 in *Drosophila melanogaster*. III. The developmental pattern and tissue distribution. **Insect Biochem.**, v. 9, p. 443-450, 1979.
- SILVA, H. D. **Efeito do sexo sobre caracteres quantitativos em *Megaselia scalaris* Loew (Diptera: Phoridae)**. Campinas, 1991. 88p. Tese (Doutorado em Ciências). Universidade de Campinas.
- SINGH, N. B., SINGH, T. K., SINGH, Y. I., RAZAQUE, M. A. Intestinal myiasis caused by *Megaselia scalaris* (Diptera: Phoridae): A case report. **J. Com. Dis.**, v. 20, n. 2, p. 163, 1988.
- SINGH, T. S., RANA, D. Urogenital myiasis caused by *Megaselia scalaris* (Diptera: Phoridae): A case report. **J. Med. Entomol.**, v. 26, n. 3, p. 228-229, 1989.
- SMYTH, K., 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, n. 11/12, p. 437-453, 1994.
- SPACKMAN, M. E., OAKESHOTT, J. G., SMYTH, K. A., MEDVECKY, 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.
- SPACKMAN, M. E., OAKESHOTT, J. G., SMYTH, K., 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, n. 1/2, p. 39-62, 1994.



- SPICER, G. S., FLEMING, J. E. Genetics differentiation of *Drosophila melanogaster* populations as assessed by two-dimensional electrophoresis. **Biochem. Genet.**, v. 29, n. 7/8, p. 389-401, 1991.
- STEIN, G. P., TEPPER, C. S., ABLE, N. D., RICHMOND, R. C. Studies of esterase-6 in *Drosophila melanogaster*. XVI. Synthesis occurs in the male reproductive tract (anterior ejaculatory duct) and is modulated by juvenile hormone. **Insect Biochem.**, v. 14, p. 527-532, 1984.
- STEINER, W. W. M., JHONSON, W. E. Techniques for electrophoresis of Hawaiian *Drosophila*. **US - IBP. Island Ecosyst. Tech. Rep.**, v. 30, p. 1-21, 1973.
- 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.
- TAKAHASHI, S. Y., ZHAO, X., KAGEYAMA, T., YAMAMOTO, Y. Acid cysteine proteinase from the eggs of silkworm, *Bombyx mori*: Tissue distribution, developmental changes and the sites of synthesis for the enzyme. **Insect Biochem. Molec. Biol.**, v. 22, n. 4, p. 369-377, 1992.
- TAYLOR, D. B., PETERSON, R. D., MOYA-BORJA, G. E. Population genetics and gene variation in screwworms (Diptera: Calliphoridae) from Brazil. **Biochem. Genet.**, v. 34, n. 1/2, p. 625-634, 1996.
- TIMMERMAN, M. Y. J., TEUCHY, H., KUPPERS, L. P. M. The cDNA sequence encoding bovine pregastric esterase. **Gene**, v. 147, p. 259-262, 1994.
- TOUHARA, K., BONNING, B. C., HAMMOCK, B. D. Action of juvenile hormone (JH) esterase on the JH-JH binding protein complex. An *in vitro* model of JH metabolism in a caterpillar. **Insect. Biochem. Molec. Biol.**, v. 25, n. 6, p. 727-734, 1995.
- TOUHARA, K., PRESTWICH, G. D. Role of juvenile hormone binding protein in modulating function of JH epoxide hydrolase in eggs of *Manduca sexta*. **Insect. Biochem. Molec. Biol.**, v. 24, n. 6, p. 641-646, 1994.
- TOUHARA, K., SOROKER, V., PRESTWICH, D., Photoaffinity labeling of juvenile hormone epoxide hydrolase and JH-binding proteins during ovarian and egg development in *Manduca sexta*. **Insect. Biochem. Molec. Biol.**, v. 24, n. 6, p. 633-640, 1994.
- TRAPE, J. F., VATTIER-BERNARD, G., TROUILLET, J. Un cas de myiase intestinale a *Megaselia scalaris* (Loew) (Diptera, Phoridae) observé au Congo. **Bull. Soc. Path. Ex.**, v. 75, p. 443-446, 1982.
- TRAUT, W. Sex determination in the fly *Megaselia scalaris*, a model system for primary steps of sex chromosome evolution. **Genetics**, v. 136, p. 1097-1104, 1994.



- TRAUT, W., KHUONG, N. T., SCHNEIDER, S. Karyotypes of *Megaselia scalaris* (Diptera) wild-type and translocation strains. **Genetica**, v. 83, p. 77-84, 1990.
- TRAUT, W., WILLHOEFT, U. A jumping sex determinig factor in the fly *Megaselia scalaris*. **Chromosoma**, v. 99, p. 407-421, 1990.
- TRUMBLE, J. T., PIENKOWSKI, R. L. Developmental and survival of *Megaselia scalaris* (Diptera: Phoridae) at selected temperatures and photoperios. **Proc. Entomol. Soc. Wash.**, v. 81, n.2, p. 207-210, 1979.
- TSUITA, T., MIYADA, T., OKUDA, H. Purification of rat kidney carboxilesterase and its comparasion with other tissue esterases. **J. Biochem.**, v. 103, p.327-331, 1988.
- TUNRASVIN, W., SUPAT, S., SAMRAN, V. Studies on the lifehistory of *Megaselia scalaris* (Loew) in Thailand. **Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health**, v. 8, n. 1, p. 74-76, 1977.
- VENKATESH, K., ROE, R. M. The regulation of the first peak of haemolymph juvenile hormone esterase activity during the last stadium of the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. **J. Insect. Physiol.**, v. 35, p. 543-551, 1989.
- VENKATESH, K., ROE, R. M. The role of juvenile hormone and brain factor(s) in the regulation of plasma juvenile hormone esterase activity during the last larval stadium of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. **J. Insect Physiol.**, v. 34, p. 415- 425, 1988.
- VETORAZZI, E. A. **Componentes do valor adaptativo de *Megaselia scalaris* em populações experimentais.** São José do Rio Preto, 1987. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológica - Genética), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - UNESP.
- VETORAZZI, E. A. **Valor adaptativo de *Megaselia scalaris* (Diptera, Phoridae) em populações de diferentes origens geográficas.** São José do Rio Preto, 1993. 173p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Genética). Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP.
- VILLANI, F., HEMINGWAY, J. The detection and interaction of multiple organophosphorus and carbamate insecticide resistance genes in field populations of *Culex pipiens* from Italy. **Pest. Biochem. Physiol.**, v. 27, p. 218, 1987.
- VOGT, R. G., RIDDIFORD, L. M. Pheromone binding and inactivation by moth antennae. **Nature**, v. 293, p. 161-163, 1981.
- WAGNER, R. P., SELANDER, R. K. Isozymes in insects and their significance. **Ann. Rev. of Entomol.**, v.19, p. 117-139,1974.
- WALKER, C. H., MACKNESS, M. I. Esterases: problems of identification and classification. **Biochem. Pharmacol**, v. 32, p. 3265-3269, 1983.



- WALTER, F. V., WENE, G. P. Tests of insecticides to control larvae of *Euxesta stigmatias* and *Megaselia scalaris*. **J. Econ. Entomol.**, v. 44, p. 998-999, 1951.
- WAPPNER, P., KRAMER, K. J., HOPKINS, T. L., MERRITT, M., SCHAEFER, J., QUESADA-ALLUÉ, L. A. White Pupa: a *Ceratitis capitata* mutant lacking catecholamines for tanning the puparium. **Insect. Biochem. Molec. Biol.**, v. 25, n. 3, p. 365-373, 1995.
- WHITE, P. F. Pot tests with methoprene and permethrin against the mushroom phorid (*Megaselia halterata*) and the mushroom sciarid (*Lycoriella avripila*). **Ent. Exp. Appl.**, v. 26, p. 332-338, 1979.
- WHITE, P. F. Control of the mushroom phorid *Megaselia halterata* (wood) with dichlorvos applied by an automatic atomiser. **Path.**, v. 30, p.37-40, 1981a.
- WHITE, P. F. Spread the mushroom disease verticillium fungicola by *Megaselia halterata*. **Prot. Ecol.**, v. 3, p.17-24, 1981b.
- WHITTAKER, M. Cholinesterases. In: BERGMAYER, H. U. (Ed.) **Methods of Enzymatic Analysis**, 3. ed. Weinhein: 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. Molec. Biol.**, v. 24, n. 8, p. 819-827, 1994b.
- WHYARD, S., RUSSELL, R. J., WALKER, V. K. Insecticide resistance and malathion carboxylesterase in the sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. **Biochem. Genet.**, v. 32, n. 1/2, 1994a.
- WILLHOEFT, U., TRAUT, W. Molecular differentiation of the homomorphic sex chromosomes in *Megaselia scalaris* (Diptera) detected by random DNA probes. **Chromosoma**, v. 99, p. 237-342, 1990.
- WILLHOEFT, U., TRAUT, W. The sex-determining region of the *Megaselia scalaris* (diptera) Y chromosome. **Chromos. Res.**, v. 3, p. 59-65, 1995.
- WILSON, T. G., GILBERT, L. I. Metabolism of juvenile hormone I in *Drosophila melanogaster*. **Biochem Physiol.**, v. 60A, p. 85-89, 1978.
- WOLF, K. W., MERTL, H. G., TRAUT, W. Structure, mitotic and meiotic behaviour, and stability of centromere-like elements devoid of chromosome arms in the fly *Megaselia scalaris*. **Chromosoma**, v.101, p. 99-108, 1991
- WRIGHT, T. R. F. The genetics of an esterase in *Drosophila melanogaster*. **Genetics**, v. 48, p. 787-801, 1963.
- YAMAMOTO, K. CHADAREVIAN, A., PELLEGRINI, M. Juvenile hormone action mediated in male accessory glands of *Drosophila* by calcium and kinase C. **Science**, v. 239, p. 916-919, 1988.
- YU, S. J., TERRIERE, L. C. Metabolism of juvenile hormone I by microsomal oxidase, esterase, and epoxide hydrase of *Musca domestica* and some



- comparisons whit *Phornia regina* and *Sarcophaga bullata*. **Pestic. Biochem. Physiol.**, v. 9, 237-246, 1978.
- ZANON, A. M. Análise morfométrica em pupas de *Megaselia scalaris* (Diptera, Phoridae) **Ciênc. e Cult.** (supl.), v. 40, n. 7, p. 785, 1988.
- ZANON, A. M. **Aspectos da bionímia e efeitos do endocruzamento em populações de *Megaselia scalaris* (Loew, 1986) (Diptera, Phoridae).** Rio Claro, 1982. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Zoologia). Instituto de Biociências, UNESP.
- ZANON, A. M. **Efeito genéticos na variabilidade e fertilidade de *Megaselia scalaris* (Diptera, Phoridae), e sua influência em colônias de *Apis mellifera*.** Rio Claro, 1991. 106p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Zoologia). Instituto de Biociências, UNESP.
- ZEIGLER, R., WHYARD, S., DOWNE, A. E. R., WYATT, G. R., WALKER, V. K. General esterase, malathion carboxylesterase, and malathion resistance in *Culex tarsalis*. **Pestic. Biochem. Physiol.**, v. 28, p. 279, 1987.
- ZERA, A. J., GU, X., ZEISSET, M. Characterization of juvenile hormone esterase from genetically-determined wing morphs of the cricket, *Gryllus rubens*. **Insect. Biochem. Molec. Biol.**, v. 22, n. 8, p. 829-839, 1992.
- ZERA, A. J., HOLTMEIER, C. L. *In vivo* and *in vitro* degradation of juvenile hormone-III in presumptive long-winged and short-winged *Gryllus rubens*. **J. Insect. Physiol.**, v. 38, n. 1, p. 61-74, 1992.
- ZERA, A. J., TEIBEL, K. C. Differences in juvenile hormone esterase activity between presumptive macropterous and brachypteros *Gryllus rubens*: implications of the hormonal control of wing polymorphism. **J. Insect. Physiol.**, v. 35, n.1, p.7-77, 1989.
- ZERA, A. J., TIEBEL, K. C. Brachypterizing effect of group rearing, juvenile hormone-III and methoprene on winglength development in the wing- dimorphic cricket, *Gryllus rubens*. **J. Insect Physiol.**, v. 34, p. 489-498, 1988.
- ZERA, J. A., BORCHER, C. A., GAINES, S. B. Juvenile hormone degradation in adult wing morphs of the cricket, *Gryllus rubens*. **J. Insect. Physiol.**, v. 39, n. 10, p. 845-856, 1993.
- ZHU, K. Y., BRINDLEY, W. A. Molecular properties of acetylcholinesterase purified from *Lygus hesperus* Knight (Hemiptera: Miridae) **Insect. Biochem. Molec. Biol.** v. 22, n. 3, p. 253-260, 1992.
- ZHU, K. Y., CLARK, J. M. Purification and Characterization of Acetylcholinesterase from the Colorado Potato Beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say). **Insect. Biochem. Molec. Biol.**, v. 24, n. 5, p. 453-461, 1994.



